

論文内容の要旨

論文題目

肺腺癌における p53 ファミリー遺伝子の臨床病理学的及び分子病理学的検討

指導教官 深山 正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 奈良橋 俊子

我が国の 1998 年の肺癌による死亡数は、全悪性腫瘍死の約 18%を占め、人口 10 万人に対する死亡率は、男性 60.2、女性 21.9 である。死亡率を 1950 年と 1998 年で比較すると増加の一途をたどり、2010 年には肺癌死亡数は 10 万人を越えると予想されている。また 1993 年からは肺癌は胃癌を抜き、男性の癌死亡率の第一位となり、女性では胃癌に次いで第二位となっている。肺癌の 5 年生存率は約 25-30%であり、他の癌腫に比し、明らかに予後不良である。

非小細胞肺癌は、全肺癌のうち 80~85%を占めている。非小細胞肺癌の特徴として、小細胞癌と比べると進行が遅く、化学療法や放射線療法に対する反応が不十分である。したがって、腫瘍が限局している時期では、外科的切除が第一選択となるが、治療成績は胃癌など他の癌腫に比べると大きく劣っており、生存率向上のためにもさらなる分子生物学的研究が期待されている。

p53 は、ヒト癌において最も高頻度(50%)に遺伝子変異が検出されている癌抑制遺伝子である。さらに臨床的にも、p53 の異常は癌の悪性度や予後に関わっており、p53 の機能を解明することは癌の診断、治療の上でも重要と考えられ研究されてきた。一方、長い間 p53 にはファミリーが知られていなかったが、1997 年から相次いで 2 つのファミリー遺伝子 p73, p63 が同定された。p73, p63 は p53 と構造的類似性は高いものの、ヒト癌における遺伝子変異の頻度は低く、生体内での役割は p53 とは異なることが予想されていた。p53 ファミリー遺伝子である p73, p63 は p53 と共に相互に補完しあい、状況により相反しつつ、total として cell apoptosis, cell survival を制御しているのではないかと想定されている。これらの相互関係を少しでも紐解ければ、診断だけでなく、ひいては化学療法など治療にも貢献し、予後の改善にも寄与できる可能性もある。そこで今回、癌抑制遺伝子の候補遺伝子である p73 と p63 の肺腺癌における臨床病理学的及び分子病理学的特徴を検索した。

p73 免疫組織化学的検索と予後

今日まで、肺癌における p73 遺伝子発現に関しては限られたデータしか得られていない。p73 の発現の変化が腫瘍の形成、進展に関係しているのか、あるいは臨床病理学的特徴や患者生存率と相関があるのかは未だわかっていない。この研究で、我々は 95 例の肺腺癌の p73 の発現を免疫組織学的に分析し、様々な臨床病理学的指標と結果を関連づけることによりこの問題を明らかにしようと試みた。

1977-1990 年の間に東京都立駒込病院にて切除された 95 例の原発性肺腺癌（直径 3cm 以下）を検索した。患者は男女比 56:39、年齢 32-89 歳（平均年齢 60.3 歳）であった。観察期間は 1-162 ヶ月で、平均観察期間は 65.8 ヶ月であった。Stage I 48 例（Stage IA 27 例, Stage IB 21 例）、Stage II 7 例（Stage IIA 1 例, Stage IIB 6 例）、Stage III 39 例（Stage IIIA 24 例, Stage IIIB 15 例）、Stage IV 1 例であった。

始めに 3 つの市販されている抗体の性能を比較した。Neomarkers の抗体を使用すると最も良い結果が得られた。しかし、このモノクローナル抗体は 3 つの異なるクローンの混合物であり、一部に共染も見られたのでそれぞれの 3 つのクローン(ER-13, ER-15, GC-15)について試すと、クローン GC-15 は背景の染色が最も少なく、最も良い染色結果を得られることがわかり、これを選択し、免疫組織化学的検索を行った。

免疫組織化学的検索により 95 例中 63 例(66.3%) において p73 の発現は陽性であり p73 陽性例は有意に予後良好であった。特に高齢者群において、著明に予後が良好であった。統計学的にも p73 は有意な予後良好因子であることがわかった。

p73 免疫組織化学的解析と LOH, methylation analysis の相関

肺腺癌における p73 の LOH, ならびにプロモーター領域の異常メチル化を検討し、各種臨床因子との関連を調べ、肺腺癌における p73 の不活化のメカニズムを明らかにするために、我々は p73 免疫組織化学的解析と LOH, methylation analysis の相関を検索することとした

