

## 学 位 論 文 の 要 旨

|   |    |    |      |
|---|----|----|------|
| 学位の種類   | 博士 | 氏名 | 坂東伸幸 |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma</b></p> <p>(上顎扁平上皮癌における予後因子としての p53 遺伝子変異、bax、アポトーシス)</p> <p>共著者名 林 達哉、岸部 幹、高原 幹、今田正信、野中 聡、原渕保明</p> <p>掲載雑誌名 Cancer. 94 (7): 1968-1980, 2002</p> <p>研究目的</p> <p>上顎扁平上皮癌は頭頸部癌の中で欧米では数%を占めるのみであるが、本邦では比較的頻繁にみられる。しかし、その発癌因子や癌関連遺伝子の異常は解明されていない。腫瘍の進展はその増殖と自発的なアポトーシスとの不均衡によって規定されている。アポトーシスは p53 関連経路として bcl-2 や bcl-x などのアポトーシス抑制因子、および p53 蛋白、bax などのアポトーシス促進因子によって調節されている。一方、p53 関連経路以外の経路として Fas がアポトーシス誘導に関与している。</p> <p>p53 癌抑制遺伝子はアポトーシス誘導と細胞周期抑制の主な 2 つの機能を有している。p53 の機能異常は放射線や抗癌剤による腫瘍細胞のアポトーシス誘導能の低下をもたらすとの報告がある。また p53 遺伝子変異がヒトの癌の約半数に見られ、頭頸部癌においても予後不良の因子であったとする報告がある。しかし相反する報告もあり、一定した見解は得られていない。特に上顎扁平上皮癌について検討した報告はみられない。さらに治療前の腫瘍組織における p53 遺伝子異常やアポトーシス関連蛋白の発現が放射線照射や化学療法の有効性や患者の予後と如何に関連しているかを検討することは、治療法の選択や患者の臨床経過を推測する上で重要である。</p> <p>本研究では、上顎扁平上皮癌において p53 遺伝子変異、アポトーシス関連蛋白の発現および腫瘍組織内のアポトーシスが放射線照射や化学療法の有効性や臨床経過を規定する予後因子となり得るか否かについて検討した。</p> <p>対象と方法</p> <p>1. 対象</p> <p>1980 年から 2000 年まで旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で治療を行い、追跡可能であった上顎扁</p> |    |    |      |

平上皮癌 70 例（男性 49 例、女性 21 例、中央値 67 歳）を対象とした。TNM 分類では T2 が 8 例（11%）、T3 が 33 例（47%）、T4 が 29 例（42%）であり、N1 が 7 例（10%）であった。70 例中 57 例は術前に 5-FU による浅側頭動脈動注化学療法と局所放射線照射を併用（放射線化学療法）した後、根治的手術を行った。全症例の平均観察期間は 61 か月（2-189 か月）であった。

## 2. 免疫組織学的解析

治療前に上顎試験開洞により採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を材料にして、アポトーシス関連蛋白である p53 蛋白、Fas、bax、bcl-x の発現、およびアポトーシス細胞を免疫組織学的に検討した。まず脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。次に p53 蛋白、Fas、bax、bcl-x に対する抗体を 4℃で一晩反応させた。さらにペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬で反応させ、DAB で発色した。判定基準について、p53 蛋白は腫瘍細胞の 10%以上の核が濃染し、過剰発現していたものを陽性とした。Fas は細胞膜が染色されていたものを陽性、bax と bcl-x は腫瘍細胞の 30%以上が弱くまたは不均一に染色されていたものを陽性とし、いずれも陽性と陰性の 2 群に分類した。アポトーシス細胞の同定には抗 single stranded DNA 抗体を用いて上記と同様の免疫染色を行った。腫瘍細胞 1000 個中のアポトーシス細胞の個数をアポトーシスインデックス（以下 AI）とした。

## 3. p53 遺伝子変異

上記のパラフィン切片を HE 染色した後、Laser-capture microdissection system を用いて腫瘍細胞のみを採取し、proteinase K で処理し、DNA を抽出した。それを鋳型として p53 遺伝子の DNA 結合ドメイン内で変異が多く報告されているエクソン 5 からエクソン 8 までに合計 5 組のプライマーを設定し、PCR 法で増幅した。次に PCR で得られた増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し、遺伝子変異およびアミノ酸変異の有無を解析した。

