耳下腺癌の p53, RB 遺伝子の検討

— 免疫組織化学法を用いて —

高橋 英二・小川 徹也・伊藤 八次
鈴木 智雄・宮田 英雄

Immunohistochemical Study of p53 and RB Tumor Suppressor Gene Protein in Carcinoma of the Parotid Gland

Eiji Takahashi, Tetsuya Ogawa, Yatsuji Ito,
Tomoo Suzuki and Hideo Miyata
(Gifu University)

The development and progression of cancer are known to be regulated by various oncogenes and tumor suppressor genes. We investigated the expression of p53 and RB proteins in 13 cases of parotid carcinomas, which cases were admitted to the Department of Otorhinolaryngology, Gifu University School of Medicine from January 1989 to September 1998. These cases were investigated by immunohistochemical techniques using p53 and RB monoclonal antibodies. The results were as follows:

1) p53 protein nuclear staining was shown in 8 of 13 cases. A significant difference in the expression of p53 proteins was observed between high grade carcinoma groups and low grade carcinoma groups (Fisher's exact test ; $p=0.03$). These results suggest that expression of p53 protein is related to the malignant grade of parotid gland carcinomas.

2) RB protein nuclear staining was shown in 7 of 13 cases. A significant difference in the expression of RB protein was not observed between high grade carcinoma groups and low grade carcinoma groups (Fisher's exact test ; $p=0.27$). Expression of RB protein did not appear to be related to malignant grade of parotid gland carcinomas.

Key words : p53, RB, parotid carcinoma, immunohistochemical technique

はじめに

p53 遺伝子は DNA 腫瘍ウイルスの 1 つである SV40 の large T 蛋白と複合体を形成する細胞蛋白をコードする遺伝子として発見された¹⁾²⁾. 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³⁾. p53 遺伝子は様々な悪性腫瘍においてそのアレルの欠失や点突然変異など, 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⁴⁾. 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⁵⁾.

RB 遺伝子は, ヒト13番染色体長腕(13q14)に存在する遺伝子で, 27個のエクソンから成っている. この遺伝子は928アミノ酸から成る分子量約11万の各蛋白質をコードしている⁶⁾. 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⁷⁾. RB 遺伝子産物(RB蛋白質, pRB)が細胞周期進行, 特にG1

期からS期(DNA複製期)への移行の抑制にきわめて重要な役割を果たしている⁸⁾。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⁹⁾、膀胱癌¹⁰⁾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。唾液腺癌にはc-erbB-2癌遺伝子の遺伝子重複¹¹⁾や転写亢進¹²⁾が報告されている以外にはほとんど知られていない。そのため、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。

一方、ヒトの癌は多くの場合、複数の癌抑制遺伝子や癌遺伝子の変異の蓄積の結果発症すると考えられている。その具体的な例として、Vogelsteinら¹³⁾は大腸癌発症の系統的解析から、大腸癌の発症進展に伴う遺伝子変化モデルを提唱し、多段階発癌のメカニズムを説明している。多段階発癌の各段階において癌遺伝子、癌抑制遺伝子が関わっており、その細胞の増殖能は変化する。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言われている。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なく、癌の多段階発癌のメカニズムより、複数の癌抑制遺伝子の関与の可能性を検討することは有用と考えた。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および悪性度による癌抑制遺伝子産物(蛋白)の発現の差を検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は1989年1月から1998年9月までに当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17~75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, 多形腺腫内癌1例, 唾液腺管癌1例, 腺房細胞癌1例である。Ishiiら¹⁴⁾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, 唾液腺管癌, 多形腺腫内癌)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(diaminobenzine, 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。

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法に従い、染色した。DAB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倍にて検鏡し、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(図1, 2)。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1,000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¹⁵⁾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。

検鏡は異なる2人の検者が別々に行い、それぞれ百分

図1 p53蛋白陽性像($\times 200$)

図2 RB蛋白陽性像(×200)

率を算出し, (－), (+), (++)の判定を行った. 異なった判定の場合は再度検鏡を行い判定を行った.

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.

