頭頸部扁平上皮癌における癌抑制遺伝子 *p53* の異常発現

石戸谷 淳¹ 鳥 山 稔¹ 小 口 直 彦²
清 水 信 義³

論文要旨

癌抑制遺伝子 *p53* の異常は、さまざまなヒトの癌において高頻度にみられる遺伝子変化の一つである。また、変異 *p53* 蛋白質は抗体で検出でき、*p53* 遺伝子の異常を免疫組織化学的に調べることができる。そこで今回、頭頸部扁平上皮癌を対象として、免疫染色により *p53* 遺伝子の異常を調べ、臨床的事項と比較検討した。さらに PCNA や EGFR の発現も調べた。検討したすべての部位の扁平上皮癌に *p53* 陽性が見られ、全体では25例中12例(48%)であった。癌組織の分化度、N分類、喫煙歴とは関係がなかったが、Tが大きくなるに従い、有意に *p53* 陽性が増加した。PCNA 陽性は84%、EGFR の過剰発現は全例にみられたが、*p53* 陽性との関係はいずれも見られなかった。

Key words: 頭頸部 (head and neck), 扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma), *p53*, PCNA, EGFR

はじめに

癌研究の進歩により、正常細胞の癌化には、癌遺伝子と共に癌抑制遺伝子も重要な働きをしている事がわかってきた。なかでも、常染色体優性遺伝タイプの網膜芽細胞腫や、若年期に肉腫発生をきたす常染色体優性遺伝の Li-Fraumeni 症候群では、それぞれ *RB* 遺伝子や *p53* 遺伝子といった癌抑制遺伝子の異常が原因と考えられている^{1,2)}。また、多段階発癌過程 (multistep carcinogenesis) がよく研究されている大腸癌では、癌遺伝子 *Ki-ras* の変異と癌抑制遺伝子 *p53* の変異が、それぞれ同一の発癌過程の別のステップに働き、相補的に癌化への変化を引き起こしている事が知られている³⁾。このように、癌抑制遺伝子は最近特に注目されているが、なかでも第17染色体短腕 (17p) に存在する *p53* 遺伝子は、様々なヒトの癌において最も高頻度に異常が見られる癌抑制遺伝子として、臨床材料でもよく研究されている⁴⁾。

頭頸部扁平上皮癌組織における癌抑制遺伝子の異常については、著者らの epidermal growth factor receptor 遺伝子 (癌遺伝子 *erb-B* の proto-oncogene) の異常についての報告⁵⁾を含め、いくつかの報告⁶⁾がみられるが、癌抑制遺伝子 *p53* についての報告はまだ少ない。そこで、今回我々は、頭頸部扁平上皮癌を対象として、*p53* 遺伝子の異常を調べ、臨床的事項と比較検討したので報

告する。

対象と方法

国立病院医療センター耳鼻咽喉科で治療した頭頸部扁平上皮癌の25例を対象とした。治療開始前に biopsy で採取した組織の一部を、OCT compound に包埋し、dry ice 上で凍結して-80℃ で保存した後、6 μm の凍結切片を作成した。*p53* 遺伝子の異常発現 (*p53* 陽性)、増殖細胞のマーカーである増殖細胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) の発現および上皮増殖因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) の過剰発現を、免疫組織化学的に調べ、臨床的事項 (組織学的分化度, TNM 分類, stage, 喫煙歴) と比較検討した。免疫染色には、抗 *p53* PAb 1801 抗体 (Novocastra Lab), 抗 PCNA PC10 抗体 (Novocastra Lab), 抗 EGFR B4G7 抗体⁷⁾を使用し、染色キット (生化学工業) を用いて発色した。発現 (染色) の程度は、-, 1+, 2+ の3段階で評価した。2+は100倍の視野で腫瘍細胞にはほぼ一様に染色がみられる場合とし、1+は100倍の視野で一部の腫瘍細胞にはっきりした染色の見られる場合とした。なお、EGFR については+または-の2段階に評価した。TNM 分類は UICC (1987) によった。喫煙歴は、1日20本以上を2+, 20本以下を1+, 禁煙をしてから5年以上経過しているものを S (stopped) として表した。

