口腔領域悪性腫瘍における癌抑制遺伝子産物 p 53 の免疫組織化学的検索

新谷 悟・松村智弘・坂井義春

Immunohistochemical detection of the tumor suppressor gene product p53 in malignant tumor of oral region

Satoru SHINTANI・Tomohiro MATSUMURA・Yoshiharu SAKAI

Abstract: The expression on tumor suppressor gene product p53 was studied in 137 cases of malignant tumor of oral region. Using monoclonal antibody to p53 protein that was detectable on paraffin sections (BP 53-12), immunohistochemical analysis was performed. Positive staining of p53 protein of nucleus was detected in 43 of 107 cases (40.2%) of squamous cell carcinoma, 2 of 18 cases (11.1%) of adenoid cystic carcinoma, 1 of 9 cases (11.1%) of mucoepidermoid carcinoma, 1 of 2 cases (50%) of osteosarcoma, and 1 case of undifferentiated carcinoma.

These evidences suggested that abnormality of p53 protein was involved in malignant tumors of the oral region.

The positive cells were always confined to the malignant portion, whereas no expression was detectable in normal areas. In the region just adjacent to some tumors, the expression of p53 protein was distinguished from that in a peripheral normal portion with a clear border. The result suggested that the p53 detection by the immunohistochemical method was valuable for the assessment of the tumor occupied region.

Key words: immunohistochemical (免疫組織化学的), p53 (p53), malignant tumor (悪性腫瘍)

緒 言

p 53 遺伝子は、その産物が DNA 腫瘍ウイルス SV40 の T 抗原と結合する細胞蛋白質として同定され¹⁾、トランスフォーム細胞においてしばしば高い発現がみられること^{2,3)}などから癌遺伝子と考えられていた。しかし、最近、トランスフォーメーション活性をもつのは、変異をもった P 53 遺伝子のみであって、野生型 P 53 遺伝子は多量に発現させても、細胞に対するトランスフォーム活性を全く示さないということがあきらかになった⁴⁾。さらにラット線維芽細胞 (REF) を用いた実験系において、野生型 P 53 遺伝子がさまざまな組み合わせの癌遺伝子による細胞のトランスフォーメーション(フォーカス形成)

を強く阻害することが示され^{5,6)}、P 53 は癌抑制遺伝子として考えられるようになってきた。

P 53 遺伝子ならびにその産物の正確な作用機序は現在まだよくわかっていないが、野生型 P 53 は正常細胞において細胞増殖の制御に関与し細胞周期を調節しており、癌においては P 53 遺伝子の不活化ならびに優性な点突然変異を生じることで野生型の機能が失われ、細胞の悪性増殖にとって有利に働くと考えられている^{7,8)}。

P 53 遺伝子産物である P 53 蛋白質は、分子量 5.3 万の細胞蛋白質であり、野生型 P 53 遺伝子産物の半減期が 20～30 分であるのに対し、変異型では 1.5～7 時間と長く⁹⁾、また DNA ウィルス産生蛋白質^{1,10,11)} や heat shock protein 68, 70 (Hsc 68, 70)^{5,12)} などとの結合により、細胞内により安定した状態で蓄積されることが報告されている、このような発現異常あるいは異常蓄積を利用し、P 53 蛋白質の発現を免疫組織化学的に検索し、このことで本蛋白質の異常を検討しようとする試みが、肺癌、大腸癌などで行われてきている¹³⁻¹⁵⁾。しかし、口腔癌における P 53 遺伝子ならびにその産物に関しては、扁平上皮癌由来の細胞株を用いた検討が散見できる程度で^{16,17)}、実際

岡山大学歯学部口腔外科学第 2 講座

(主任：松村智弘教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II,

Okayama University Dental School (Chief: Prof.

Tomohiro Matsumura)

受付日：平成 4 年 4 月 17 日

写真 1 扁平上皮癌症例の H-E 染色所見 (上段), および BP 53-12 抗体を用いた免疫組織化学染色 ($\times 200$).

写真 2 腺様嚢胞癌症例の H-E 染色所見 (上段), および BP 53-12 抗体を用いた免疫組織化学染色 ($\times 200$).