## 4. 放射線化学療法の組織学的有効性

放射線化学療法施行後、手術が行われた 57 例について摘出標本の HE 染色から下里分類を用いてそれらの組織学的有効性を以下の 5 段階に分類した。Grade 0：腫瘍細胞の変化を認めない。Grade I：腫瘍細胞の変化を認めるが、組織構築に変化を認めない。Grade II：増殖性腫瘍細胞の残存を認める。Grade III：非増殖性腫瘍細胞の残存を認める。Grade IV：腫瘍細胞を認めない。

## 5. 統計解析

2 因子間の検定には Mann-Whitney U 検定、カイ 2 乗検定または Fisher exact test を用いた。各因子と放射線化学療法の有効性との相関は Spearman 順位相関検定を用いた。無病生存率と全生存率について Kaplan-Meier 法による解析と cox 比例ハザードモデルによる単変量解析と多変量解析を行った。いずれも  $p < 0.05$  を有意とした。

# 結 果

## 1. アポトーシス関連蛋白の発現

70 例中、p53 蛋白の発現は 39 例（56%）、Fas は 20 例（29%）、bax は 40 例（57%）、bcl-x は 33 例（49%）にみられた。アポトーシス細胞は全症例に認められ、AI の平均値は 2.0（0.2-7.2）であった。bax 陽性例では bax 陰性例に比較して有意に bcl-x 発現を認めなかった（65% vs. 35%,  $p=0.015$ ）。さらに bax 陽性例では bax 陰性例に比較して有意に AI 値が増加していた（1.6 vs. 2.7,  $p=0.024$ ）。一方、p53 蛋白や

Fas の発現と他のアポトーシス関連蛋白の発現には関連性を認めなかった。また、いずれのアポトーシス関連蛋白の発現も年齢、性別、TNM 分類および組織学的分化度との関連性を認めなかった。

## 2. p53 遺伝子変異

70 例中 20 例 (29%) に p53 遺伝子変異を認めた。いずれも点突然変異であり、遺伝子変異部位はエクソン 5 が 8 例 (40%)、エクソン 6 が 2 例 (8%)、エクソン 7 が 3 例 (12%)、エクソン 8 が 7 例 (35%) であった。変異様式は transition が 16 例 (80%)、うち 10 例 (50%) が CpG 部位の G:C-A:T 変異であった。一方、transversion は 4 例 (20%) であった。p53 遺伝子変異例では非変異例に比較して有意に p53 蛋白の発現を認めた (20% vs. 80%,  $p=0.016$ ) が、他のアポトーシス関連蛋白の発現や AI との関連性は認めなかった。p53 遺伝子変異と年齢、性別、TNM 分類および組織学的分化度との関連性を認めなかった。

## 3. 放射線化学療法の組織学的有効性

放射線化学療法を行った 57 例について、放射線化学療法の組織学的有効性を根治的手術で得られた標本を用いて検討した。その結果、Grade II が 21 例 (37%)、Grade III が 20 例 (35%)、Grade IV が 16 例 (28%) であった。組織学的有効性の Grade と治療前生検組織の AI との間に有意な正の相関を認めた ( $r=0.451$ ,  $p=0.048$ )。さらに p53 遺伝子変異例では非変異例に比較して有意に Grade IV (癌細胞を認めない) が少数であった (94% vs. 6%,  $p=0.019$ )。

## 4. 予後

Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、p53 遺伝子変異群 ( $p=0.009$ )、bax 陰性群 ( $p=0.019$ )、低 AI 群 ( $p=0.041$ ) および組織学的有効性 Grade II/III 群 ( $p=0.028$ ) ではそれぞれ p53 遺伝子非変異群、bax 陽性群、高 AI 群および組織学的有効性 Grade IV 群に比較して有意に無病生存率が低下していた。また単変量解析の結果、これらの p53 遺伝子変異 ( $p=0.028$ )、bax 陰性 ( $p=0.019$ )、低 AI 群 ( $p=0.041$ ) および組織学的有効性 Grade II/III ( $p=0.028$ ) は有意に無病生存の悪化と関連していた。さらに、多変量解析で AI が無病生存を規定する独立した予後因子であることが判明した (ハザード比 0.14, 95%信頼区間 0.02-0.96,  $p=0.046$ )。