¹国立病院医療センター耳鼻咽喉科, ²日本医科大学第2病理学教室, ³慶応義塾大学医学部分子生物学教室
Jun-ichi ISHITOYA¹, Minoru TORIYAMA¹, Naohiko OGUCHI² and Nobuyoshi SHIMIZU³: Accumulation of *p53* protein in squamous cell carcinomas of the head and neck
Department of Oto-Rhino-Laryngology, National Medical Center Hospital¹, 2nd Department of pathology, Nippon Medical school², Department of Molecular Biology, Keio University School of Medicine³

表 1 症例の一覧と免疫染色の結果

	Age Sex	Site	Differentiation	TNM	Stage	p53	PCNA	Smoking
1	55M	larynx	moderately	1 0 0	I	—	2+	S
2	64M	larynx	moderately	1 0 0	I	—	—	1+
3	61M	larynx	moderately	2 0 0	II	—	2+	2+
4	65M	larynx	moderately	2 0 0	II	—	2+	2+
5	71M	larynx	moderately	2 0 0	II	—	1+	2+
6	61M	larynx	moderately	3 0 0	III	1+	2+	2+
7	51M	larynx	moderately	3 2 0	IV	1+	2+	2+
8	63M	larynx	well	1 0 0	I	—	2+	2+
9	54M	larynx	well	2 0 0	II	1+	—	1+
10	79F	hypopharynx	moderately	1 1 0	III	2+	1+	—
11	58M	hypopharynx	well	1 0 0	I	1+	1+	2+
12	56M	hypopharynx	well	2 1 0	III	—	2+	S
13	65M	hypopharynx	well	3 1 0	III	1+	2+	S
14	56M	hypopharynx	well	3 0 0	III	2+	2+	1+
15	57M	hypopharynx	well	2 2 0	IV	2+	2+	2+
16	52M	hypopharynx	well	3 3 0	IV	—	2+	2+
17	61M	hypopharynx	well	3 2 0	IV	—	1+	2+
18	56M	oropharynx	poorly	1 2 0	IV	—	2+	2+
19	68M	oropharynx	well	3 2 0	IV	2+	2+	2+
20	57M	sinus	moderately	2 0 0	II	—	—	—
21	77F	sinus	moderately	3 0 0	III	1+	—	—
22	51F	oral cavity	well	1 0 0	I	—	2+	—
23	59M	oral cavity	well	3 0 0	III	2+	2+	2+
24	56M	oral cavity	well	2 2 0	IV	—	1+	1+
25	52M	oesophagus	well	3 0 0	II	2+	1+	1+

図 1 抗 p53 Pb1801 抗体による免疫染色：扁平上皮癌の浸潤部においては、基底層を中心に核に一致した広範な変異 p53 蛋白質の局在を認める。（症例 25，左図 40 倍，右図 100 倍）

結 果

25 例の染色結果を腫瘍の発生部位，分化度，TNM 分類，Stage，喫煙歴と共に表 1 に示した。喉頭癌 9 例では中分化型が，下咽頭癌 8 例では高分化型が多くを占めた。Stage III，IV の進行例は，喉頭癌 2 例（2/9）に比べ下咽頭癌では 7 例（7/8）と多くみられた。

p53 陽性例を図 1 に示した。p53 陽性は全体で 12/25 例（48%）と高率で，すべての部位の癌でみられた。特

図 2 T 分類，N 分類別にみた癌抑制遺伝子 p53 異常発現の有無

に下咽頭癌では，喉頭癌の 3/9（33%）に比べ 5/8 例（63%）と多く，また分化度との関係では，中分化型に比べ高分化型で p53 陽性が多くみられたが，これらはいずれも有意な差ではなかった。p53 陽性と Stage やリンパ節転移の有無（N 分類）との間には，有意な関係は見られなかった（図 2）。腫瘍の広がり（T 分類）に関しては，T1，T2 に比べ T3 と腫瘍が大きくなるにつれ p53 の陽性率が増し（図 2），p53 陽性群と p53 陰性群とでは有意な差（Mann-Whitney の U 検定及び χ^2 検定； $P < 0.05$ ）が見られた。喫煙に関しては多くの症例で喫煙歴が見られたが，p53 陽性との間には関係は見いだせなかった。