の腫瘍組織を用いた報告はほとんどない。そこで、われわれは扁平上皮癌ならびに、腺様嚢胞癌など唾液腺腫瘍を含め口腔領域悪性腫瘍における P 53 癌抑制遺伝子産物の異常を免疫組織化学的に検索したので報告する。

対象ならびに方法

対象症例は1982年4月から1991年12月までの9年8か月に岡山大学歯学部附属病院第2口腔外科を受診した口腔領域悪性腫瘍症例のうち検索が可能であった137例で、その組織型は、扁平上皮癌107例、腺様嚢胞癌18例、粘表皮癌9例、骨肉腫2例、未分化癌1例である。これら症例の、生検時ならびに手術時に採取し10%中性緩衝ホルマリンにて固定、通法に従いパラフィン包埋した標本より4 μ m の切片を作製、P 53 癌抑制遺伝子の発現を免疫組織化学的に検討した。免疫組織化学的染色は、ストレプトアビジンを用いた ABA 法 (Avidin-biotin affinity method, Lipshaw, USA) により行った。すなわち、脱パラフィン後、1次抗体として抗 P 53 抗体 (Clone No. BP 53-12, 日本ターナー, 神戸) を 100 倍希釈し、4°C 1 昼夜反応させ、次に 2 次抗体としてビオチン化抗体、さらにストレプトアビジン・ペーオキシダーゼ複合体を

室温にておのおの30分反応させた。発色は3,3'-diaminobenzidine $\cdot$ 4 HCl (DAB) を用いて行い、メチルグリーンにて対比染色後、脱水、透徹、封入し検鏡した。

結 果

P 53 蛋白は、口腔粘膜上皮、唾液腺などの正常組織にはその発現を認めず、各腫瘍組織の核に発現を認めた。各組織型による発現を認める症例の割合は、扁平上皮癌では107例中43例 (40.2%) (写真1)、腺様嚢胞癌では18例中2例 (11.1%) (写真2)、粘表皮癌9例中1例 (11.1%) (写真3)、骨肉腫では2例中1例 (50%) (写真4)、未分化癌1例中1例 (100%) (写真5) とさまざまであった (表1)。発現を認めた症例では、被覆する正常上皮など隣接する正常組織には陽性所見を認めず腫瘍部の細胞の核にのみ陽性所見を認めた (写真6)。またこれらの症例中、比較的多くの検索が可能であった扁平上皮癌での P 53 蛋白の発現を認めた症例と組織学的分類 (WHO, 1971)¹⁸⁾、ステージ分類 (UICC, 1987)¹⁹⁾ の関連を検討したところ、組織学的分類では Grade I で34% (22/64例)、Grade II で44% (12/27例)、Grade III で56% (9/16例) と分化度が低くなるにつれ P 53 蛋白

写真 3 粘表皮癌症例の染色所見 (上段), および BP53-12 抗体を用いた免疫組織化学染色 (×200).

写真 4 骨肉腫症例の H-E 染色所見 (上段), および BP 53-12 抗体を用いた免疫組織化学染色 (×200).

表 1 対象症例ならびに p53 蛋白発現率
—免疫組織学的検討—

扁平上皮癌	43/107 (40.2%)
腺様嚢胞癌	2/18 (11.1%)
粘表皮癌	1/9 (11.1%)
骨肉腫	1/2 (50 %)
未分化癌	1/1 (100 %)
計	48/137 (35.0%)

発現症例/検索症例 (発現率)

を発現している症例が多くなる傾向を認めた (表 1)。しかし、ステージ分類との関連では stage I で 36% (5/14例), stage II で48% (12/25例), stage III で29% (5/17例), stage IV で41% (21/51例) と傾向などは認めなかった (表 2)。

考 察

p 53遺伝子の異常が肺癌²⁰⁾, 乳癌²¹⁾, 骨肉腫²²⁾, 膠芽細胞腫, 神経線維肉腫²³⁾, などさまざまな腫瘍で報告され, このことが癌化の一般的な変化ではないかと考えら