結 果

耳下腺癌13例のp53蛋白およびRB蛋白の発現結果を表1に示した. 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(図3). p53蛋白の発現を認めた症例は高悪性群(腺癌, 唾液腺管癌, 多形腺腫内癌)では8例中7例(88%), 低悪性群(粘表皮癌, 腺房細胞癌)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(図4).

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(図3). 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(図5).

図3 耳下腺癌におけるp53, RB蛋白の発現

表1 耳下腺癌におけるp53, RB蛋白の発現

症例	性	年齢	病理組織	p53蛋白 核内蓄積	RB蛋白 核内蓄積
高悪性群					
1	男	50	adeno ca	++	+
2	男	60	adeno ca	+	—
3	女	65	adeno ca	++	+
4	男	67	adeno ca	+	—
5	男	71	adeno ca	+	—
6	男	75	adeno ca	+	—
7	男	67	salivary duct ca	—	+
8	女	68	ca in pleomorphic adenoma	++	—
低悪性群					
9	男	17	mucoepidermoid ca	+	—
10	男	29	mucoepidermoid ca	—	+
11	男	63	mucoepidermoid ca	—	+
12	男	68	mucoepidermoid ca	—	+
13	男	69	acinic cell ca	—	+

ca : carcinoma

図4 高悪性群と低悪性群の p53 蛋白発現の比較

図5 高悪性群と低悪性群の RB 蛋白発現の比較

考 察

免疫組織染色では p53 蛋白は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 遺伝子は17番染色体の短腕に位置し, 約 2.8 kb の DNA がエクソン1から11に分かれて存在し, 395個のアミノ酸をコードしている¹⁶⁾. 機能は細胞増殖を制御することが知られている. 機能の喪失が発癌過程に深く関与することにより癌抑制遺伝子の1つと考えられている¹⁷⁾. また p53 遺伝子を調整する遺伝子である MDM2 遺伝子や DNA 腫瘍ウイルスなどによる正常 p53 機能の

不活化により, 細胞が癌化するものと考えられている¹⁸⁾. 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¹⁹⁾, 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²⁰⁾. 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²¹⁾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²²⁾, 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%²³⁾, 胃癌で 57%²⁴⁾, 大腸癌で 60.7%²⁵⁾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 蛋白は不活化される要因として, ①網膜芽細胞腫に代表される遺伝子レベルの不活化であり, 対立する2つの遺伝子に変異が導入されることより細胞は正常の RB 蛋白が作られずに不活化される. ②アデノウイルス E1A, パピローマウイルス E7 に代表される DNA 腫瘍ウイルス由来蛋白が RB 蛋白と強固に物理学的結合を作る結果, 本来 RB 蛋白と結合すべき E2F などが RB 蛋白から競合的に排除され, E2F による細胞周期の S 期への進行が進められ本来の RB 蛋白が不活化される.

DNA 腫瘍ウイルスによる細胞癌化がこれに関連していると考えられている。③RB 蛋白のリン酸化による不活化である。RB 蛋白は体細胞に普遍的に発現しており、細胞が増殖をはじめるには、RB 蛋白が一時的に不活化する必要がある、ことが考えられている²⁶⁾。

Xu ら²⁷⁾は 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²⁸⁾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²⁸⁾、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きた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。

ま と め

1. 1989 年 1 月から 1998 年 9 月までに、当科に入院した耳下腺癌 13 例の p53 蛋白および RB 蛋白の発現を免疫組織化学的方法にて検討した。

2. p53 蛋白の発現陽性例は耳下腺癌全体で 62% であった。高悪性群では 88%、低悪性群では 20% で、有意な差を認めた。p53 は耳下腺癌において生物学的悪性度を客観的に把握する有用な指標と考えられる。

3. RB 蛋白の発現陰性例は耳下腺癌全体で 46% であった。高悪性群では 62%、低悪性群では 20% であった。

高悪性群に RB 蛋白の発現低下傾向を認めたが有意差を認めなかった。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。また耳下腺癌において生物学的悪性度を客観的に判断する指標とするには、さらなる検討が必要と思われる。

4. 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、変異型 p53 の発現時に、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きたしている可能性が高いと考えられる。