図 3 抗 PCNA PC10 抗体による免疫染色：扁平上皮癌の胞巣には、核に一致した PCNA の局在を認める。(症例 4, 100倍)

図 4 癌抑制遺伝子 *p53* 異常発現と PCNA 発現との関係

図 3 に PCNA 陽性例を示した。PCNA 陽性は 21/25 例 (84%) と大多数の症例で見られたが、発現の程度には差を認めた。しかし、PCNA 陽性と stage や分化度など臨床的事項との間には特に関係は見られなかった。さらに、個々の症例の PCNA 陽性の程度と *p53* 陽性の程度を比べると (図 4), 両者の間には相関を認めなかった。

図 5 に EGFR 陽性例を示した。EGFR は、正常粘膜上皮では基底層のみが染色されたが、今回検討した頭頸部扁平上皮癌組織では、全例で癌細胞の細胞膜に強く発現していた。角化した癌真珠の部分では発現がみられなかった。

考 察

癌抑制遺伝子 *p53* の異常は、様々なヒトの癌におい

図 5 抗 EGFR B4G7 抗体による免疫染色：扁平上皮癌の腫瘍細胞に細胞膜に一致して EGFR の過剰発現を認める。中央上部は癌真珠 (症例 22, 200倍)

て最も高頻度に見られる遺伝子異常である⁴⁾。変異が見られる頻度は癌の種類によって異なるが、肺小細胞癌ではほぼ 100% と報告されている⁸⁾。予後との関連についての報告は少ないが、最近、胃癌⁹⁾や肺癌¹⁰⁾で *p53* 遺伝子の異常が予後と相関するという報告がなされた。

頭頸部扁平上皮癌における *p53* 遺伝子の異常は、ごく最近になっていくつか報告された。喉頭癌¹¹⁾や口腔癌¹²⁾では、50~60% に異常がみられているのに対して、上咽頭癌において *p53* 遺伝子の異常が見られていない¹³⁾ことは興味深い。

p53 遺伝子の変異は正常に対して劣性であるので、異常が発現するためには最低 2 つの変異が生じなければならない。一般に見られる変化は、*p53* 遺伝子が存在する 17p の領域にヘテロ接合の消失 (loss of heterozygosity; LOH) がみられ、残存する *p53* 対立遺伝子に突然変異がみられるものであり¹⁴⁾、これらの変化を検出するには、分子生物学的手法が必要である。しかし近年、*p53* 蛋白質に対する抗体を用いる免疫組織化学的方法で、*p53* 遺伝子の異常が推定できるようになった。すなわち、正常 *p53* 蛋白質の半減期が 6~30 分と短いのに対して、変異 *p53* 蛋白質はその 4~20 倍も安定になり、細胞内に蓄積する¹⁵⁾。そこで、正常 *p53* 蛋白質を検出できない抗体も、蓄積した変異 *p53* 蛋白質を検出できるようになった。このことより、この抗体によって認識される核内蛋白質は変異 *p53* 蛋白質であり、*p53* 遺伝子に異常が生じていると推定される¹⁶⁾。

今回は、*p53* 研究に最もよく使われているモノクローナル抗体の Pb 1801 を用いて、*p53* 蛋白質の異常発現を調べた。*p53* 陽性は、25 例中 12 例 (48%) とほぼ半数の症例で見られた。今回の症例の中には上咽頭癌が含まれてはいなかったが、それ以外の喉頭癌、中咽頭癌、下咽頭癌、上顎癌、頸部食道癌といずれの部位の癌組織にも *p53* 陽性例がみられた。喉頭癌の 9 例中 3 例に比