## 考 察

近年、頭頸部癌において p53 遺伝子異常やアポトーシス関連蛋白の発現に関する報告が見られるようになった。しかし、それらのほとんどが頭頸部癌をひとまとめにして論じられており、原発部位によって発癌因子や臨床像が異なることから、ひとつの原発部位に絞った検討が重要である。上顎扁平上皮癌について数多くの症例を検討した報告は本研究が最初である。

p53 遺伝子変異の検索には p53 蛋白過剰発現を視標にするより、遺伝子変異を直接シークエンスする方が正確であるといわれている。実際に、本研究では p53 蛋白過剰発現が 56%、p53 遺伝子変異が 29% と両者に差がみられた。したがって、上顎扁平上皮癌における p53 蛋白の過剰発現は p53 遺伝子変異のみならず、野生型 p53 遺伝子を有する増殖期細胞や p53 蛋白の分解系の異常を反映している可能性が考えられた。また、遺伝子変異を解析する場合、正常細胞の混入が問題となるが、今回 Laser-capture microdissection system を用いることによって、極めて信頼性が高い p53 遺伝子の変異率や変異様式を得ることが可能であったと考えられた。

頭頸部癌における p53 遺伝子変異の頻度は 16%-50% と報告されており、本研究の検討では 29% であったことから、上顎扁平上皮癌においても同様の頻度であるといえる。変異様式については 80% が

transition 型であり、特に 50%が CpG 部位の G:C-A:T 変異であった。一方、喉頭癌や咽頭癌では transeversion 型が多く、また口腔癌では非 CpG 部位の transition 型が多いとされている。したがって、頭頸部扁平上皮癌における p53 遺伝子の変異様式は原発部位によって異なる可能性が考えられた。

予後因子について解析したところ、p53 遺伝子変異、bax 陰性、低 AI および放射線化学療法の低感受性が有意に無病生存の悪化と関連していた。また、アポトーシス関連蛋白の中では bax 発現が腫瘍組織内のアポトーシス発現に最も関連していた。さらにアポトーシス発現は放射線化学療法の高感受性に関連していた。したがって、bax の発現低下によるアポトーシス抑制が、放射線化学療法の感受性低下を導き、その結果、予後が不良になると考えられた。

一方、p53 遺伝子変異はいずれのアポトーシス関連蛋白の発現およびアポトーシス発現と関連性がなかったが、放射線化学療法の低感受性に関連していた。したがって、上顎扁平上皮癌における p53 遺伝子の機能としてはアポトーシス以外に主に働き、その遺伝子変異はアポトーシスと異なる機序で放射線化学療法の低感受性を導き、その結果、予後が不良となると考えられた。

今回の検討によって治療前の上顎扁平上皮癌組織における p53 遺伝子異常や腫瘍組織内のアポトーシス発現を解析することによって放射線化学療法の有効性や予後を推測できることが示唆された。これらの情報は今後、患者個人の癌の生物学的特性に合わせたオーダーメイド治療を開発する上で、極めて有用であると考えられた。

## 結 論




1. 上顎扁平上皮癌について p53 遺伝子異常やアポトーシス関連蛋白の発現に関する最初の報告を行った。
2. 70 例中 p53 蛋白過剰発現が 56%、p53 遺伝子変異が 29%に認められ、これらの頻度は他の頭頸部扁平上皮癌と同様であった。一方、p53 遺伝子変異様式については transition 型が他の頭頸部扁平上皮癌に比較して多く認められた。
3. 予後因子について解析したところ、p53 遺伝子変異、bax 陰性、低 AI および放射線化学療法の低感受性が有意に無病生存の悪化と関連していた。さらに多変量解析の結果、AI が最も独立した予後因子となった。
4. bax の発現低下によるアポトーシス抑制が、放射線化学療法の感受性低下を導き、その結果、予後が不良になると考えられた。
5. 一方、p53 遺伝子変異はアポトーシス関連蛋白やアポトーシスと異なる機序で放射線化学療法の低感受性を導き、その結果、予後が不良となると考えられた。

## 参考論文

- 1) Hayashi T, Nonaka S, Bandoh N, Kobayashi Y, Imada M, Harabuchi Y. Treatment Outcome of maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer*. 92. 1495-1503. 2001
- 2) 坂東伸幸, 小林吉史, 荻野武, 高原幹, 野中聡, 原渕保明, 三代川斉之. 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の臨床的検討. *耳喉頭頸* 72. 880-886. 2000
- 3) 坂東伸幸, 石井秀幸, 金谷健史. 鼻骨骨折の臨床的検討. *耳鼻臨床* 93. 361-366. 2000

