口腔扁平上皮癌における癌抑制遺伝子 p53蛋白の 発現に関する免疫組織化学的研究

末 永 一 郎

九州歯科大学口腔外科学第2講座 (指導: 梶山 稔教授)

平成7年6月26日受理

Immunohistochemical Study of Expression of Tumor Suppressor Gene p53 Protein in Oral Squamous Cell Carcinoma

Ichiro Suenaga

Second Department of Oral Surgery (Director: Prof. Minoru Kajiyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

In a variety of human carcinoma, mutations of the tumor suppressor gene p53 protein occur frequently and may lead to overexpression of a long-lived mutant form of p53 protein.

Using specific monoclonal antibodies, a total of 53 oral squamous cell carcinoma (SCC) were examined immunohistochemically for the expression of p53 protein.

The results were as follows :

- 1) Expression of p53 protein was detected in 29 cases out of 53 cases (54.7%) of oral SCC.
- 2) In primary site, expression of p53 protein was frequently seen in tongue cancer (70.6%).
- 3) In oral SCC, there was no significant correlation between the expression of p53 protein and the stage of the disease, the TNM status. However, the incidence of p53 protein expression correlated significantly with lymph node metastasis.
- 4) In oral SCC, no correlation was seen between p53 protein expression and the histological differentiation, the mode of invasion.
- 5) Expression of p53 protein correlated with the grade of malignancy.
- 6) These results suggest that alteration of p53 gene appears common in oral SCC, and the p53 protein detection by immunohistochemically method was valuable for assessment of the early recurrence, prognosis of patients, and proliferative activity and more aggressiveness with oral SCC.

Key words : P53 protein / Oral squamous cell carcinoma / Immunohistochemistry

緒 言

細胞分子生物学の進歩にともない、ヒトの様々な癌細胞における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の研究が行われ、発癌や癌の進展との関連性が解明されつつある¹⁾。そのうち、癌抑制遺伝子は主に一方の対立遺伝子の欠失、および他方の点突然変異により、その機能を失うとされている²⁻⁴⁾。とくに、ヒト p53遺伝子は17番染色体の短腕に位置し、そのヘテロ接合性の消失およびその遺伝子の変異が大腸癌^{5,6)}、肺癌⁷⁻⁹⁾、乳癌¹⁰⁾をはじめとする多くの悪性腫瘍において高率にみられ、その異常発現が認められている^{11,12)}。この p53遺伝子は分子量 53000 の蛋白で、正常細胞にみられる野生型 p53と、癌細胞などにみられる変異型 p53とに分けられている¹³⁾。そのうち野生型の p53は癌抑制遺伝子としての作用が確認されているが、その量も少なく、半減期は数分と短く^{14,15)}、これに対し、変異型の p53は heat shock protein と結合することにより安定性が保たれ、発癌作用を促進すると考えられている¹⁶⁻¹⁸⁾。また、変異型 p53は細胞周期を調節し、腫瘍増殖にも密接に関与するとされている^{11,12)}。口腔領域の扁平上皮癌における p53の解析は、扁平上皮癌由来の細胞株を用いた研究が散見され、p53の変異が腫瘍発生のみならず増殖にも関連していることが示唆されている¹⁹⁾。しかしながら、口腔扁平上皮癌組織を用いた免疫組織化学的な報告はほとんどみられない。

そこで、筆者は口腔扁平上皮癌において、p53蛋白の異常発現を免疫組織化学的に検出し、様々な臨床、病理組織学的な因子との関連性を検索し、知見を得たので、その成績を報告する。

対象症例ならびに研究方法

A. 対象症例

1989年から1994年までの過去5年間に当科を受診し、病理組織学的に口腔扁平上皮癌と診断された一次症例・53症例を対象とした。

発現部位は上顎歯肉 22例 (41.5%)、舌 17例 (32.1%)、下顎歯肉 12例 (22.6%)、頬粘膜 2例 (3.8%) であった (Table 1)。また、発現年齢では37歳から89歳までの広範囲におよんでいたが、30代 4例 (7.5%)、40代 8例 (15.1%)、50代 7例 (13.2%)、60代 21例 (39.6%)、70代 10例 (18.9%)、80代 3例 (5.7%) で、60代に多くみられ、その平均年齢は60.7歳であった。なお、性別は男性 33例 (62.3%)、女性 20例 (37.2%) で、それぞれの平均年齢は男性 60.8歳、女

Table 1 Anatomic site of primary lesion in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

Anatomic site	Cases
Gingiva of maxilla	22 (41.5)
Tongue	17 (32.1)
Gingiva of mandible	12 (22.6)
Buccal mucosa	2 (3.8)

() : %

Table 2 Distribution of age in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

Age	Cases
30 -	4 (7.5)
40 -	8 (15.1)
50 -	7 (13.2)
60 -	21 (39.6)
70 -	10 (18.9)
80 -	3 (5.7)

() : %

性 60.7歳であった (Table 2)。

B. 研究方法

1. 病理組織学的な検索方法

研究材料には病巣の周辺部粘膜を含めた生検組織片、および病巣を中心とした周囲組織を含めて外科的に切除された粘膜組織片を用いた。採取後ただちに10%の中性緩衝ホルマリン水溶液に固定後、通法のごとくパラフィン包埋を行い、5μmの薄切連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下 HE 染色と略す) を施し、病理組織学的に観察を行った。

口腔扁平上皮癌の分化度は WHO (1971)²⁰⁾ の基準に従い、高分化型 (癌巣内部に角化した癌真珠の形成がみられ、細胞間橋は比較的明瞭、分裂細胞は少数で、細胞異型性はほとんど認められない)、中等度分化型 (腫瘍細胞の角化や癌真珠の形成は少なく、細胞間橋は不明瞭、細胞分裂は中等度で、細胞異型性は少ない)、低分化型 (腫瘍細胞の角化や細胞間橋などの分化傾向はみられず、腫瘍細胞核の異常分裂が多く、細胞異型性は高度である) の3型とした。また、浸潤様式は山本・小浜分類 (1982)²¹⁾ に従い、5型に分類した。すなわち、1型: 腫瘍との境界が明瞭である、2型: 境界線にやや乱れがある、3型: 境界線は不明瞭で大小の腫瘍巣が散在している、4C型 (索状型): 境界線は不明瞭で小さな

