

## 膵管癌の上皮内癌部における p53 遺伝子変異の検討

p53 Gene Mutation in Carcinoma in Situ of Pancreatic Adenocarcinomas

### 学位論文内容の要旨

#### 【背景と目的】

膵管癌は、予後の悪い癌として知られている。症状出現時には、手術不能であることが多く、たとえ手術が可能であったとしてもその5年生存率は5%未満と報告されている。長期生存に寄与する最善の方法は、早期発見による癌組織の外科的完全切除と考えられるが、症状が出現する前に発見することはきわめて困難である。膵管癌の発癌機序の解明から、早期発見に役立つ手がかりが得られる可能性がある。

癌遺伝子である K-ras の変異は、膵管癌において高頻度に認められることは、以前より知られている。癌抑制遺伝子である p53 遺伝子の変異の頻度は 38.4 % から 76 % という報告まで様々である。これらの報告のなかで膵管癌の浸潤癌部については詳細に報告されているが、浸潤癌にいたる前癌病変については、十分に検討されていない。膵管癌においても他臓器癌と同様に多段階的に発癌にいたると考えられており、過形成から、異型性を伴った過形成、上皮内癌 (carcinoma in situ, CIS) を経て浸潤癌にいたるとされている。先にも述べたように p53 遺伝子変異については浸潤癌では検討されているが、上皮内癌部における p53 遺伝子変異については十分に検討されていない。この研究の目的は、膵管癌の上皮内癌部の p53 遺伝子変異を検討することである。

#### 【方法と結果】

対象は 21 症例で、男性 10 症例と女性 11 症例であり、平均年齢が 66.0 歳 (34-84 歳) であった。外科切除膵管癌を対象とし、ホルマリン固定、パラフィン包埋された標本を用いて検討した。Hematoxylin-eosin (HE) 染色にて、上皮内癌部を認め、浸潤癌部が近接している切片を選択した。これらの症例は、1976 年から 1998 年まで新潟大学医学部第一病理学教室において通常型 (solid type) の膵管癌と診断された症例から選ばれた。p53 に対するモノクローナル抗体 Pab 1801 を用いて p53 免疫染色を行った後、microdissection 法により DNA を抽出し、PCR-SSCP 法を用いて exon5 から exon8 までの p53 遺伝子変異を検索した。

上皮内癌部で p53 蛋白の過剰発現を認めたのは、21 症例中 7 症例 (33.3%) であり、浸潤癌部で p53 蛋白の過剰発現を認めたのは 21 症例中 10 症例 (47.6%) であった。上皮内癌部での陽性例は、浸潤癌部でもすべて陽性を示した。

p53 遺伝子異常は、21 例中 6 例 (28.6%) に認められた。このうち p53 蛋白の過剰発現を認めた 7 例中 4 例 (57.1%) に p53 遺伝子異常を認めた。P53 蛋白の過剰発

現を認めなかった 14 症例中 2 症例 (14.2%) に p53 遺伝子異常を認めた。

上皮内癌部と浸潤癌部で共に p53 蛋白の過剰発現を認め、上皮内癌部に p53 遺伝子異常を認めた症例において、DNA シークエンスを行ったところ、3 カ所の上皮内癌部のうちの 1 カ所でのみ遺伝子異常が明らかとなった。

#### 【考案】

今回の検討で、上皮内癌部において、p53 蛋白発現と遺伝子異常が合致した例が 21 例中 16 例に認められた。蛋白陽性、遺伝子異常を認めた 4 例は、変異型 p53 となり、p53 蛋白を分解に導く MDM2 の誘導が行われなため、p53 が核内に蓄積し、免疫染色により検出されたものと考えられた。p53 蛋白の過剰発現をのみを認め、遺伝子異常を認めなかった 3 例は、その原因として、野生型 p53 蛋白が蓄積した、免疫染色と実際に microdissection を行った部位とは、切片上異なるため、正確にその性状を反映していなかった、遺伝子検索をした他の部位に変異があった、ことなどが考えられた。蛋白の発現がなく、遺伝子異常を認めた 2 例は、蛋白構造を維持できないフレームシフト変異などの変異をきたしているものと考えられた。

p53 遺伝子異常を検索するのに、免疫染色法と microdissection により抽出した DNA を用いて、PCR-SSCP 法により検索した。免疫染色法は、簡便で迅速な方法であるが、抗体として p53 モノクロナール抗体 Pab 1801 を用いた場合、蓄積した蛋白が野生型か変異型かはその判別は不可能である。また、フレームシフト変異などの変異をきたし、蛋白の構造の変異をきたした場合も検出することができない。しかし、PCR-SSCP 法のみでの検索では、他の部位も含めた検討も必要となる場合があり、相補的に用いるのが有用であると考えられた。

DNA シークエンスを施行した症例は、上皮内癌部では、p53 免疫染色において、び慢性の過剰発現を示し同等の染色態度を示していたが、実際に遺伝子変異を検索してみたところ、p53 遺伝子異常を指摘できたのは、3 カ所の上皮内癌部のうちの 1 カ所のみであった。同一腫瘍内で染色態度が同じであっても、実際に遺伝子変異を検索してみると heterogeneity が認められた。蛋白蓄積が認められても、野生型で蓄積する場合と変異型で蓄積する場合があると考えられた。

