

論文の内容の要旨

論文題目 **The clinical significance of p21^{WAF1/CIP1} and p53 expression in the biliary tract cancers**

和訳 胆道癌における p21^{WAF1/CIP1} と p53 の発現の臨床的意義に関する研究
指導教官 幕内雅敏 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 李昕

【背景】

主な胆道系の癌である胆嚢癌と肝外胆管癌にはいくつかの臨床的な相違点がある。胆嚢癌は、性別では女性が男性より 3 倍多く、人種では黒人より白人に多く、地域では Chile, Mexico, India と Israel に発症率が高く、リスクファクターとして胆嚢結石があげられている。しかし肝外胆管癌にはこれらの性別、人種、地域及び病因的な特徴は見られない。こうした臨床像の違いから両者の発癌機構が異なることが考えられる。

ヒト発癌において細胞周期制御機構が重要な役割を果していることが明らかになってきた。p21^{WAF1/CIP1} はサイクリン依存性キナーゼインヒビターとして、細胞周期の進行を抑制し、癌抑制作用を持っている。ヒト癌における p21^{WAF1/CIP1} の遺伝子異常はほとんど見つけられていないが、p21^{WAF1/CIP1} 蛋白発現異常は多くのヒト癌に見られ、癌の発生、進行に関与することが分かってきた。p21^{WAF1/CIP1} 発現の調節には癌抑制遺伝子産物である p53 による転写レベルの誘導、即ち p53-dependent pathway および p53-independent pathway が存在している。本研究では、胆嚢癌及び肝外胆管癌における p21^{WAF1/CIP1} と p53 の発現を免疫組織化学的に検索し、p21^{WAF1/CIP1} 蛋白発現に p53 が関与するか、p21^{WAF1/CIP1}、p53 の発現異常と臨床病理学的諸因子及び予後との関連を検討した。

【対象と方法】

1. 対象

1) 肝外胆管癌

1990年10月より1998年3月までに東京大学附属病院肝胆膵外科にて手術を施行した肝外胆管癌症例34例を対象とした。男性21例、女性13例、年齢中間値は65歳(43歳-88歳)であった。臨床病理学的諸因子は胆道癌取扱い規約に従い検討した。TNM分類では、stage Iが2例、IIが6例、IIIが4例、IVが22例であった。追跡期間中間値は31か月(5-73か月)であった。

2) 胆嚢癌

1990年1月より1999年4月までに東京大学附属病院肝胆膵外科にて切除された胆嚢癌36症例(37腫瘍)、腺腫7病変とdysplasia 5病変を対象とした。胆嚢癌患者の性別では男性が17例、女性が19例で、年齢中間値は65歳(45歳-84歳)であった。TNM分類では、stage Iが11例、IIが11例、IIIが7例、IVが8例であった。追跡期間中間値は28か月(3-101か月)であった。

2. 免疫組織化学的方法

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックにより薄切切片を作成し、オートクレーブにて抗原賦活後、ABC法にて免疫染色を行った。1次抗体としてp21^{WAF1/CIP1}染色には抗p21^{WAF1/CIP1}モノクローナル抗体EA10を、p53染色には抗p53モノクローナル抗体DO-7を用いた。核が明瞭に褐色に染色された細胞を陽性と判定した。正常胆管/胆嚢上皮を生物学的controlとした。p21^{WAF1/CIP1}染色では染色された癌細胞が10%未満をp21^{WAF1/CIP1}-、10%から30%未満をp21^{WAF1/CIP1}+, 30%以上をp21^{WAF1/CIP1}++とした。p53染色では染色された癌細胞が10%未満をp53-, 10%以上をp53+とした。

3. 統計学的方法

p21^{WAF1/CIP1}、p53の蛋白発現と臨床病理学的諸因子との相関及びp21^{WAF1/CIP1}発現とp53発現との関連性を χ^2 検定とFisherの直接法にて判定した。生存率の有意差判定はKaplan-Meier法とlog rank testにて行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

1. 肝外胆管癌

1) p21^{WAF1/CIP1}の発現

正常胆管上皮は核染色率が12%-25%であり、p21^{WAF1/CIP1}++を示したことから、p21^{WAF1/CIP1}++を正常発現、p21^{WAF1/CIP1}-を低発現、p21^{WAF1/CIP1}++を過剰発現とした。肝外胆管癌34例において、核染色率が0%-95%であり、低発現が23例(68%)、正常発現が6例(18%)、過剰発現が5例(15%)であった。p21^{WAF1/CIP1}正常発現群と比べて、低発現群ではstage III/IVの症例が有意に高

率であった ($p = 0.007$, χ^2 検定; $p = 0.008$, Fisher の直接法)。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白の発現はほかの臨床病理学的因子 (年齢、性別、占居部位、組織型、リンパ管浸潤、静脈浸潤、神経浸潤) との間には相関が認められなかった。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白の発現と予後の関係をみると、低発現群、正常発現群、過剰発現群症例の5年累積生存率はそれぞれ57%、100%、20%であった。p21^{WAF1/CIP1} 低発現群と過剰発現群は正常発現群より無病生存期間が有意に短かった (p21^{WAF1/CIP1}- versus p21^{WAF1/CIP1}+, $p = 0.02$; p21^{WAF1/CIP1}++ versus p21^{WAF1/CIP1}+, $p = 0.01$)。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白発現異常 (低下/過剰) の PPV、NPV 及び accuracy はそれぞれ100%、69%、75%であった。