- 4) 坂東伸幸, 執行 寛, 田中 研, 北南和彦, 吉田真子, 伊藤智雄. 側頭骨に発生した線維性骨異形成症の1例. 耳喉頭頸 71. 39-43. 1999
- 5) 坂東伸幸, 執行 寛, 北南和彦, 吉田真子, 伊藤智雄, 高橋光明. 顎下腺多形腺腫再発例. 耳鼻臨床 90. 1025-1028. 1997

学位論文の審査結果の要旨

|   |         |     |      |
|---|---------|-----|------|
| 報告番号  | 第 号     |     |      |
| 学位の種類   | 博士 (医学) | 氏 名 | 坂東伸幸 |
| <p>審査委員長 高 後 裕 </p> <p>審査委員 原 渕 保 明 </p> <p>審査委員 小 川 勝 洋 </p>  |         |     |      |
| <p>学 位 論 文 題 目</p>  |         |     |      |
| <p>Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma<br/>                 (上顎扁平上皮癌における予後因子としての p53 遺伝子変異, bax, アポトーシス)</p>   |         |     |      |
| <p>上顎扁平上皮癌は、頭頸部悪性腫瘍の中でも、欧米にくらべわが国に多く、パピローマ ウイルスが関与するなどの特徴がある。本論文は、旭川医大耳鼻科・頭頸部外科で診断・治療後経過観察しえた上顎扁平上皮癌患者 70 例の術前に採取されたホルマリン固定標本を用い、癌抑制遺伝子である p53 遺伝子変異とアポトーシス関連蛋白の発現および自発的アポトーシスを同定し、これらが臨床経過を規定する予後因子となり得るか、またアポトーシス関連遺伝子が放射線化学療法の有効性を規定している因子になっているか検討したものである。</p> <p>上顎扁平上皮癌症例 70 例の治療前に採取された癌組織を用いてアポトーシス関連蛋白である p53 蛋白, Fas, bax, bcl-x の発現, および自発的アポトーシス (Apoptosis Index: AI) を免疫組織学的に検討した。その結果, p53 蛋白の発現は 39 例 (56%), Fas は 20 例 (29%), bax は 40 例 (57%), bcl-x は 33 例 (49%) にみられた。アポトーシス関連蛋白の発現と自発的アポトーシスの関連性を検討したところ, bax 陽性例では bax 陰性例に比較して有意に自発的アポトーシスが亢進していることが認められた。</p> |         |     |      |

次に、アポトーシス誘導機能を有する p53 癌抑制遺伝子の変異を解析した。癌巣を laser-capture microdissection 法にて摘出，DNA を抽出後，PCR 法にて得られた遺伝子産物をダイレクトシーケンス法にて解析した。その結果，70 例中 20 例（29%）に p53 遺伝子変異を認めた。いずれも点突然変異であり，変異様式は transition が 16 例（80%），transversion は 4 例（20%）であった。

放射線化学療法を行った 57 例について、放射線化学療法の組織学的有効性を根治的手術で得られた標本を用いて検討した。その結果、治療前生検組織に自発的アポトーシスが低い症例や p53 遺伝子変異例では放射線化学療法の組織学的有効性が低下していることが明らかになった。

Kaplan-Meier 法と単変量解析を用いて予後に関する解析を行ったところ，p53 遺伝子変異例，bax 陰性例，自発的アポトーシス低下例および放射線化学療法の組織学的有効性が低い例では有意に無病生存率が低下していた。さらに，多変量解析を行ったところ，自発的アポトーシスが無病生存を規定する独立した予後因子であることが判明した。以上より，bax の発現低下によるアポトーシス抑制，並びに p53 遺伝子変異の両者が放射線化学療法の感受性低下を導き，その結果，予後が不良になると考えられた。

最後に，p53 遺伝子変異がアポトーシス関連蛋白の発現や自発的アポトーシスの発現に関連を認めなかったことにより，p53 遺伝子のもうひとつの機能である細胞周期抑制について着目した。その結果 p53 遺伝子変異が細胞周期抑制因子である p21 の発現低下と腫瘍増殖能のマーカである Ki-67 index の増加に関連していた。よって上顎扁平上皮癌における p53 遺伝子変異は p21 を介した細胞周期の抑制機構の破綻に関連していることが示唆された。

本研究は，多数の上顎扁平上皮癌症例をもとにしてアポトーシス関連蛋白の発現や p53 遺伝子変異を解析した最初の報告である。得られた成績は今後，個々の癌の生物学的特性に合わせたオーダーメイド治療を開発する上で示唆に富む所見を与えている。また，論文提出者に対する試問審査においても，適切かつ論理的回答がなされ，関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から，本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。