べ、下咽頭癌では8例中5例と頻度が高かったが、後述するように喉頭癌は比較的早期なものが多かったのに対し、下咽頭癌では進行例が多かった事によると考えられた。この様に、*p53* 遺伝子の変化は、頭頸部扁平上皮癌においてはその発生部位に関わらず、高率に見られる遺伝子変化であるといえる。さらに、今回用いた免疫染色は、分子生物学的な方法に比べて false negative が多い。それゆえ、頭頸部扁平上皮癌においては、実際にはもっと高率に *p53* 遺伝子の異常が生じていると推測される。

分化度との関係を見ると、*p53* 陽性は高分化型でも低分化型でも同様にみられ、一定の傾向は見られなかった。これより、*p53* 遺伝子の異常は癌組織の分化 (differentiation) には関与していないと考えられた。

TNM 分類と *p53* 陽性との関係を見ると、リンパ節転移の有無 (N分類) とは相関はみられなかったが、原発部位の腫瘍の広がり (T分類) が大きくなるに従い、*p53* 陽性も増加した。*p53* 陽性群と *p53* 陰性群の2つに分け、T分類との関係を調べると両群の間には有意の差 ($p < 0.05$) がみられた。すなわち、頭頸部扁平上皮癌における癌抑制遺伝子 *p53* の異常は、転移の有無とは関係ないが、原発部位での腫瘍の進展に関与している可能性が考えられた。同様に stage との関係を調べたが、相関はみられなかった。staging にはN分類の関与が大きく、また、*p53* 遺伝子の異常がN分類とは相関がなかった事からこのような結果になったものと考えられた。

PCNA は、細胞増殖サイクルの G_1 後期からS期にかけて細胞核内に蓄積する核蛋白質で、免疫組織化学的な増殖細胞マーカーとして注目されている¹⁷⁾。*p53* 遺伝子の異常がT分類と相関がみられた事より、変異 *p53* 蛋白質の出現と PCNA 核蛋白質の蓄積との関係に興味を持たれた。そこで、同一材料を用い免疫組織化学的に PCNA の発現を調べると、程度の差はあるが25例中21例 (84%) で PCNA 陽性であった。しかし、PCNA 陽性の程度と分化度、T分類、N分類、また stage とは何の相関も見られなかった。さらに、PCNA 陽性と *p53* 陽性との相関を調べてみても (図4) 特に関係は見られなかった。すなわち、PCNA 陽性として示される細胞の増殖能の獲得と癌抑制遺伝子 *p53* の異常とは別の現象であると考えられた。

EGFR は癌遺伝子 *erb-B* の遺伝子産物と相同性が高く、FGFR 遺伝子は *erb-B* の proto-oncogene と考えられており、著者らは頭頸部扁平上皮癌における、EGFR 遺伝子の amplification の異常を以前に報告した⁹⁾。今回は、*p53* 蛋白質の異常発現と比較する目的で、抗体を用いて免疫組織化学的に EGFR の発現を

調べた。今回用いた抗体 (B4G7)¹⁷⁾ は、癌細胞でよく発現されている low affinity type の EGFR を認識する。正常粘膜上皮においては基底層のみが染色されるが、頭頸部扁平上皮癌組織においては全例において、癌真珠の部分を除いて過剰発現が見られ、特に細胞膜に強い染色がみられた。

以上より、次のような仮説が考えられる。すなわち、頭頸部扁平上皮癌の癌化過程においては、PCNA の出現や EGFR の異常発現は initiation や promotion などに関連した比較的早期の変化であり、*p53* 遺伝子の異常はより後期の progression に関わる変化であるという可能性である。この仮説を実際に臨床例で証明するのは難しいかも知れないが、興味深い問題である。

p53 遺伝子の異常と喫煙との相関が報告されている¹⁸⁾が、今回の検討では特に関係は見られなかった。上記のように、*p53* 遺伝子の異常が progression に関わるとしたら、相関が見られない方が妥当であると思われる。