Table 3 Histological grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma

Histological findings	Points					
	0	1	2	3	4	5
Differentiation		Well	Moderately	Poorly		
Mode of invasion		1	2	3	4c	4d
Cellular atypia		+	++	+++		
Mitotic figures	+	++	+++			
Inflammatory infiltration		+++	++	+		
Necrotic tendency		+	++	+++		
Invasive tendency		+	++	+++		
Vascular permeation	Negative		Positive			

Grade I: 6-8
 Grade II: 9-12
 Grade III: 13-16
 Grade IV: 17-20
 Grade V: 21-24

Table 4 Immunohistochemical methods

腫瘍細胞が索状に浸潤、増殖している、4D型（び漫型）：境界線は不明瞭で腫瘍は細胞をつくらず、び漫性に浸潤、増殖している、の5型である。さらに、組織学的悪性度を Jakobsson ら（1973）²²⁾ の基準を参考にした点数評価にて、Grade 1 から Grade 5 までの5段階評価を行い、Grade 1 と Grade 2 を低悪性型、Grade 3 を中等度悪性型、Grade 4 と Grade 5 を高悪性型と評価し

た（Table 3）。

2. 免疫組織化学的な検索方法

採取した組織片の標本を通常法のごとく、脱パラフィン後、親水化した検体に抗血清（DAKO 社製）を用いた間接酵素抗体法、すなわち Peroxidase-Anti-peroxidase Method（PAP 法）を改良した Labelled Streptavidin Biotin Method（LSAB 法）により、一次抗体にモノクローナル抗p53蛋白抗体（BP53-12、日本ターナー社製）を100倍希釈して、免疫組織染色を行った（Table 4）。また、判定には山際ら（1993）²³⁾ の基準を参考にして、腫瘍細胞の少数でも陽性のものがあれば陽性（+）とし、染色されないものや不明瞭のものは陰性（-）とした。

なお、統計学的な有意差は χ^2 検定および、一般化 Wilcoxon 検定によった。

研究成績

A. 臨床的な研究成績

口腔扁平上皮癌 53 症例の TNM 分類（UICC, 1987）²⁴⁾ をみると、T 分類では T1（腫瘍の大きさが 2 cm 以下）が 21 例（39.6%）、T2（腫瘍の大きさが 2 cm を越え、4 cm 以下）が 20 例（37.7%）、T3（腫瘍の大きさが 4 cm を越えるもの）が 5 例（9.4%）、T4（腫瘍の大きさに関係なく、腫瘍が隣接組織に浸潤したもの）が 7 例（13.3%）であった（Table 5）。また、N 分類では N0（所属リンパ節に転移を認めない）が 35 例（66.0%）、N1（患側の所属リンパ節に 3 cm 以下で、一個の転移が認められる）が 17 例（32.1%）、N2（患側のリンパ節に 6 cm 以下で、一個の転移が認められる）が 1 例（1.9%）であった（Table 6）。なお、M 分類では全症

Table 5 T classification in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

T classification	Cases
T 1	21 (39.6)
T 2	20 (37.7)
T 3	5 (9.4)
T 4	7 (13.3)

() : %

Table 6 N classification in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

N classification	Cases
N 0	35 (66.0)
N 1	17 (32.1)
N 2	1 (1.9)

() : %

Table 7 Stage classification in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

Stage	Cases
I	19 (35.9)
II	13 (24.5)
III	13 (24.5)
IV	8 (15.1)

() : %

例が M0 (遠隔転移を認めない) であった。

Stage 分類をみると, Stage I が 19 例 (35.9%), Stage II が 13 例 (24.5%), Stage III が 13 例 (24.5%), Stage IV が 8 例 (15.1%) となり, 早期癌が多くなっていった (Table 7)。

B. 病理組織学的な研究成績

WHO (1971)²⁰⁾ 分類による癌胞巣部の分化度をみると, 多数の癌真珠と細胞間橋の明瞭な高分化型が 54 症例のうち 36 例 (67.9%) で, 上皮真珠がほとんど認められず, 腫瘍細胞の角化や細胞間橋の不明瞭な中等度分化型が 15 例 (28.3%), 上皮真珠がなく, 角化細胞がわずかにみられ, また細胞間橋の認められない低分化型が 2 例 (3.8%) であった (Table 8)。

また, 山本・小浜分類 (1982)²¹⁾ による腫瘍の浸潤様式をみると, 1 型が 1 例 (1.9%), 2 型が 9 例 (17.0%), 3 型が 28 例 (52.8%), 4 C 型が 7 例

Table 8 Tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

Differentiation	Cases
Well	36 (67.9)
Moderately	15 (28.3)
Poorly	2 (3.8)

() : %

Table 9 Histological malignancy in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53cases)

Mode of invasion	Cases
1	1 (1.9)
2	9 (17.0)
3	28 (52.8)
4C	7 (13.2)
4D	8 (15.1)

() : %

Table 10 Histological grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53 cases)

Grading of malignancy	Cases
1	3 (5.7)
2	18 (33.9)
3	18 (33.9)
4	11 (20.8)
5	3 (5.7)

() : %

Table 11 Histological type of malignancy in oral squamous cell carcinoma (1989-1994, 53 cases)

Type of malignancy	Cases
Low grade	21 (39.6)
Moderate grade	18 (33.9)
High grade	14 (26.5)