本論文の要旨は第 95 回日本耳鼻咽喉科学会東海地方部会連合講演会 (1998 年 12 月、豊明市) において口演した。

参考文献

- 1) Linzer DI and Levin AJ : Characterization of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17** : 43~52, 1979.
- 2) Lane DP and Crawford LV : T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278** : 261~263, 1979.
- 3) Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ : The p53 protooncogene can act as a suppressor of a transformation. *Cell* **57** : 1083~1093, 1989.
- 4) Levine AJ, Momand J and Fainaly CA : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* **351** : 453~456, 1991.
- 5) Lane DP : Cancer, p53, guardian of the genome. *Nature* **358** : 15~16, 1992.
- 6) Lee WH, Bookstein R, Hong F, et al : Human retinoblastoma susceptibility gene, cloning, identification, sequence. *Science* **235** : 1394~1399, 1987.
- 7) Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, et al : Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* **228** : 501~503, 1985.
- 8) Xu HJ, Hu SX and Benedict WF : Lack of nuclear RB protein staining in G0/middle G1 cells. *Oncogene* **6** : 1139~1146, 1991.
- 9) Hensel CH, Heish CL, Gazard AF, et al : Altered structural and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* **50** : 3067~3072, 1990.
- 10) Horowitz JM, Yandell DW, Park S-H, et al : Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* **243** : 937~940, 1989.

- 11) Issing WJ, Dreps A, Heppt WJ, et al : erbB-2/Her-2 gene amplification and overexpression in parotid gland tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **250** : 150~153, 1993.
- 12) Sugano S, Mukai K, Tsuda H, et al : Immunohistochemical study of c-erbB-2 oncoprotein overexpression in human major salivary gland carcinoma : an indicator of aggressiveness. *Laryngoscope* **102** : 923~927, 1992.
- 13) Vogelstein B and Kinzler KW : The multistep nature of cancer. *Trend Genet* **9** : 138~141, 1993.
- 14) Ishii K and Nakajima T : Evaluation of malignant grade of salivary gland tumors ; studies by cytofluorometric nuclear DNA analysis, histochemistry for nucleolar organizer regions and immunohistochemistry for p53. *Path Int* **44** : 287~296, 1994.
- 15) Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, et al : Absence of retinoblastoma protein expression in primary non small cell lung carcinomas. *Cancer Res* **51** : 2735~2739, 1991.
- 16) Buckman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, et al : A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* **70** : 245~252, 1988.
- 17) Lane DP : p53, guardian of the genome. *Nature* **358** : 15~16, 1992.
- 18) Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al : The MDM2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69** : 1237~1245, 1992.
- 19) Yokota J, Wada M, Shimosato Y, et al : Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 9252~9256, 1987.
- 20) 湯通道満寿男 : ウイルス発癌と p53 遺伝子. *実験医学* **10** : 941~946, 1992.
- 21) Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, et al : Oncogene forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* **256** : 827~830, 1992.
- 22) Charpin C, Devictor B, Andrac L, et al : p53 quantitative immunocytochemical analysis in breast carcinomas. *Hum Pathol* **26** : 159~166, 1994.
- 23) Hanzel E, Gisch G, Kohlberger P, et al : Immunohistochemical detection of mutant p53 suppressor gene product in patients with breast cancer ; influence on metastasis free survival. *Anticancer Res* **12** : 2325~2329, 1992.
- 24) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, et al : p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* **50** : 859~862, 1992.
- 25) Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, et al : Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol* **97** : 244~249, 1992.
- 26) 畠山昌則 : RB と細胞周期. *血液・免疫・腫瘍* **1** : 161~167, 1996.
- 27) Xu HJ, Hu SX and Benedict WF : Lack of nuclear RB protein staining in G0/middleG1 cells. *Oncogene* **6** : 1139~1146, 1991.
- 28) 小川徹也, 長谷川泰久, 中川 敏, 他 : 甲状腺分化癌の病態と RB, bcl-2 遺伝子との関係 —免疫組織化学法を用いて—. *日耳鼻* **101** : 586~594, 1998.

(原稿受付: 平成10年11月5日
原稿採扱: 平成10年12月9日 急載
別刷請求先: 高橋英二
〒500-8705 岐阜市司町40
岐阜大学耳鼻咽喉科学教室)