

氏名 (本籍)	高橋 英二 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1193 号
学位授与日付	平成 11 年 3 月 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	耳下腺癌のp53, RB遺伝子の検討 —免疫組織化学法を用いて—
審査委員	(主査) 教授 宮田 英雄 (副査) 教授 佐治 重豊 教授 高見 剛

論文内容の要旨

p53遺伝子は癌抑制遺伝子であることが明らかとなり、癌研究の分野で急速に注目されるようになった。これまでに発見された遺伝子の中で最も頻度の高い遺伝子異常を示すことが知られている。p53遺伝子は細胞周期の調整に関係していると推測されており、この遺伝子の正常の機能が失われた時に細胞が癌化すると考えられている。

RB遺伝子は、RB遺伝子の不活化が網膜芽細胞腫 (retinoblastoma) における細胞癌化につながる。RB遺伝子産物 (RB蛋白質) が細胞周期進行、特にG1期からS期 (DNA複製期) 移行の抑制に極めて重要な役割を果たしている。RB遺伝子の不活化は網膜芽細胞腫だけでなく、肺小細胞癌、膀胱癌などにもみられる。

頭頸部領域でも悪性腫瘍の発生やその進展に関係する遺伝子の解析が進んでいる。しかし、唾液腺癌については、その発生頻度が低く、症例数が大変少ないので十分な解析がなされていないため唾液腺癌の発生については不明な点が多い。唾液腺癌の発癌機構に関連する癌遺伝子ならびに癌抑制遺伝子の異常を検討することは有用であると思われる。

細胞の増殖能はその細胞の悪性度と深く関係し、悪性度が高いほど腫瘍細胞増殖能が高いといわれている。耳下腺癌を含む唾液腺癌において癌抑制遺伝子RB遺伝子の異常との関連を述べた報告は無い。また、唾液腺癌は多様な組織型があり、組織型により悪性度が異なる。そこで、本研究は唾液腺の特に耳下腺癌において癌抑制遺伝子であるp53, RB遺伝子産物 (蛋白) の異常を比較検討し、耳下腺の癌化における2つの癌抑制遺伝子の関与及び悪性度による癌抑制遺伝子産物 (蛋白) の発現について検討した。

研究対象および方法

1. 対象

1989年1月から1998年9月までに岐阜大学病院耳鼻咽喉科において入院加療を行った耳下腺悪性腫瘍症例13例 (男性11例, 女性2例) で、年齢は17歳~75歳 (平均年齢は59歳) である。病理組織型の内訳は腺癌6例, 粘表皮癌4例, 多形腺腫肉癌1例, 唾液腺管癌1例, 腺房細胞癌1例である。Ishiiらの分類に従い、組織型により生物学的悪性度を高悪性群 (腺癌, 多形腺腫肉癌, 唾液腺管癌) と低悪性群 (粘表皮癌, 腺房細胞癌) に分けた。

2. 方法

対象組織を10%中性ホルマリンに固定後、パラフィン包埋検体とした。このパラフィン包埋検体から5 μ mの病理組織標本を作成し、以下の検索を行った。

1) p53遺伝子産物 (蛋白) の免疫組織染色

一次抗体として抗p53モノクローナル抗体 (Dako, Do-7) を用いてABC (avidin-biotin-peroxidase complex) 法に従い、染色した。DAB (diaminobenzidine, 3, 3'シアミノベンチジン) 反応を行い、発色させた後、ヘマトキシリン核染を行い、脱水、透徹、封入を行った。

2) RB遺伝子産物 (蛋白) の免疫組織染色

一次抗体として抗RBモノクローナル抗体 (MBL, MK-15-1, 3H9) を用いてABC (avidin-biotin-peroxidase complex) 法に従い、染色した。DAB (diaminobenzidine, 3, 3'ジアミノベンチジン) 反応を行い、発色させた後、ヘマトキシリン核染を行い、脱水、透徹、封入を行った。

3) 判定

染色が完了した標本を200倍で検鏡し、染色度の判定を行った。p53, RB共に核が褐色に染色されたものを染色細胞とした。positive controlは標本上のリンパ球の染色されたものとした。negative controlは一次抗体の代わりにPBSbufferを使用したものとした。判定はp53については、顕微鏡下に任意の視野で腫瘍細胞を1000個観察し、染色細胞が10%未満を (-), 10%以上50%未満を (+), 50%以上を (++) とした。RBについては

Xuらの判定方法に従い、腫瘍細胞に対する染色細胞の割合が0%を(-)、50%未満を(+), 50%以上を(++)
とした。尚、各項目の有意差の判定は χ^2 検定 (Fisher's exact test) により検討し、危険率 $p < 0.05$ をもって有意とした。