() : %

(13.2%), 4D 型が 8 例 (15.1%) となり, 腫瘍の境界線が不明瞭で, 大小の腫瘍胞巣が散在 (3 型) しているか, あるいは腫瘍胞巣が索状に浸潤, 増殖 (4C, 4D 型) しているものが多くみられた (Table 9)。

Photo. 1 Well differentiated oral squamous cell carcinoma ($\times 148$)

a : stained with HE

b : showing positive staining with p53 protein

c : showing positive staining with p53 protein

Photo. 2 Moderately differentiated oral squamous cell carcinoma ($\times 148$)

a : stained with HE

b : showing positive staining with p53 protein

c : showing positive staining with p53 protein

Photo. 3 Poorly differentiated oral squamous cell carcinoma ($\times 148$)

a : stained with HE

b : showing positive staining with p53 protein

c : showing positive staining with p53 protein

一方、組織学的な悪性度は Grade 1 が 3 例 (5.7%), Grade 2 が 18 例 (33.9%), Grade 3 が 18 例 (33.9%), Grade 4 が 11 例 (20.8%), Grade 5 が 3 例 (5.7%) で、低悪性が 21 例 (39.6%), 中等度悪性が 18 例 (33.9%), 高悪性が 14 例 (26.5%) であった (Table 10, 11).

C. 免疫組織化学的研究成績

1. p53蛋白の局在性

p53蛋白は扁平上皮癌細胞の核内に茶褐色の顆粒状に認められた。とくに、分化傾向の強い扁平上皮癌において、p53蛋白は胞巣中央における角化部の細胞核では染色されず、胞巣周辺の基底細胞様細胞層に陽性を示す細胞が多くみられた。一方、分化傾向の低い扁平上皮癌では、胞巣内において散在性あるいはび漫性に陽性を示す細胞が多く認められた (Photo 1-9)。

2. p53蛋白の発現率

口腔扁平上皮癌 53 症例のうち、p53蛋白陽性例は 29 症例 (54.7%) であった。以下、臨床的な諸因子および病理組織学的な諸因子との関連性について、それぞれ検討した。

1) 臨床的な諸因子と p53蛋白の発現について

a) 発現年齢および性別について

発現年齢を 65 歳未満の青壮年 (A 群, $n=30$) と 65 歳以上の高齢者 (B 群, $n=23$) との分けて p53蛋白の発現率を検討した。その結果、A 群での p53蛋白の発現率は 66.7% (20 / 30 例) であったのに対し、B 群では

Fig. 1 Relation between expression of p53 protein and age in patients with oral squamous carcinoma

Fig. 2 Relation between expression of p53 protein and sex in patients with oral squamous cell carcinoma

39.1% (9 / 23 例) となり、青壮年者の口腔扁平上皮癌に高い発現率を示していた ($P < 0.01$) (Fig. 1). また、性別での p53蛋白の発現率は、男性が 51.5% (17 / 33 例) で、女性が 60.0% (12 / 20 例) となり、性別による明らかな有意差は認められなかった (Fig. 2).

b) 発現部位について

p53蛋白の発現率を部位別にみると、上顎歯肉癌では 36.4% (8 / 22 例)、舌癌では 70.6% (12 / 17 例)、下顎歯肉癌では 58.3% (7 / 12 例) となり、例数の少ない頬粘膜癌を除けば、舌癌や下顎歯肉癌では上顎歯肉癌に比較して、p53蛋白発現率の高い傾向が認められた。とくに、舌癌では高い発現率を示していた ($P < 0.01$, Fig. 3).

c) TNM 分類および Stage 分類について

腫瘍の大きさによる p53蛋白の発現率は、T1 が 66.7% (14 / 21 例)、T2 が 50.0% (10 / 20 例)、T3 が 40.0% (2 / 5 例)、T4 が 42.9% (3 / 7 例) となり、腫瘍の大きさによる p53蛋白の発現に有意な差異はみられなかったが、比較的小さな初期癌に p53蛋白の発現率が高く認められた (Fig. 4). また、所属リンパ節転移の

Fig. 3 Relation between expression of p53 protein and primary tumor site in patients with oral squamous cell carcinoma

Fig. 4 Relation between expression of p53 protein and T classification in patients with oral squamous cell carcinoma

有無による p53 蛋白の発現率をみると, N0 が 51.4% (18 / 35 例), N1 あるいは N2 が 61.1% (11 / 18 例) となり, 所属リンパ節転移の陽性例において, p53 蛋白発現の高い傾向がうかがわれ, p53 蛋白の発現が予後を左右する因子であることが示唆された ($P < 0.01$, Fig. 5).

一方, 病期による p53 蛋白の発現をみると, Stage I が 63.2% (12 / 19 例), Stage II が 38.5% (5 / 13 例), Stage III が 61.5% (8 / 13 例), Stage IV が 50.0% (4 / 8 例) となり, 病期による特別な傾向はみられず, また, 初期癌と進行癌においても有意な差異は認められなかった (Fig. 6).

d) 予後および生存率について

Fig. 5 Relation between expression of p53 protein and N classification in patients with oral squamous cell carcinoma

Fig. 6 Relation between expression of p53 protein and stage classification in patients with oral squamous cell carcinoma

Fig. 7 Relation between expression of p53 protein and prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma

口腔扁平上皮癌患者 53 症例を, 治療終了後より現在までに再発や転移がみられない経過良好例 ($n = 37$) と, 再発や転移が認められる担癌状態, あるいは死亡した経過不良例 ($n = 16$) とに分けて, p53 蛋白の発現率を検討した. その結果, 経過良好例での p53 蛋白の発現率は 51.4% (19 / 37 例) であったのに対し, 経過不良例では 62.5% (10 / 16 例) となり, 明らかな有意差は認められなかったものの, 予後不良例に p53 蛋白の発現率の高い傾向がみられた (Fig. 7).