いずれにせよ、頭頸部扁平上皮癌においても、*p53* 遺伝子の異常は非常に高頻度に見られることから、予後との関連を含め、さらに今後の臨床研究の発展が望まれる。

Summary

In a variety of human cancers, mutations of the tumor-suppressor gene *p53* occur frequently and may lead to overexpression of a long-lived mutant form of *p53* protein. In this study, overexpression of putative mutated *p53* protein was detected immunohistochemically in 12 (48%) of 25 specimens of the head and neck squamous cell carcinoma (SCC) treated in our hospital. *p53* positives were distributed among almost all primary sites and there was no association between positive *p53* staining and differentiation of the carcinoma, node stage (N) or the patient smoking history. However, a correlation was found between positive *p53* staining and the tumor stage (T). PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and EGFR (epidermal growth factor receptor) were also examined immunohistochemically in the same specimens. PCNA and overexpression of EGFR were detected in 21 (84%) and all of 25 cases, respectively. No correlation between *p53* staining and PCNA staining was noted. These results suggest that alteration of *p53* gene appears common in the head and neck SCC, and the change might occur in the late stage of the carcinogenesis of the SCC.

文 献

- 1) Friend SH, Bernards R, et al.: A human DNA segment with properties of the gene that predispose to retinoblastoma. Nature 323: 643-646, 1986.

- 2) Malkin D. Li FP. et al.: Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250 : 1233-1238, 1990.
- 3) Fearon ER. Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 : 759-767, 1990.
- 4) Hollstein M. Sidransky D. et al.: *p53* mutation in human cancers. *Science* 253 : 49-53, 1991.
- 5) Ishitoya J. Toriyama M. et al.: Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 59 : 559-562, 1990.
- 6) Fenoglio-Preiser CM. Listrom MD. et al.: Oncogenes and tumor suppressor genes in solid tumors; lung, skin, salivary gland, head and neck, and soft tissue tumors: Fenoglio-Preiser CM. Willman MD.: Molecular diagnostics in pathology. 261-288, 1991, Hilliams & Wilkins, Baltimore/Hong Kong/London/ Sydney.
- 7) Ozawa S. Ueda M. et al.: High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal suamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 39 : 333-337, 1987.
- 8) D'Amico D. Carbone D. et al: High frequency of somatically acquired *p53* mutation in small-cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene* 7 : 339-346, 1992.
- 9) Martin D. Filipe MI. et al.: *p53* expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50 : 859-862, 1992.
- 10) Quinlan DC. Davidson AG. et al.: Accumulation of *p53* protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 52 : 4828-4831, 1992.
- 11) Maestro R. Dolcetti R. et al.: High frequency of *p53* gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cercinoma of the larynx. *Oncogene* 7 : 1159-1166, 1992.
- 12) Ogden GR. Kiddie RA. et al.: Assessment of *p53* protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. *J Pathol* 166 : 389-394, 1992.
- 13) Spruck 3d CH. Tsai YC. et al: Absence of *p53* gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res* 52 : 4787-4790, 1992.
- 14) Baker SJ. Fearon ER. et al.: Chromosome 17 deletions and *p53* gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244 : 217-220, 1989.
- 15) Finlay CA. Hinds PH. at el.: Activating mution for transformation by *p53* produce a gene product that forms an hsc 70-*p53* complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8 : 531-539, 1988.
- 16) Cunningham J. Lust JA. et al: Expression of *p53* and 17p allelic in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 52 : 1974-1980, 1992.
- 17) Garcia RL. Coltrera MD. et al.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 134 : 733-739, 1989.
- 18) Field JK. Spandidos A. et al.: Elevated *p53* expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 64 : 573-577, 1991.