今回の検討から、ある症例においては早期の段階 (CIS) から p53 遺伝子変異が一部に起こり、癌化に関与する場合があることが判明した。P53 遺伝子変異をきたした膵管癌は予後が悪いという報告があるが、上皮内癌の段階で p53 遺伝子変異をきたした場合、悪性度が高く、容易に浸潤癌に移行する可能性も考えられた。

#### 【結論】

膵管癌の上皮内癌部における p53 遺伝子異常を検討した。p53 遺伝子変異が早期の段階から、膵管癌の癌化に関与する場合があることが示された。

p53 遺伝子変異は、免疫染色法、PCR-SSCP 法の両法を用いて検索する必要がある。膵管癌の癌化に際し、上皮内癌の一部に早期の段階 (CIS) から p53 遺伝子異常が関与している場合があり、上皮内癌間には悪性度の差異が存在することが明らかにできる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## 膵管癌の上皮内癌部における p53 遺伝子変異の検討

p53 Gene Mutation in Carcinoma in Situ of Pancreatic Adenocarcinomas

膵管癌は、悪性腫瘍の中でも予後の悪い癌として知られている。長期生存に寄与する最善の方法は、早期発見による癌組織の外科的完全切除と考えられるが、症状が出現する前に発見することはきわめて困難である。膵管癌の発癌機序の解明から、早期発見に役立つ手がかりが得られる可能性がある。

膵管癌は、病理組織学的な研究より、過形成から異型性を伴った過形成、上皮内癌 (carcinoma in situ, CIS)、浸潤癌にいたると考えられている。癌抑制遺伝子である p53 遺伝子の変異については、浸潤癌では詳細に検討されているが、浸潤癌にいたる上皮内癌については、十分に検討されていない。この研究の目的は、膵管癌の上皮内癌部の p53 遺伝子変異を検討することである。

対象は、男性 10 例と女性 11 例の外科切除膵管癌 21 例であり、平均年齢が 66.0 歳 (34-84 歳) であった。ホルマリン固定、パラフィン包埋された標本を用いて検討した。上皮内癌部を含む切片を選択し、p53 モノクローナル抗体 Pab 1801 を用いて p53 免疫染色を行った後、microdissection 法により上皮内癌部の DNA を抽出し、PCR-SSCP 法を用いて exon5 から exon8 までの p53 遺伝子変異を検索した。

p53 免疫染色陽性であったのは、上皮内癌部で 21 例中 7 例 (33.3%) であり、浸潤癌部では 21 例中 10 例 (47.6%) であった。上皮内癌部での陽性例は、浸潤癌部でもすべて陽性を示した。

p53 遺伝子変異は、21 例中 6 例 (28.6%) に認められた。免疫染色陽性であった 7 例中 4 例 (57.1%) に、免疫染色陰性であった 14 例中 2 例 (14.2%) に p53 遺伝子変異を認めた。

蛋白陽性、遺伝子異常を認めた 4 例は、変異型 p53 蛋白が蓄積し、免疫染色により検出されたものと考えられた。蛋白の発現がなく遺伝子異常を認めた 2 例は、フレームシフト変異などの蛋白構造を維持できない変異をきたしたため抗体により認識されなかったと考えられた。p53 蛋白の過剰発現のみを認め、遺伝子異常を認めなかった 3 例は、その乖離の原因として、野生型 p53 蛋白が蓄積したこと、免疫染色と実際に microdissection を行った部位とは切片上異なるため正確にその性状を反映していな

かったこと、遺伝子検索をした他の部位に変異があったことなどが推定された。

p53 遺伝子変異は、免疫染色法、PCR-SSCP 法の両法を相補的に用いて検索するのが有用であった。上皮内癌の一部に早期の段階から p53 遺伝子異常が関与している場合があり、上皮内癌間には悪性度の差異が存在することが明らかにできる可能性があると考えられた。

公開発表に際し、副査の細川教授から、症例の頻度と膵管癌の進展の仕方について質問された。申請者は、膵管癌は通常、膵管上皮から発生すると考えられており、発育進展に伴い膵管上皮を破壊し浸潤癌にいたる場合が多いと述べた。また新潟大学医学部第一病理学教室において、1976 年から 1998 年までに通常型膵管癌と診断された症例は約 400 例あるが、上皮内癌を含む症例で標本の保存状態が良好で遺伝子解析が可能であったのは 50 例前後でありそれほど頻度は高くないと説明した。続いて、副査の加藤教授から、膵上皮内癌部について他の遺伝子について検索していないかとの質問があった。申請者は、p16 遺伝子の免疫染色を試みたが、評価に値する結果が得られなかったと述べた。最後に、主査の浅香教授から、将来的に膵管癌の p53 遺伝子治療が行われるとしたら、効果はどう推定されるかという質問があった。申請者は、今回の検索から膵浸潤癌では p53 遺伝子変異をきたしている症例の頻度が約 50% 程度であるため著効は期待できないのではないかと答えた。

本研究では、膵管癌の一部については p53 遺伝子変異が早期の段階から関与していることを明らかにし、今後膵管癌の発癌機序の解明並びに遺伝子治療等の臨床応用に寄与していく可能性が期待された。以上より、審査員一同は、この研究を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。