

論文要旨

Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression.

(食道癌、胃癌における腫瘍内での P53 変異の分布と P53 発現の比較)

花園 幸一

【目的】

食道癌、胃癌を含めて多くの癌腫で癌抑制遺伝子の変異が見られるが、なかでも p53 遺伝子変異の関与が大きいことは良く知られている。また、発癌においても P53 遺伝子変異は重要な因子である。癌細胞の p53 変異を調べることやこの変異が腫瘍全体にみられるか検討することは腫瘍の悪性度の解析や治療の選択に関して重要である。

p53 の変異は通常エクソン 5-8 でみられている。DHPLC (denaturing high pressure liquid chromatography) は比較的最近の技術であり、遺伝子変異を検出するのに有用である。p53 についても野生型と変異型を識別することができ、変異型の sequence の決定が可能である。

本研究の目的は同一腫瘍の数ヶ所からサンプリングを行い、各部分の p53 変異の異同に関して DHPLC を用いて DNA sequence を解析することである。さらに免疫組織学的に p53 蛋白の発現を調べ、これらの変異の関係を検討することである。

【対象・方法】

- 1) 腫瘍組織の採取：1999年9月～2000年1月までの間にミュンヘン工科大学付属病院で切除された噴門部癌8例と胃癌9例から採取した。9例は腸型、5例はびまん型、残りの3例は混合型であった。TNM分類によるStageはIA, IB, II, IIIA, IIIB, IVが各々3, 3, 2, 1, 6例であった。
- 2) DNA抽出：切除標本の腫瘍中心部と辺縁部および正常組織を、それぞれHE染色されたスライドから選び、パラフィン固定された組織からDNAを抽出した。転移が認められた症例は、転移リンパ節の腫瘍組織からもDNAを抽出した。
- 3) P53変異の検索：遺伝子変異の頻度が高い、エクソン5, 6, 7, 8で検索した。それぞれのエクソンに関してPCRを用いて増幅した。エクソン5とエクソン8はアニーリングを3種類の温度で行い、PCR産物を3検体作成した。エクソン6とエクソン7は1種類の温度で行い、それぞれPCR産物を3検体作成した。Denaturing High Pressure Liquid Chromatography analysis (以下、DHPLC) を使用して変異の有無を検索した。

- 4) 塩基配列の決定：検出された変異はすべて DNA sequence を施行し、塩基配列を確認した。
- 5) 免疫染色：変異を認めた症例の全切片で p53 の免疫染色を施行し、10%以上の染色を陽性と判断した。DHPLCによる p53 変異の結果と比較した。

【結果】

- 1) DHPLC：p53 変異は7例21病変に認められた。エクソン5の変異は2例、エクソン6の変異は2例、エクソン7, 8は各々1例に変異が認められた。1例はエクソン6と7に変異がみられた。正常組織には p53 の変異は認められなかった。また、p53 変異は噴門部腺癌の37.5% (3例) と胃癌の44.4% (4例) で認められた。9個の転移リンパ節でも検索した結果、2個で変異が認められ、原発巣と塩基配列は一致していた。なお、10例ではどのサンプルにも変異は認められなかった。
- 2) DNA sequencing：p53 の変異が認められた全例で、数ヶ所から得られたサンプルの塩基配列の変化は同じであった。エクソン6に変異を認めた2例では正常組織に塩基配列の変化が認められた。これはコドン213にみられ多形成と考えられた。DHPLCで変異がなかった2例ではDNA sequencingにも変異は認められなかった。
- 3) 免疫染色：p53 変異を認めた7症例中、4症例で p53 蛋白の発現が認められ、各々のリンパ節転移巣にも発現が見られたが、正常組織は陰性であった。残る3例では p53 蛋白の発現は陰性であった。これらの結果から p53 変異と蛋白の発現には相関は認められなかった。

【考察】

p53 の遺伝子変異は腫瘍の悪性度に関与している。バレット食道では、癌発生の早期に p53 遺伝子変異が起こっている。免疫染色で p53 発現例は、無発現例より予後不良である。また、p53 遺伝子変異例も、無変異例より5年生存率は不良と報告されている。文献上、p53 遺伝子変異を伴う症例は、若年者、進行例、予後不良例に認められている。

p53 変異と蛋白の発現が相関した報告がみられるが、本研究では明らかな関係はみられなかった。p53 変異は蛋白の発現より腫瘍悪性度の予測因子として重要と考えられる。今回の研究結果では腫瘍組織の様々な部分で、p53 遺伝子の変異は同一であった。以上より、腫瘍の中心、辺縁にかかわらず、すべての腫瘍組織で同時に、同じ変異を生じていると考えられた。したがって、内視鏡生検組織から得られる p53 の変異の情報から腫瘍全体の悪性度を把握でき、個々の症例に応じた治療戦略の決定に寄与できると考えられた。

(Oncology reports. Volume 15, number 4, 821-824, April, 2006 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論 第1427号	氏名	花園 幸一
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	栄鶴 義人	出雲 周二

Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression.