Fig. 8 Survival rate in regard to detection of p53 protein (Kaplan-Meier method)

Fig. 9 Relation between expression of p53 protein and tumor differentiation in patients with oral squamous cell carcinoma

Fig. 10 Relation between expression of p53 protein and Y-K classification in patients with oral squamous cell carcinoma

そこで、口腔扁平上皮癌患者 53 症例の治療成績を Kaplan-Meier 法を利用して、5 年生存率を算出し、p53 蛋白の発現率との関連性を検討した。その結果、p53 蛋白発現の陰性例では 5 年生存率が 71.6% であったのに対し、p53 蛋白発現の陽性例では 5 年生存率が 63.4% となり、p53 蛋白の発現している症例では治療成績が不良で、生存率の低下する傾向がうかがわれた (Fig. 8)。

2) 病理組織学的な諸因子と p53 蛋白の発現について

a) 分化度について

口腔扁平上皮癌の分化度を WHO (1971)²⁰⁾ の基準にしたがい分類し、p53 蛋白の発現率を検討した。すなわち、高分化型では 55.6% (20 / 36 例)、中等度分化型は 53.3% (8 / 15 例)、低分化型は 50.0% (1 / 2 例) となり、分化度による有意な差異は認められず、p53 蛋白の発現率と分化度とに、明らかな関連性は認められなかった (Fig. 9)。

b) 腫瘍の浸潤様式について

口腔扁平上皮癌における腫瘍先端部の浸潤様式による p53 蛋白の発現を検討した。その結果、1 型が 100% (1 / 1 例)、2 型が 66.7% (6 / 9 例)、3 型が 42.9% (12 / 28 例)、4C 型が 71.4% (5 / 7 例)、4D 型が

62.5% (5 / 8 例) となり、p53 蛋白発現の浸潤様式による明らかな有意差は認められなかった (Fig. 10)。

c) 組織学的悪性度による p53 蛋白の発現

口腔扁平上皮癌 53 症例を、Jakobsson ら (1973)²²⁾ の基準として、壊死因子を加え、スコアの一部を改変した評価法にて、組織学的悪性度を 5 段階評価し、p53 蛋白の発現率を検討した。その結果、Grade 1 では 100% (3 / 3 例)、Grade 2 が 44.4% (8 / 18 例)、Grade 3 が 44.4% (8 / 18 例)、Grade 4 が 81.8% (9 / 11 例)、Grade 5 が 33.3% (1 / 3 例) となり、Grade 4 での p53 蛋白の発現率が高くなっていた。そこで、この悪性度を低悪性型 (Grade 1, Grade 2)、中等度悪性型 (Grade 3)、高悪性型 (Grade 4, Grade 5) の 3 段階に区分して、p53 蛋白の発現率を検討した。すなわち、低悪性型が 52.4% (11 / 21 例)、中等度悪性型が 44.4% (8 / 18 例)、高悪性型が 71.4% (10 / 14 例) となり、高悪性型は中等度悪性型や低悪性型に比べ、統計学的にも有意に高い p53 蛋白の発現率が認められた ($p < 0.01$) (Fig. 11, 12)。

総括ならびに考察

悪性腫瘍において、細胞分子生物学、細胞工学、あるいは遺伝子工学などの進歩にともない、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の研究が盛んに行われ、癌化の過程、癌の浸潤や転移の機構が解明されつつある¹⁻⁴⁾。とくに、腫瘍発生においては、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などのような細胞増殖や分化、発生に関与している重要な遺伝子の DNA レベルでの多段階にわたる変異の蓄積が重要とされている¹³⁾。なかでも、癌化については、initiation, promotion, progression などのいくつかの段階を経る必要があり、これらの過程において、複数の癌遺伝子、癌抑制遺伝子、腫瘍増殖因子などが複雑に関与しているものと考えられている²³⁾。

これまでに、癌の関連遺伝子としては、1) 腫瘍細胞増殖因子とされている C-sis, C-hst など、2) 細胞表面に存在する増殖因子の受容体に関連する遺伝子である C-erbB-1, C-erbB-2, 3) 腫瘍細胞膜の内側に存在する C-H-ras, C-K-ras, N-ras などの遺伝子産生物質が CTPase 活性を有するもの、4) 細胞質に存在する蛋白セリンスレオニン活性酵素の遺伝子である C-myc, C-fas のような、その遺伝子産物が核内に存在するもの、5) p53 のような癌抑制遺伝子、などが知られている²³⁻²⁵⁾。

そのうち、ヒト p53 遺伝子は 17 番染色体の短腕に位

Fig. 11 Relation between expression of p53 protein and histological grading of malignancy in patients with oral squamous cell carcinoma

Fig. 12 Relation between expression of p53 protein and histological type of malignancy in patients with oral squamous cell carcinoma

置し、そのヘテロ接合性の消失、一方の対立遺伝子の消失、他方の遺伝子の点突然変異により、その機能を失うとされ¹⁾、大腸癌^{5,6)}、肺癌⁷⁻⁹⁾、乳癌¹⁰⁾をはじめとする数多くの悪性腫瘍において、高率にその異常発現が証明されている^{11,12)}。また、p53 遺伝子の変異型は癌化に深く関与するのみならず、癌の浸潤、増殖にも関連していることが示唆されている^{1,4,12)}。しかしながら、口腔領域における悪性腫瘍、とくに口腔扁平上皮癌における p53 遺伝子の免疫組織化学的な検索はほとんど認められていないのが現状である。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌を対象として、p53 遺伝子の異常発現を免疫組織化学的に検出し、様々な臨床的な因子および病理組織学的な因子との関連性を検索した。

p53 蛋白について

1979 年に癌遺伝子の一つとして発見された p53 遺伝子は SV40 で transform されたマウスの細胞を抗 SV40 抗体で免疫沈降された分子量 53000 の蛋白で、正常細胞でみられる野性型 (正常型) の p53 遺伝子と、癌細胞でみられる変異型の p53 遺伝子とに分けられている²⁻⁴⁾。その後の研究において、正常な p53 遺伝子は活性 ras + myc、活性 ras + E1A、活性 ras + 変異 p53 の協同作用による transformation を抑制することが確認され、細胞を不死化させる癌遺伝子であることのみならず、癌抑制遺伝子の可能性が示唆された^{13,16-18)}。さらに、染色体 17p の p53 遺伝子領域での欠失 (loss of heterozygosity; LOH) および p53 遺伝子の変異が大腸癌をはじめ多くの悪性腫瘍で発見された^{3,4)} こと、また、変異 p53 遺伝子が Li-Fraumeni 症候群の原因遺伝子であることが証明された²⁾ ことなどから、重要な癌抑制遺伝子と考えられるようになった²⁶⁾。