2) p53 の発現

p53 は正常胆管上皮には染まらなかった。肝外胆管癌 34 例中 17 例 (50%) において p53 の過剰発現 (p53+) が見られた。非静脈浸潤群より静脈浸潤群では p53 の過剰発現が有意に高頻度であった ($p = 0.001$, χ^2 検定; $p = 0.002$, Fisher の直接法)。ほかの臨床病理学的因子および予後との関連が認められなかった。

3) p21^{WAF1/CIP1} 発現と p53 発現との関連性

p21^{WAF1/CIP1} 発現と p53 発現には有意な相関は認められなかった。

2. 胆嚢癌

1) p21^{WAF1/CIP1} の発現

正常胆嚢上皮において核染色率は 11% - 25% であった。全ての正常胆嚢上皮は p21^{WAF1/CIP1}+ を示したことから、p21^{WAF1/CIP1}+ を正常発現とした。胆嚢癌、腺腫及び dysplasia において核染色率は 0% - 35% であった。胆嚢癌 37 腫瘍中 18 腫瘍 (49%)、腺腫 7 例中 3 例 (43%)、dysplasia 5 例中 5 例 (100%) において p21^{WAF1/CIP1} の発現低下が見られた。p21^{WAF1/CIP1} と TNM stage やほかの臨床病理学的諸因子との相関が認められなかった。根治切除の胆嚢癌症例の術後生存率を検討したところ、低発現群症例の5年累積生存率は39%、正常発現群症例の5年累積生存率は67%であった。全症例で検討すると両群の生存率に有意差は認められなかったが、進行胆嚢癌症例 (stages II, III, IV 症例) において、p21^{WAF1/CIP1} 低発現群は正常発現群より術後生存期間が短かった ($p = 0.03$)。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白発現低下の PPV、NPV 及び accuracy はそれぞれ70%、73%、71%であった。

2) p53 の発現

胆嚢癌 37 腫瘍中 21 腫瘍 (57%)、腺腫 7 例中 3 例 (43%)、dysplasia 5 例中 3 例 (60%) において p53 の過剰発現が認められた。p53 発現と臨床病理学的諸因子および予後との関連が認められなかった。

3) p21^{WAF1/CIP1} 発現と p53 発現との関連性

p53 発現と p21^{WAF1/CIP1} 発現との間に有意な相関が認められた ($p = 0.01$, χ^2 検定; $p = 0.02$, Fisher の直接法)。p21^{WAF1/CIP1}-腫瘍 18 例中 14 例 (78%) において p53+であり、p21^{WAF1/CIP1}+腫瘍 19 例中 12 例 (63%) において p53-であった。

【考察】

分子生物学の進歩により、多くの癌が複数の遺伝子異常の蓄積により多段階的に発生、進展することが分かってきた。肝外胆管癌における多段階発癌過程についての知見が乏しいのに対して、胆嚢癌では一般的に腺腫や dysplasia が前癌病変と考えられていることから、胆嚢癌症例に加え、腺腫と dysplasia の症例も検討した。これまで、多くの悪性腫瘍において、p21^{WAF1/CIP1} 蛋白の発現異常 (低下或いは過剰) が腫瘍の発生、進行に関与することが報告されてきたが、肝外胆管癌及び胆嚢癌については未だ検討されていないのが現状である。本研究では、肝外胆管癌において p21^{WAF1/CIP1} 正常発現症例と比べ、p21^{WAF1/CIP1} の発現低下のみならず発現過剰も腫瘍の進展に関与し、予後不良であった。p21^{WAF1/CIP1} 発現の調節に関しては、肝外胆管癌において、p21^{WAF1/CIP1} 発現と p53 発現との間に関連性が認められなく、p53-independent に誘導される可能性が示唆された。胆嚢癌においては、p21^{WAF1/CIP1} 発現と p53 発現との間に有意な相関が認められ、p21^{WAF1/CIP1} の発現が p53-dependent に誘導されることが示唆された。

【まとめ】

本研究は肝外胆管癌と胆嚢癌における p21^{WAF1/CIP1} 及び p53 の蛋白発現異常と腫瘍の臨床病理学的諸因子及び予後との関連を検討し、以下の結論を得た。

1) 肝外胆管癌において、p21^{WAF1/CIP1} 蛋白発現低下または過剰発現は腫瘍の進展および予後不良に関与し、臨床的に肝外胆管癌の予後因子として有用であると考えられた。

2) 胆嚢癌において、p21^{WAF1/CIP1} 発現低下と p53 発現過剰は胆嚢癌発生の早期段階に関与すると考えられ、p21^{WAF1/CIP1} 発現低下は進行胆嚢癌の予後不良に関与し、進行胆嚢癌の予後予測因子として有用であると考えられた。