(食道癌, 胃癌における腫瘍内でのp53変異の分布とp53発現の比較)

食道腺癌(噴門部癌)や胃癌など多くの癌腫で癌抑制遺伝子の変異が見られるが, なかでもp53遺伝子変異の関与が大きいことはよく知られている. また, 発癌においてもp53遺伝子変異は重要な因子である. 癌細胞のp53遺伝子変異を調べることやこの変異が腫瘍全体にみられるか検討することは腫瘍の悪性度の解析や治療の選択に関して重要である. DHPLC (denaturing high pressure liquid chromatography) は, 遺伝子変異解析の目的で開発された技術であり, 変異を検出するのに有用である.

本研究において学位申請者らは, 食道腺癌(噴門部癌) 8例と胃癌 9例を用いて, 同一腫瘍から数カ所, および正常組織から DNA を抽出し, DHPLC 法を使用して, 遺伝子変異の頻度が高い, エクソン 5, 6, 7, 8 で p53 遺伝子変異を検索した. 転移が認められた症例は, 転移リンパ節の腫瘍組織からも DNA を抽出し検索した. 検出された変異はすべて DNA sequence を施行し塩基配列を解析した. 変異を認めた症例の全切片で p53 の免疫染色を施行し免疫組織学的に p53 蛋白の発現を調べ, これらの変異との関係を検討した.

その結果, 本研究で以下の興味ある知見が明らかにされた.

- 1) DHPLC 法: p53 変異は噴門部癌の 37.5% (3例) と胃癌の 44.4% (4例) に認められ, エクソン 5 が 2例, エクソン 6 が 2例, エクソン 7 とエクソン 8 が各 1例であった. 正常組織では変異は見られず, 転移リンパ節でも 2例で指摘され, 腫瘍部と変異は一致していた.
- 2) DNA sequencing: p53 の変異が認められた全例で, 同一腫瘍の数ヶ所から得られたサンプルの塩基配列の変化は同じであった.
- 3) 免疫染色: p53 遺伝子変異を認めた 7 症例中, 4 症例で p53 蛋白の発現が認められたが 3 例は陰性であった. これらの結果から p53 変異と蛋白の発現には相関は認められなかった.

本研究では腫瘍組織の様々な部分で, 腫瘍の中心, 辺縁にかかわらず, p53 遺伝子の変異は同一であった. 主病巣と転移リンパ節でも変異に差は見られず, 腫瘍組織内では同一性を保っていると考えられた. したがって一切片の腫瘍組織は, その腫瘍の遺伝子的特徴を表現していると考えられた. 以上の事より, 内視鏡生検組織から得られる p53 の変異の情報から腫瘍全体の悪性度の把握が可能であり, 個々の症例に応じた治療戦略の決定に寄与できると考えられた.

以上のごとく, 本研究は食道腺癌(噴門部癌)や胃癌において, 転移リンパ節を含めた腫瘍内における p53 遺伝子変異の同一性を証明し, 一片の腫瘍組織から腫瘍の悪性度を評価できる可能性を示した. 本研究結果は, 内視鏡検査による生検からの治療効果予測, および治療法の選択など, p53 遺伝子変異の臨床的応用をさらに推し進めるものと考えられる. よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した.

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論 第1427号	氏名	花園 幸一
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	栄鶴 義人	出雲 周二