正常型の p53 遺伝子の機能としては、1) 遺伝子の転写を活性化あるいは抑制する、2) 正常型 p53 遺伝子の cDNA を癌細胞で多量に強制発現させると、細胞増殖が停止する、3) X 線などによる DNA 損傷において正常型 p53 遺伝子が誘導され、細胞周期が停止するとともに、アポトーシスが起こる場合もあり、p53 遺伝子がアポトーシスに関与することが示唆されている、などが解明されている¹³⁾。さらに、p53 遺伝子の変異と欠失により不活性化されると、細胞周期の制御がなくなり細胞の不死化とともに染色体の数の異常も引き起こされると考えられている^{2-4,13)}。すなわち、変異型の p53 遺伝子は正常型の p53 遺伝子が有する癌抑制活性を失っており、癌化や増殖に密接に関連している。

p53 遺伝子の変異型は野性型に対して劣性であるた

め、異常が発現するためには少なくとも 2 つの変異が必要とされている¹³⁾。すなわち、1) p53 遺伝子が存在する 17p の領域にヘテロ接合の消失 (LOH) が起こること、2) 残存する p53 対立遺伝子に点突然変異が生じること、である。また、p53 遺伝子に変異が起こると、変異型の p53 蛋白が生じ、癌細胞に多量に蓄積する性質が認められている^{1,3,4)}。これらの変化を検出するためには、分子生物学的な方法、すなわち、p53 蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学的な方法で p53 遺伝子の異常が推定できるとされている²⁷⁾。とくに正常型の p53 蛋白の半減期が 6-30 分と短いのに対し、変異型の p53 蛋白の半減期は 1.5-7 時間となり、また、変異型の p53 蛋白は他の蛋白と複合体を形成することにより安定化しているため、容易に細胞内に蓄積するものと考えられている¹⁻³⁾。したがって、正常型の p53 蛋白を検出できない抗体でも、蓄積された変異型の p53 蛋白を検出できることから、抗 p53 抗体によって認識される核内の蛋白質は変異型の p53 蛋白と考えられ、p53 遺伝子に異常が生じているものと推定される。

一方、変異型 p53 蛋白の局在性について、癌細胞の核内に茶褐色で顆粒状に染色され、石戸谷ら (1993)²⁸⁾ は頭頸部扁平上皮癌において、とくに浸潤部の基底層を中心とした核内に一致して、広範囲に変異型 p53 蛋白の局在を認めたと報告している。また、辻ら (1993)²⁹⁾ は口腔扁平上皮癌における癌巣周囲部の腫瘍細胞に変異型 p53 蛋白を認め、とくに浸潤性の増殖を示す腫瘍細胞に高頻度に検出されると述べている。本研究でも、石戸谷ら (1993)²⁸⁾、辻ら (1993)²⁹⁾ らとほぼ同様に、口腔扁平上皮癌細胞の核内に茶褐色の顆粒状に染色され、癌巣周囲の基底細胞様細胞層に陽性を示す細胞が多くみられた。また、分化傾向が低く、浸潤傾向の強い扁平上皮癌では、癌巣内に散在性、あるいはび漫性に陽性を示す細胞が多数認められた。したがって、p53 癌抑制遺伝子は口腔扁平上皮癌においても、他の悪性腫瘍と同様に、その変異が起こっていることが推察され、悪性化や癌化に関与していることが示唆された。

p53 蛋白の発現率について

他科領域の悪性腫瘍における p53 蛋白の発現率について、胃癌で 30 ~ 54%^{1,11,12)}、大腸癌で 46.5 ~ 61.5%^{5,6)}、肺癌で 49%⁹⁾、乳癌で 23 ~ 42.2%¹⁰⁾、卵巣癌で 50%^{1,23)}、子宮頸部腺癌で 14.6%¹²⁾ とそれぞれ報告されている。一方、口腔扁平上皮癌における p53 蛋白の発現率については、Gusterson ら (1991)³⁰⁾ は 34.0% (16 / 47 例) であったと報告し、新谷ら (1992)³¹⁾ は 40.2% (43

/ 107 例), 西岡ら (1993)³²⁾ は 52.5% (21 / 40 例), 石戸谷ら (1993)²⁸⁾ は 48.0% (12 / 25 例), 辻ら (1993)²⁹⁾ は 22.6% (33 / 146 例) であったと, それぞれ報告している. 本研究における p53 蛋白の発現率は 54.7% (29 / 53 例) となり, 諸家の研究成績とほぼ類似していた. しかしながら, 使用した一次抗体の種類, 濃度, 温度環境, 作用時間などに差異がみられ, 単純に比較はできず, 辻ら (1993)²⁹⁾ が述べているように, これらの染色条件の相違が p53 蛋白の発現率に影響している可能性があり, 今後, より統一的な方法と手技的な改善とが望まれる.