1999-2003 年の間に東京大学医学部付属病院呼吸器外科にて切除された症例のうち原発性肺腺癌 43 例（直径 1.1-11cm, 平均 3.7cm）を無作為に抽出し、検索した。患者は男女比 32:11、年齢 38-81 歳（平均年齢 62.7 歳）であった。Stage I 26 例（Stage IA 10 例, Stage IB 16 例）、Stage II 4 例（Stage IIA 1 例, Stage IIB 3 例）、Stage III 13 例（Stage IIIA 7 例, Stage IIIB 6 例）、Stage IV 0 例であった。

レーザーマイクロダイセクション顕微鏡(Leica Microsystems, Japan) を使用して細胞を収集し DNA 抽出を施行した。

LOH を評価するために、p73 と共に染色体 1p36 に位置し、p73 の遠位にある D1S243, 近位にある D1S468 という 2 つのマイクロサテライトマーカーを選択し、検索した。

対象症例 43 例のうち LOH 検索で informative であった症例と肺非小細胞癌 14 細胞株、その他 3 細胞株についても Methylation Specific Polymerase Chain Reaction を検索した。

培養細胞(NHBE, SAEC, HaCat), 肺非小細胞癌 11 細胞株, p73 α transfected-H1299, p73

β transfected-H1299, 肺小細胞癌細胞株 Lu130, 乳癌細胞株 MCF-7 からの全抽出物を記載に準じて Western blotting 用に調整し, これを用い施行した.

p73 とその近傍のマイクロサテライトマーカーに高率に LOH を認めた. また MSP によりプロモーターのメチル化を有する症例は検出できなかった. p73 免疫組織化学的検索では 43 例中 22 例(51.1%)が陽性を示した. p73 免疫反応性は年齢 (65 歳以上, 65 歳未満) ($P=0.0480$), 組織学的分化度($P=0.0028$), 腫瘍径($P=0.0035$)と相関を示した. また, 65 歳以上症例群では, 病理学的ステージ($P=0.0122$), 腫瘍径($P=0.0022$)ともそれぞれ相関を示した. さらに, 高齢者群では, 組織学的分化度に依存して p73 の発現が失われやすい傾向が見られた. Western blotting の結果, p73 α , p73 β を transfection した H1299 と共に培養細胞 HaCat, SAEC, 肺小細胞癌細胞株 Lu130 で p73 の発現を認めた.

p63 免疫組織化学的解析と予後

これまでのところ初期の肺腺癌において, 免疫反応性に関する臨床病理学的相関や予後的意義のデータで広く受け入れられているものはない. 今回の研究で, 我々は 95 例の肺腺癌を p63 の発現で免疫組織学的にこの問題を分析し, その結果を様々な臨床病理学的因子と関連づけることでこの問題を明らかにしようと試みた.

対象は第二章と同一であり, 免疫組織化学的染色には既知の 6 isoform を認識する抗ヒト p63 蛋白マウスモノクローナル抗体(4A4, Santa Cruz, USA)を用いた.

培養細胞(NHBE, SAEC, HaCat), 肺非小細胞癌 11 細胞株, 乳癌細胞株からの全抽出物を p73 と同様に Western blotting 用に調整し, 施行した. HLC-1, H1648 に関しては核と細胞質の分離し, 核, 細胞質それぞれを western blotting に用いた.

免疫組織学的検索の結果, 92 例中 46 例(50%)で核に陽性であった. また細胞質に p63 が発現している症例が 92 例中 47 例(51%)あった. p63 細胞質陽性例は有意に予後不良であった. 統計学的にも p63 は有意な予後不良因子であることがわかった. p63 核・細胞質陽性例はそれ以外の症例に比し有意に予後不良であり, しかも著明であった. Western blotting により, 細胞質に p63 が発現していることが証明された.

肺腺癌において p73 は癌抑制遺伝子として p63 は癌遺伝子として機能していることが示唆される. p73, p63 それぞれの核における発現は, p53 の発現と有意に相関を示しており, また機序は不明であるが p63 が核・細胞質共に陽性を示す例では著明に予後不良であることを考慮すると, p53 ファミリー遺伝子間の複雑な相互関係の一端を覗いていると考えられる. 蛋白や mRNA レベルでの発現, 遺伝子増幅の有無など, さらなる分子病理学的検索により, 遺伝子相互間の関係の探索が必要である.