研究結果

耳下腺癌13例中p53蛋白の発現を認めた症例は8例 (62%), 発現を認めなかった症例は5例 (38%) であった。p53蛋白の発現を認めた症例は高悪性群では8例中7例 (88%), 低悪性群ではp53蛋白の発現を認めた症例は5例中1例 (20%) で、両群間で有意な差 ($p=0.03$) を認めた。

RB蛋白の発現症例は耳下腺癌13例中7例 (54%), 発現を認めなかった症例は13例中6例 (46%) であった。RB蛋白の発現を認めた症例は高悪性群においては8例中3例 (38%), 低悪性群で5例中4例 (80%) で、両群間で有意な差 ($p=0.27$) を認めなかった。

考察

免疫組織染色ではp53蛋白が不活化ないし変異型p53蛋白が染色され、野生型p53蛋白は染色されない。一方、RB蛋白は野生型RB蛋白が染色され、不活化ないし変異型RB蛋白は染色されないと考えられている。

p53遺伝子の生物学的機能として、①G1期での進行を抑制する。②DNA障害後のアポトーシスを誘導する。③腫瘍細胞の増殖を抑制する。④遺伝子安定性を確保する、が考えられている。形質転換能をもつp53遺伝子は変異型である。正常の野生型のp53遺伝子は細胞増殖に対して抑制的に機能する。遺伝子発現を反映するp53蛋白は野生型は量が少なく半減期が数分から数十分と短い、変異型は細胞中の熱ショック蛋白と結合し、安定しているため量が多く半減期が長い、核内に異常に蓄積する。また、変異型p53はDNA構造の変異により、野生型p53に対して強く結合するため、野生型p53の機能を不活化させ、癌抑制遺伝子としての機能を失わせ癌化に導くと考えられている。今回用いたモノクローナル抗体Do-7は野生型、変異型の両者を認識するが、実際の免疫染色上では野生型のp53蛋白の発現は認識されず、変異型p53蛋白の異常蓄積を反映することによりp53遺伝子の変異を推定することができる。現在まで肺癌、乳癌の他多くの腫瘍において変異型p53蛋白の発現が報告されており、その発現率と組織学的異形度や予後との相関があったとされている。今回の検討では、耳下腺癌におけるp53蛋白の発現は62%であった。p53蛋白の各臓器における免疫組織学的発現は乳癌で24.8%、胃癌で57%、大腸癌で60.7%の報告があり、他臓器と比しやや高率であった。p53蛋白は以上のように細胞周期に関連する蛋白であるが、その異常発現と腫瘍の組織学的悪性度との関連についてはほとんど解明されていない。また、悪性度によりp53蛋白の発現に有意な差を認め、高悪性群ほどp53蛋白の発現が多く、悪性度とp53蛋白の発現に関連があることが示唆された。p53は耳下腺悪性腫瘍における生物学的悪性度を客観的に把握できる有用な指標と考えられる。

RB蛋白の不活化にはリン酸化が関与しており、このリン酸化により細胞周期が制御されているとしている。細胞でのRB蛋白の発現の低下はG0/G1期で著明であると述べている。小川らはRB蛋白発現の低下は細胞周期レベルでのRB蛋白の不活化を意味し、その結果臨床的な悪性度の増加をきたしている可能性があるとして述べている。今回の検討においてRB蛋白陰性例は46%であった。甲状腺分化癌ではRB蛋白陰性例は13%との報告があり、それより高率であった。また、高悪性群と低悪性群でRB蛋白発現の比較を行ったが、両群間に明らかな有意差は認めなかった。耳下腺の悪性度にはRB蛋白のリン酸化が関与していない可能性が示唆された。なお、RBはp53に比し生物学的悪性度を客観的に判断する指標と考えるには、さらなる検討が必要と思われる。

p53蛋白陽性で、RB蛋白陰性例が高悪性群で5例に認められ、低悪性群では1例に認められた。このような症例では両遺伝子の生物学的機能より、変異型p53の発現時にはRB蛋白はリン酸化が進み、細胞周期が進行することにより、細胞周期制御機構の破綻を来している可能性が高いと考えられる。

今回の免疫組織染色による検討では、p53蛋白、RB蛋白の不活化が遺伝子のどのレベルで生じたかは言及できない。耳下腺癌を含む唾液腺癌は発生頻度が少ないが、今後はPCR法を用いた分子レベルでの解析をする必要がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 高橋英二は、耳下腺癌の癌化におけるp53、RB遺伝子の関与を免疫組織化学法を用い検討した。その結果、p53は耳下腺癌の生物学的悪性度を把握する有用な指標であること、耳下腺癌の悪性度にはRB蛋白のリン酸化が関与していない可能性を示唆した。これらの知見は、耳下腺の分子腫瘍学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

耳下腺癌のp53、RB遺伝子の検討

—免疫組織化学法を用いて—

平成11年4月発刊予定 耳鼻臨床