また, 発現率の評価方法も様々で, 統一されていない. すなわち, 新谷ら (1992)³¹⁾ は発現率の評価を行っておらず, 西岡ら (1993)³²⁾ は約 200 個の細胞核を観察し, 褐色に染色された核質を認めないものを陰性 (−), 39% 以下を陽性 (+), 40% 以上を強陽性 (2+) と判定している. また, 石戸谷ら (1993)²⁸⁾ は 100 倍の視野で腫瘍細胞にはほぼ一様に染色が見られる場合を強陽性 (2+), 一部の腫瘍細胞にはっきりした染色の見られる場合を陽性 (+), それ以外を陰性 (−) としている. さらに, 辻ら (1993)²⁹⁾ は肉眼的な観察では疲労や観察者の相違が影響し, 再現性や普遍性に乏しいことから, 画像解析装置により細胞数を計数し, p53 蛋白発現率を評価している. なお, 他科領域での評価方法をみると, 山際ら (1993)²³⁾ は胃癌において, 少数でも陽性のものがあれば陽性とし, 染色されないものや不明瞭なものは陰性としている. また, 宮内ら (1993)⁶⁾ は舌, 食道および消化器癌において, 100 倍の視野中で約 80% 以上の腫瘍細胞が陽性の場合を (3+), 約 50% 前後の腫瘍細胞が陽性の場合を (2+), 約 20% 以下の腫瘍細胞が陽性の場合を (+), 陽性の腫瘍細胞が見られない場合を (−) とし, 永井ら (1994)¹²⁾ は子宮頸部腺癌において, 細胞核の一部でも染色される場合を陽性と判定している. このように, 評価方法は各施設において様々な方法が行われ, 重要な問題である. 本研究では, 当初 (2+), (+), (−) の 3 段階評価を行ったが, 臨床的および病理組織学的な諸因子との関連性について検討を行う際に, それぞれの症例数が少なく再現性に乏しいこと, また, 陽性例を 2~3 段階に分類しても臨床的には有用性がないことなどから, 山際ら (1993)²³⁾ の評価方法を参考として, 腫瘍細胞核の少数でも染色されているものがあれば陽性とし, 染色されていないものや不明瞭なものを陰性と判定した. しかしながら, 評価方法によっては, 発現率にかなりの差異が生じてくるため, 今

後, より詳細で統一的な評価方法の改善が必要と思われる.

臨床的な諸因子との関連性について

発現年齢と性別による p53 蛋白の発現率について, 頭頸部領域における悪性腫瘍での詳細な検討は見受けられないが, 大野 (1993)¹⁾ は胃癌において, 男性 41%, 女性 50% で有意な差異を認めなかったとし, また 65 歳未満で 43%, 65 歳以上で 45% となり, 発現年齢による差異はみられなかったと報告している. 本研究では, p53 蛋白の発現率は男性が 51.5%, 女性が 60.0% となり, 性別による有意な差異は認められなかった. しかしながら, 65 歳未満での p53 蛋白の発現率は 66.7% で, 65 歳以上では 39.1% となり, 青壮年者の口腔扁平上皮癌患者において, 明らかに高い発現率を示していた. この成績についての明確な評価を見い出せなかったが, 一般的に, 高齢者の癌に比べ若年者の癌の方が, 増殖や浸潤速度が早く予後が悪いとされていることからすれば, 変異型 p53 蛋白の発現が腫瘍の速度に何らかの影響をおよぼしているのではないかと推察される.

p53 遺伝子の変異は頭頸部扁平上皮癌においては, その発生部位にかかわらず, 高率にみられる変化と考えられている. しかしながら, 宮内ら (1993)⁶⁾ は p53 蛋白発現率は舌癌で 21.4%, 食道の扁平上皮癌で 66.7% となり, 遺伝子産物発現の変化には臓器特異性のあることを示し, 腫瘍母細胞の生理的機能特性を反映している可能性があるとして述べている. また, 西岡ら (1993)³²⁾ は口腔扁平上皮癌において, 舌癌が 81%, 口底癌が 67%, 歯肉癌が 23% となり, p53 蛋白の発現が舌癌に高頻度に見られたと報告している. 本研究でも, 舌癌で 70.6%, 歯肉癌で 44.1% となり, 西岡ら (1993)³²⁾ と同様に, 舌癌での高い p53 蛋白の発現率が認められた. したがって, 口腔扁平上皮癌では舌で p53 蛋白の発現が高頻度であるという原発部位での特異性がみられたが, その原因を明確にすることはできなかった.

p53 蛋白の発現率と臨床病期との関連性について, 新谷ら (1992)³¹⁾ は臨床病期とに相関性は認められなかったと報告している. また, 石戸谷ら (1993)²⁸⁾ は病期やリンパ節転移との間に有意な差異は見られなかったが, 腫瘍の広がりについては, 腫瘍が大きくなるにつれて p53 蛋白の発現率が増していたと報告し, 頭頸部扁平上皮癌における p53 遺伝子の変異は転移の有無と関係ないが, 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と述べている. さらに, 西岡ら (1993)³²⁾ は癌増殖の比較的早期において p53 蛋白の発現がみられ, 癌

細胞増殖過程への関連性が示唆されると述べている。本研究では、腫瘍の大きさにおいて比較的早期の小さい癌に p53蛋白の発現がみられ、リンパ節転移の陽性例に高い発現率が認められた。しかしながら、病期による特別な傾向はみられず、また初期癌と進行癌においても、有意な差異は認められなかった。

一方、予後との関連性について、これまでの報告からすれば、関連性があるとする報告あるいは関連性がないとする報告とが様々で、一定していない²⁸⁻³²⁾。本研究では、予後不良例において p53蛋白の発現が高い傾向がみられ、また生存率においても、明らかな有意差はみられなかったが、p53蛋白の発現例では治療成績が不良である傾向が認められた。

以上の研究成績からすれば、p53遺伝子の変異は病期や転移などの予後因子とに関連性がある程度みられるものの、むしろ癌化過程における役割が重要と考えられる。すなわち、口腔扁平上皮癌の発生過程において、p53遺伝子は比較的早い段階で変異を生じ、悪性化や癌化に関与している可能性が示唆され、悪性化能の指標となりうるものと思われる。