表 2 組織学的分類 (WHO, 1971) ならびにステージ分類 (UICC, 1987) と p 53 発現症例との関係

組織学的 Grading	
I	22/64 (34%)
II	12/27 (44%)
III	9/16 (56%)
TNM ステージ分類	
I	5/14 (36%)
II	12/25 (48%)
III	5/17 (29%)
IV	21/51 (41%)

発現症例/検索症例 (発現率)

れるようになってきた。p 53 遺伝子の欠失, 点突然変異といった構造, 発現の変化は, PCR-SCPP (Single Strand Conformation Polymorphism of Polymerase Chain Reaction Products) 法などによる遺伝子解析法を用いて行われている^{6,24)}。一方で, 変異型 p 53 遺伝子産物が野生型遺伝子産物に比べ, 非常に安定で, 悪性細胞においてはこの変異型遺伝子産物が細胞内に蓄積されることが知られており^{24,26,27)}, このことを利用して p 53 遺

写真 5 未分化癌症例の H-E 染色所見 (上段), および BP 53-12 抗体を用いた免疫組織化学染色 ($\times 200$).

写真 6 扁平上皮癌症例の H-E 染色所見 (上段), および BP 53-12 抗体を用いた免疫組織化学染色 ($\times 200$).

腫瘍部分を覆っている上皮においては, P53 蛋白の発現は認めず腫瘍部分にのみ, その陽性所見を認めた.

伝子産物の異常を免疫組織化学的に検討する方法が報告され^{9,10}, 最近では, 各臓器の腫瘍組織における P53 の異常を免疫組織化学的に検討し, 診断への応用を試みようとする報告もみられるようになってきている^{13-15, 28-30}. しかしこれらの報告は, 凍結組織切片に対して検索したものであり症例数の限られたものが多い^{13-15, 29, 30}. 今回, われわれはより多くの症例に対し検索を行うためにホルマリン固定パラフィン包埋標本において染色可能なマウスモノクローナル抗 P53 抗体 (BP 53-12) を用い検索を行った. この BP 53-12 抗体は各種細胞株を用いたイムノブロテイング, 免疫沈降および免疫組織化学的検討により変異型 P53 遺伝子産物と反応することが確認され^{25, 27}, また実際の腫瘍組織においても種々の固定法において安定した染色性を示すことが報告されている³¹. われわれも, 同一組織標本から得られた凍結組織切片およびホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い, 異った 4 種の clone のモノクローナル抗体 (PAb 1, 801, PAb 240, PAb 421, BP 53-12) による染色性の比較検討を行い, BP 53-12 抗体がホルマリン固定の影響などを受けず, 安定した染色性を示すことを確認しており³², 本抗体が本蛋白の免疫組織化学的検索に有用であると考えられた.

各臓器における P53 蛋白の免疫組織化学的検討の報告によると大腸癌で 46.5%²⁸, 乳癌で 42.2%²⁹, 卵巣癌で 50%³⁰ に発現を認め, これらの腫瘍のほぼ半数の症例において P53 蛋白の異常が生じていることが示されている. 今回の口腔癌における検索でも腺様嚢胞癌ならびに粘表皮癌では発現を認めた症例が少なかったものの, 扁平上皮癌では 40.2% と他臓器の腫瘍とほぼ同様の頻度で発現を認めた. また未分化癌, 骨肉腫でも, その発現を認めたことから, 種々の組織型の口腔領域悪性腫瘍において P53 蛋白の異常が生じていることが示された.

野生型 P53 遺伝子産物の細胞内における生理的作用は, いまだ不明であるが, 本蛋白の誘導によって, DNA ポリメラーゼ δ の補助因子である Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の mRNA の発現が特異的に抑制され, その結果として細胞周期は G1 期から S 期へ入る点で可逆的に止まることが示されている^{33, 34}. また, マウス L12 細胞などの細胞株を用いた実験系で, 細胞中に変異マウス P53 遺伝子を過剰発現させると造腫瘍活性をもつようになることなどから^{35, 36}, 変異型 P53 遺