主査および副査の3名は、平成18年6月7日、学位申請者 花園幸一 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下の様な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- (1) 腫瘍のLauren分類の臨床的な意義は？
 - 欧米で用いられている組織型分類は、intestinal type, diffuse typeの二分法である。日本では分化型、未分化型の分類に相当する。intestinal typeは腸管形成の良好な癌で膨張性の発育を呈し、境界明瞭な限局型が多いが、diffuse typeは腸管形成に乏しくびまん性に浸潤し肉眼的に境界が不明瞭である。また、リンパ行性転移や腹膜播種が見られ、diffuse typeのほうが予後は不良であり、臨床所見を補助する分類の一つである。
- (2) 本研究では、Stage I, IIで遺伝子変異が高頻度に認められているが、p53変異が予後因子になるのであれば、Stage I, IIで遺伝子変異は少ないのではないか？癌の進行度との関連は？
 - 今回は17例しか検索していないので、進行度との関連は言えないが、症例が増えたら本研究でも他の文献と同様に進行度との関連性がでてくると思われる。
- (3) 遺伝子変異の検出結果は、ヘテロで1つの変異があれば検出しているのか？ホモで検出しているものはあったのか？
 - 本研究で使用したDHPLCは、PCR増幅した正常型、変異型DNAを混合させて2本鎖DNAを電気泳動させて塩基置換の有無を検出する方法であるので、ヘテロで変異があれば検出可能である。ただし、同じ変異型を持つDNAのみが存在する場合は、正常型DNAが存在する場合と同じになり、塩基置換は検出されない。
- (4) 悪性度との関連はどうか？先天的に変異があった場合、どのような臨床所見を示すのか？
 - 発現している症例は、発現していない症例に比べて予後が悪い報告例が多い。先天的な変異の例として、Li-Fraumeni症候群があり、若年性乳癌、軟部腫瘍、骨肉腫、脳腫瘍、副腎皮質癌などを多発し、しばしば重複癌も発生する。
- (5) 予後不良との関連性と、今回のデータとはつながらないのでは？
 - 今回は17例しか調査していないので、症例が増えたら本研究でも予後不良と関連性がでてくると思われる。
- (6) 免疫染色の判定基準について、10%以上染色された症例を陽性例とした根拠は？
 - 研究を行った施設（ミュンヘン工科大学付属病院病理部）の判定基準に準じて陽性例とした。10%以上を陽性例とする検討は今回行っていない。
- (7) p53の抗体の認識は、変異を起こしたのか？変異を起こしていないものを認識していないか？
 - 野生型p53は速やかに代謝され核内に蓄積されない。したがって、免疫染色で発現しているのは、変異型p53である。

- (8) ある特定のエクソンの変異と予後との関連の報告はあるのか？
→今回検索したエクソン5からエクソン8までで、そのような報告例は今のところされていない。
- (9) DHPLCで、エクソン5とエクソン8で3種類の温度設定がされているが、その意義は？
→大腸癌の培養細胞での基礎実験で、1種類の温度だと検出されない症例があったため、そのように設定した。
- (10) 各温度間で検出される相違は？
→2つの温度で検出される症例もあれば、1温度のみで検出される症例もあった。より確実に変異を検出されるため、3種類の温度設定をした。
- (11) それらは変異の場所によって異なるのか？
→関連性は薄いと思われるが、症例数を増やして検討する必要性はあると思われる。
- (12) DHPLCは変異のシーケンスを見ているのではないか？
→あくまでp53遺伝子の各エクソンにおける変異を検出するのが目的で、塩基配列の確認にはシーケンスが必要である。
- (13) DHPLCの感度はどれ位変異があれば検出できるのか？
→塩基置換を伴うDNA含有量が10%程度でも検出が可能である。感度は80%以上と報告されている。
- (14) p53遺伝子変異とタンパク発現とは関連性がないのか？
→正常型のp53は不安定であり、通常は免疫染色で検出されない。報告例でも、遺伝子変異を認めた症例はタンパク発現を認めており、関連性があるものとする。
- (15) 症例12において、変異はあるがアミノ酸の変化はなく、免疫染色でも発現は見られない。タンパク自体は変わらないのに、免疫染色で陰性の理由は？
→塩基配列の置換は認められたが、アミノ酸が変化していないので、正常のp53として振る舞っている可能性がある。そのため、免疫染色が陰性となったと考察した。
- (16) mRNAの安定性が変化する可能性は？また、免疫染色で、変異例が陰性となった理由はどのように考えられるか？
→可能性がある、と考えている。今後の課題としている。免疫染色の陰性例は、今後さらなる症例の蓄積、データの解析が必要である。
- (17)) 症例9のエクソン6での塩基配列の変化はvariantかmutationか？
→variantと考えているが、mutationの可能性も否定できない。
- (18) 欧米で食道腺癌（噴門部癌）が増加している理由は？
→食道腺癌（噴門部癌）はBarrett食道からの発生率が高く、食生活、肥満等による胃食道逆流症、胆汁酸の逆流からBarrett食道が増加しているため、と考えられている。
- (19) 日本での現状は？
→日本では食道癌の組織型の95%以上が扁平上皮癌であり、腺癌が増加している報告は無い。Barrett食道の大多数を白人男性が占めておりアジア系の人種ではまれであるが、生活様式の欧米化、胃食道逆流症の増加から、Barrett食道、Barrett食道癌（噴門部癌）の増加が予想されている。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。