組織学的な諸因子との関連性について

p53蛋白の発現率と口腔扁平上皮癌の分化度との関連性について、新谷ら (1992)³¹⁾ は低分化型で 34%、中等度型で 44%、高分化型で 56% となり、組織学的に分化度が低くなるにともない、p53蛋白の発現例が多くなる傾向を認めたと報告している。また、西岡ら (1993)³²⁾ は低分化型の p53蛋白の発現率は高分化型よりやや高く、組織分化度と p53蛋白発現率は逆相関していることが考えられると述べている。一方、石戸谷ら (1993)²⁸⁾ は p53蛋白の発現率は高分化型でも低分化型でも同頻度にみられ、組織分化度には関与していないと考えられると述べている。本研究でも、分化度にかかわらず、ほぼ一定の p53蛋白の発現率を示しており、分化度との関連性を認めなかった。

p53蛋白の発現率と浸潤様式腫瘍との関連性について、辻ら (1993)²⁹⁾ は浸潤性の増生を示す腫瘍細胞に高頻度に検出されると述べ、西岡ら (1993)³²⁾ は Willen ら (1975)³³⁾ の分類にしたがって検討した結果、最も浸潤傾向の強い 4 型において、やや高い発現率を認めたと報告している。本研究では、山本・小浜 (1982)²¹⁾ 分類にしたがって検討を試みたが、4c、4d 型において p53蛋白の発現率が高い傾向を示していたことから、浸潤能との関連性が示唆された。

組織学的な悪性度については、周囲組織への浸潤能

と、転移形成能、細胞異型度などさまざまな要因との関連性が報告されている。また、腫瘍本来の増殖能も悪性度の重要な因子の 1 つとされている³⁴⁾。したがって、腫瘍の悪性度を判定することは局所の再発や転移、あるいは経過や予後の推測が可能で、さらには治療法の選択においても重要な因子と考えられる。本研究において、組織学的悪性度を Jakobsson ら (1973)²²⁾ の基準を参考にして、p53蛋白の発現率と組織学的悪性度との関連性を検討したが、口腔扁平上皮癌の高悪性型は中等度悪性型や低悪性型より、有意に高い p53蛋白の発現率を示していたことから、組織学的悪性度との相関性が示唆され、とくに高悪性型の指標になりうるものと考えられる。

以上の研究成績からすれば、p53蛋白の発現率は臨床的な病期とは無関係で、むしろ組織学的悪性度との相関性が重要と思われ、口腔扁平上皮癌の組織学的特徴をよく反映しているものと考えられる。

臨床的な有用性について

悪性腫瘍組織内の p53蛋白発現の臨床応用の可能性として、山口ら (1992)⁵⁾ は大腸癌において、組織型、腫瘍径、深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移などとの相関性は認められなかったが、多変量解析による p53蛋白の発現は肝転移、組織型、脈管侵襲と有意な予後規定因子であることが示されたと述べている。また、新谷ら (1992)³²⁾ は口腔扁平上皮癌において、p53蛋白の発現は腫瘍部のみに染色され、被覆する正常な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有していることから、腫瘍の範囲を把握する指標になり、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と述べている。さらに、高橋 (1994)⁴⁾ は肺癌症例において、p53遺伝子の異常を示す症例は有意に短い手術後の生存期間を示し、病期とは独立した重要な予後因子であり、肺癌手術後患者における高危険群の同定に有用であると述べている。本研究でも、p53蛋白の発現は腫瘍の大きさや臨床病期に関係なく、リンパ節転移、治療成績などの予後因子との関連性がみられ、また、浸潤能や悪性度との関連性も示唆されたことから、p53蛋白の発現を検索することは浸潤、増殖能を知り、加えて腫瘍組織における悪性度を判別し、化学療法、放射線療法における有効性を示唆し、一方では、その染色手技も比較的容易で、日常臨床的な予後の指標として極めて有用と考えられる。

結 論

1989年から1994年までの過去5年間に、当科を受診し、病理組織学的に診断された口腔扁平上皮癌53例について、抗p53蛋白抗体を用いた免疫組織化学的な検索を行い、以下の成績を得た。

1) 口腔扁平上皮癌におけるp53蛋白の発現率は54.7% (29/53例) であった。

2) 発現部位におけるp53蛋白の発現率では、舌癌が70.6%と高い発現率を示していた。

3) 口腔扁平上皮癌におけるp53蛋白の発現率は、臨床的なT分類やStage分類などとの関連性は認められなかったが、リンパ節転移との関連性が示唆された。

4) 口腔扁平上皮癌の組織学的な分化度との関連性はみられず、浸潤様式では山本・小浜分類における4C型、4D型では、p53蛋白の発現率が高くなる傾向がみられた。

5) p53蛋白の発現は臨床的なTNM分類、Stage分類において、直接的な関連性はみられなかったが、組織学的悪性度をよく反映していた。

以上の研究成績から、p53蛋白の発現を検索することは口腔扁平上皮癌において、腫瘍の浸潤、増殖能や悪性度の評価、さらには予後の推定に極めて有用であることが明らかであった。

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜った恩師梶山 稔教授に深甚なる感謝の意を表わします。また、種々ご教示を戴いた黒川英雄助教授に感謝するとともに、ご協力戴いた村田朋之大学院生ならびに教室員諸兄に謝意を表わします。