伝子産物が野生型産物の機能を何らかの形で阻害することで、細胞の悪性増殖にとって有利な状況がもたらされるということであろうと推測されている^{7,8)}。これらのことから、組織型によりその発現を認めた症例の頻度が異なることは細胞動態との関連があるとも考えられた。しかし、これらP53蛋白の異常は検索した全例で生じているわけではなく、細胞動態のみと関連して異常が生じていると結論づけるには問題があることも確かである。子宮頸部癌において、高率に感染が認められるヒトパピローマウイルスのE6蛋白質がP53蛋白を不活性化することで癌化が生じることを示唆する報告がなされるなど³⁸⁾、他の因子との関係もあきらかにされてきており、これら種々の遺伝子ならびに遺伝子産物などいくつかの因子の関与により、本蛋白の異常が生じていることは十分に考えられる。このようなことから、今後RT-PCR法あるいはPCR法などを用いたRNA、DNAレベルでの構造異常の解析などととも、これら種々の癌遺伝子あるいはウイルスなどとの関係について、より詳細な検討が必要と思われる。

本検索の扁平上皮癌例での組織学的分類(WHO, 1971)¹⁸⁾との検討では、Grade Iで34%(22/64例)、Grade IIで44%(12/27例)、Grade IIIで56%(9/16例)と組織学的に分化度が低くなるに伴い、P53蛋白を発現している症例が多くなる傾向を認めた。しかし、ステージ分類(UICC, 1987)¹⁹⁾との検討では相関などは認めず予後との相関についてもあきらかにできなかった。乳癌における検討では本蛋白の発現と予後との間に相関を認めるとする報告をみるが^{29,30)}、その他の腫瘍においては予後との関係についてはあきらかにされておらず^{18-19,28,30)}、転移など予後因子との関係よりも、癌化過程における役割が重要視されている⁷⁻¹²⁾。口腔領域悪性腫瘍においても予後との関係については、あきらかにできなかった。

本蛋白の組織内での発現様式に関して、Purdieら²⁸⁾は大腸癌における検討で、その陽性所見が腫瘍組織にのみ認められ、隣接正常組織には認められないことから、このことが腫瘍浸潤の境界を示し、外科的切除範囲の指標になるとしている。本検索においても、P53蛋白は腫瘍部のみ染色され、被覆する正常上皮には陽性所見を認めず、また腫瘍隣接部において明瞭な境界をもって陽性部位が区別できる例がみられたことから口腔領域悪性腫瘍においても、本蛋白の免疫組織化学的検討が腫瘍の範囲を知る上での指標になり、さらには外科的切除範囲の指標となる可能性が示唆された。

結 語

口腔領域悪性腫瘍におけるP53癌抑制遺伝子産物の発現を免疫組織化学的に検討した。P53蛋白は扁平上皮癌

で107例中43例(40.2%)、腺様嚢胞癌では18例中2例(11.1%)、粘表皮癌9例中1例(11.1%)、未分化癌1例中1例(100%)、骨肉腫では2例中1例(50%)の症例で発現を認め、口腔領域悪性腫瘍においてもP53の異常が関与していることが示された。また、P53蛋白は腫瘍部のみ染色され、被覆する正常上皮には陽性所見を認めず、腫瘍隣接部において明瞭な境界をもって陽性部位が区別できる例もみられ、腫瘍の範囲を知る上で1つの指標になる可能性が示唆された。

本論文の一部は、第10回日本口腔腫瘍学会総会(平成4年1月28, 29日, 広島市)において発表した。

引 用 文 献

- 1) Lane, D.P. and Crawford, L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278: 261-263 1979.
- 2) Klein, G., (ed): *Advances in Viral Oncology*, Vol 2. The transformation associated cellular p53 protein. New York: Raven Press 1982.
- 3) Ohren, M.: The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823: 67-78 1985.
- 4) Eliyahu, D., Raz, A., et al.: Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312: 646-649 1984.
- 5) Finlay, C.A., Hinds, P.W., et al.: Activating mutations 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.
- 6) Finlay, C.A., Philip, W., et al.: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1089 1989.
- 7) 大川恵三, 横田 淳: p53と癌化. *実験医学* 9: 1717-1720 1991.
- 8) Moshe, O.: 癌抑制蛋白としてのp53. *実験医学* 8: 843-850 1990.
- 9) Hinds, P.W., FDinlay, C.A., et al.: Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth & Differ* 1: 571-580 1990.
- 10) Linzer, D.I.H. and Levine, A.J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52 1979.
- 11) Samow, P., Ho, Y.S., et al.: Adenovirus