引用文献

- 1) 大野博之：ヒト胃癌組織における癌抑制遺伝子p53の発現に関する免疫組織学的検討。東医大誌 51：153-163, 1993.
- 2) 大川恵三, 横田 淳：癌抑制への情報伝達系—p53と癌化。実験医学 13：1717-1720, 1991.
- 3) 宮本美知子：p53。医学のあゆみ 171：380-382, 1994.
- 4) 高橋 隆：肺癌におけるp53遺伝子異常。医学のあゆみ 171：483-485, 1994.
- 5) 山口明夫, 伏田幸夫, 黒阪慶幸, 神野正博, 米村 豊, 宮崎逸夫：大腸腫瘍における癌抑制遺伝子p53の発現と悪性度。日外会誌 93：1312-1316, 1992.
- 6) 宮内基博, 越川信子, 玉 市農, 丸内孝士：舌, 食道, 胃, 大腸の良性および悪性腫瘍におけるPCNA, p53, BM-1反応性蛋白の発現の臓器特異性。癌の臨床 39：1773-1780, 1993.
- 7) Saundaresan, G., Ganly, P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleehen, N. M. and Rabbitts, P.: p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene* 7:1989-1997, 1992.
- 8) Hiyoshi, H., Matsuno, Y. and Kato, H.: Clinicopathological significance of nuclear accumulation of tumor suppressor gene p53 product in primary lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 83:101-106, 1992.
- 9) Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M. and Oren, M.: Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Soc.* 88:9979-9983, 1993.
- 10) Iwaya, K., Tsuda, H. and Hiraide, H.: Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 82:835-840, 1991.
- 11) Casson, A. G., Mukhopadhyay, T., Cleary, K. R., Ro, J. Y., Levin, B. and Roth, J. A.: p53 gene mutations in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res.* 51:4495-4499, 1991.
- 12) 永井宣隆, 村上隆浩, 藤本英夫, 大浜紘三：子宮頸部腺癌におけるHPV16型, 18型感染と癌抑制遺伝子p53蛋白の検出。癌の臨床 40：1219-1226, 1994.
- 13) 高橋 玲, 山本千城, 奥山隆三：p53とアポトーシス。実験医学 11：2403-2407, 1993.
- 14) Lane, D. P. and Crawford, L. V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263, 1979.
- 15) Oren, M., Matmalzman, W. and Levine, A. J.: Post-translation regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol. Cell Biol.* 1:101-103, 1981.
- 16) Reich, N. C., Oren, M. and Levine, A. J.: Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol. Cell Biol.* 3:2143-2145, 1983.
- 17) Rogel, A., Poliker, M., Webb, C. G. and Oren, M.: p53 cellular tumor antigen: Analysis of mRNA levels in normal about tissues, embryos, and tumors. *Mol. cell Biol.* 5:2851-2853, 1985.
- 18) Pinhashi-Kimhi, O., Michalovitz, D. and Ben-Zeev, A.: Specific interaction between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock protein. *Nature* 18:182-183, 1986.
- 19) Sakai, E. and Tsuchida, N.: Most human squamous cell carcinoma in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7:927-933, 1992.
- 20) Washi, P. N., Cohen, B., Luthra, U. K. and Torloni, H.: Histological typing of oral and oropharyngeal tumors. WHO, Geneva, 1971, 17-18.
- 21) 山本悦秀, 砂川 元, 小浜源郁：びまん性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究。日口外誌 28:1471-1479, 1982.
- 22) Jakobsson, P. A., Eneroth, C. M., Killander, D.,

- Moberger, G. and Martensson, B.: Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta. Radiol.* 12: 1-7, 1973.
- 23) 山際裕史, 西井宗男, 大西信行, 大西長久: 胃の ATP, 癌における PCNA と EGFR, c-erbB-2, p53 の免疫組織化学的染色性の関連について. *三重医学* 37: 437-440, 1993.
- 24) Hermanek, P. and Sobin, L. H.: UICC international union against cancer. TNM classification of malignant tumors. Forth. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris and Tokyo, 1987, 13-18.
- 25) Tahara, E.: Growth factors and oncogenes in human gastric carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116: 121-128, 1991.
- 26) Coltrera, M. D., Zarbo, R. J., Sakr, W. A. and Gown, A. M.: Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. Suprabasal expression of PCNA, p53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue. *Am. J. Pathol.* 141: 817-825, 1992.
- 27) 石井 (奥野) 菜穂子: ヒト口腔扁平上皮癌における p53 癌抑制遺伝子の発現の解析. *口病誌* 60: 131-148, 1993.
- 28) 石戸谷 淳一, 鳥山 稔, 小口直彦, 清水信義: 頭頸部扁平上皮癌における癌抑制遺伝子 p53 の異常発現. *頭頸部腫瘍* 19: 166-170, 1993.
- 29) 辻 龍雄, 文 樹民, 金川昭啓, 木村由香, 葛山 司, 伊田正道, 篠崎文彦: p53 癌抑制遺伝子関連抗原と増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織学的発現と DNA aneuploidy との関連性について. *日口外誌* 39: 1330-1333, 1993.
- 30) Gusterson, B. A., Anbazhagan, R., Warren, W., Midgely, C., Lane, D. P., Ohare, M., Stamps, A., Carter, R. and Jayatilake, H.: Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 6: 1785-1789, 1991.
- 31) 新谷 悟, 松村智弘, 坂井義春: 口腔領域悪性腫瘍における癌抑制遺伝子産物 p53 の免疫組織化学的検索. *日口外誌* 38: 1274-1279, 1992.
- 32) 西岡博人, 上林豊彦, 桐田忠昭, 堀内敬介, 中橋一裕, 堀内克啓, 杉村正仁, 松田博文, 北堀吉映, 日浅義雄: 口腔扁平上皮癌における p53 癌抑制遺伝子産物の免疫組織化学的検索: PCNA 染色との比較および臨床病理学的関連性について. *日口外誌* 39: 201-206, 1993.
- 33) Willen, R., Nathanson, A., Moberger, G. and Anneroth, G.: Squamous cell carcinoma of the gingiva; Histological classification and grading of malignancy. *Acta. Otolaryngol.* 79: 146-154, 1975.
- 34) 田中一成, 岩本 敬: 抗 PCNA 抗体を用いた重層扁平上皮の腫瘍性病変における増殖細胞核の組織学的検討—ホルマリン固定パラフィン切片への応用—. *癌の臨床* 37: 1487-1491, 1991.