- E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigens are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28: 387-394 1982.
- 12) Pinhasi-Kimhi, O., Michalovitz, D. et al.: Specific interaction between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock protein. *Nature* 320: 182-185 1986.
- 13) Van Den Berg, F.M., Tigges, A.J., et al.: Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumors. *J Pathol* 157: 193-199 1989.
- 14) Cattoretti, G., Rilke, F., et al.: p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41: 178-183 1988.
- 15) Iggo, R., Gatter, K., et al.: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679 1990.
- 16) 酒井英紀, 石井菜穂子, 他: 口腔扁平上皮癌における癌抑制遺伝子p53(抄). 歯科基礎33(補冊) 220 1991.
- 17) 石井菜穂子, 酒井英紀, 他: ヒト口腔扁平上皮癌におけるp53癌抑制遺伝子蛋白質の発現についての免疫組織化学的検索(抄). 歯科基礎 33(補冊) 221 1991.
- 18) Wasi, P.N., Choen, B., et al.: Histological typing of oral and oropharyngeal tumors, international Histological Classification of Tumors NO4. Geneva, WHO, 1971, p 17-18.
- 19) Hermanek, P. and Sobin, L.H.: TNM classification of Malignant Tumors, ed. 4. Berlin: Springer-Verlag 1987.
- 20) Takahashi, T., Nau, M.M., et al.: p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246: 491-494 1989.
- 21) Bartek, J., Bartkova, J., et al.: Pattern of expression of the p53 tumor suppressor in human breast tissues and tumors *in situ* and *in vitro*. *Int J Cancer* 46: 839-844 1990.
- 22) 大島朋子: ヒト骨肉腫細胞における癌抑制遺伝子の関与. 口病誌 58: 300-318 1991.
- 23) Nigro, J.W., Baker, S.J., et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708 1989.
- 24) Baker, J.S., Fearon, E.R., et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221 1989.
- 25) Baker, S.J., Preisinger, A.C., et al.: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50: 7717-7722.
- 26) Gannon, J.V., Greaves, R., et al.: Activating mutation in p53 produce a common conformation effect. A monoclonal antibody specific for the mutation. *EMBO J* 9: 1595-1602 1990.
- 27) Rodrigues, N.R., Rowan, A., et al.: p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7555-7559 1990.
- 28) Purdie, C.A., O'Grady, J., et al.: p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138: 807-813 1991.
- 29) Ostrowski, J.L., Sawan, A., et al.: p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 164: 75-81 1991.
- 30) Marks, J.R., Davidoff, A.M., et al.: Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 51: 2979-2984 1991.
- 31) Bertek, J., Bartkova, J., et al.: Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum human malignancies. *Oncogene* 6: 1699-1703 1991.
- 32) 新谷 悟, 松村智弘: 口腔白板症ならびに扁平上皮癌における癌抑制遺伝子産物p53の免疫組織化学的検索(抄). 第10回日本口腔腫瘍学会抄録 88 1992.
- 33) Mercer, W.E., Shields, M.T., et al.: Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6166-6170 1990.
- 34) Mercer, W.E., Shields, M.T., et al.: Growth suppressing induced by wild-type p53 protein is accompanied selective downregulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1958-1962 1991.
- 35) Wolf, D., Harris, N., et al.: Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-Transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38: 119-126 1984.
- 36) Kaczmarek, L., Oren, M., et al.: Cooperation between the p53 protein tumor antigen and platelet-poor plasma in the induction of cellular DNA synthesis. *Exp Cell Res* 162: 268-272 1986.
- 37) Davidoff, A.M., Herndron, J.E., et al.: Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 110: 259-264 1991.
- 38) Scheffner, M., Werness, B.A., et al.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136 1990.