

非小細胞性肺癌におけるp16/MTS1遺伝子変異と蛋白発現の臨床的意義に関する検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9444

非小細胞性肺癌における p16/MTS1 遺伝子変異と 蛋白発現の臨床的意義に関する検討

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任 渡辺洋宇教授)

宮 永 太 門

広範腫瘍抑制蛋白 p16/MTS1 (multiple tumor suppressor 1, MTS1) は、RB 蛋白のリン酸化を抑制することで細胞周期での G1 期から S 期への移行を調節している。p16/MTS1 の発現異常は種々の癌細胞株や臨床検体で報告されているが、予後因子として臨床的な重要性を検討した報告は少ない。本研究では、非小細胞性肺癌 67 例を対象として p16/MTS1 遺伝子とその蛋白発現異常を調べ、臨床病理学的因子との関係及び予後との関連について検討した。p16/MTS1 遺伝子変異の有無は、PCR-SSCP を用いて判定した。またヘテロ接合性の欠失 (loss of heterozygosity, LOH) は、染色体 9p21 のマイクロサテライトマーカーである D9S171 と INFA を用いて検索した。さらに、p16/MTS1 発現は免疫組織化学的に検討し、その免疫反応性の測定は CAS200 イメージ分析装置を用い、定量プログラムに従い陽性面積比、陽性染色比で表した。p16/MTS1 遺伝子の構造異常は 15 例 (22.4%) に認められた。また 26 例 (38.8%) に LOH がみられた。p16/MTS1 遺伝子構造異常や LOH の有無と臨床病理学的因子とに相関を認めなかった。p16/MTS1 の陽性面積比、陽性染色比は全症例で 15.2 ± 9.4 , 20.8 ± 12.9 であった。この結果に基づき、陽性面積比の 15.0 以上を p16/MTS1 高発現、15.0 未満を p16/MTS1 低発現とした。病期別に陽性面積比、陽性染色比をみると、I 期ではそれぞれ 24.3 ± 11.4 , 30.7 ± 12.8 、II 期では 23.8 ± 10.5 , 29.1 ± 11.9 、III a 期では 9.3 ± 7.5 , 14.7 ± 10.0 、III b 期では 4.6 ± 2.4 , 8.7 ± 4.6 、IV 期では 0.6 ± 0.6 , 1.1 ± 0.9 であり病期進行とともに有意な低下を示した ($p < 0.05$)。T 因子との関連では、p16/MTS1 の陽性面積比、陽性染色比ともに T 因子の増大とともに有意な低下を示した ($p < 0.05$)。組織型別にみると、扁平上皮癌では N 因子の増大ともなっており、p16/MTS1 の陽性面積比、陽性染色比は有意な低下を示した ($p < 0.05$)。一方腺癌では、高分化型症例の陽性面積比は中、低分化型症例に比し有意な高値を示した ($p < 0.05$)。また、p16/MTS1 の陽性面積比、陽性染色比と p16/MTS1 遺伝子構造異常との相関を認めなかった。LOH を認めた群の陽性面積比、陽性染色比はそれぞれ 10.0 ± 9.2 , 18.5 ± 9.0 であり、LOH を認めない群の 18.5 ± 9.1 , 25.1 ± 10.9 と比較して有意な低値を呈した ($p < 0.05$)。p16/MTS1 高発現群の 3 年生存率は 62.5%、p16/MTS1 低発現群の 3 年生存率は 40.5% であり p16/MTS1 高発現群が有意に高い生存率を示した ($p < 0.05$)。以上の結果から、非小細胞性肺癌における p16/MTS1 発現は、その予後予測因子となりうると思われる。

Key words p16/MTS1, non-small cell lung cancer, LOH, PCR-SSCP, Immunohistochemical staining

癌の診断と治療における近年の進歩は、いくつかの癌腫の訂正死亡率を減少に転じさせた。しかし、原発性肺癌の死亡率はいまだに急激な増加を示しており、癌腫別死因の首位を占めるに至った。したがって、原発性肺癌の治療戦略には根本的な見直しと改善が求められているといえる。それには適切な手術式や有効な補助療法の開発はもちろん、信頼性の高い予後予測法の確立が必須である。とりわけ、近年急速な進歩を遂げた分子生物学的研究分野は、肺癌細胞の浸潤能や増殖能に関する多くの情報をもたらすものと期待される¹⁾。

最近、細胞周期の調節機構が解明されつつあり、それに関与する諸因子の異常は、発癌をはじめとする種々の病態に深く関与していると考えられている。細胞分裂はサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin dependent kinase, Cdk) の活性化と、網膜芽細胞

腫蛋白質 (retinoblastoma protein, pRB) のリン酸化により調節されている²⁾³⁾。細胞周期の各期にはそれぞれに特異的な Cdk が存在し、Cdk はサイクリンと複合体を形成し活性化状態となる。さらに、Cdk 活性は多数の抑制因子により負の調節を受けていることが判明している^{4) 6)}。G1/S 期に活性化する Cdk4 に特異的に結合し、そのキナーゼ活性を抑制する蛋白 p16 が Serrano ら⁵⁾ によって単離された。その翌年 Kamb ら⁷⁾ と Nobori⁸⁾ らの二つのグループが、悪性黒色腫の培養細胞株の第 9 染色体短腕 (9p21 領域) から遺伝子の単離に成功し、多種のヒト腫瘍細胞株において高頻度に変異がみいだされ、p16/MTS1 (multiple tumor suppressor 1) と命名した。この遺伝子はこれまでに Serrano ら⁵⁾ により単離された p16 と同一であることがわかり、細胞周期制御と癌抑制遺伝子の関連が注目され、基礎的実

平成 11 年 7 月 29 日受付, 平成 11 年 9 月 29 日受理

Abbreviations : Cdk, cyclin dependent kinase; DAB, 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; E2F, E2 promotor factor; LOH, loss of heterozygosity; pRB, retinoblastoma protein; NSCLC, non-small cell lung cancer; MTFHR,

験や臨床で応用が検討されつつある。本研究は、肺癌切除標本においてp16/MTS1遺伝子異常の有無とその免疫反応性を検索し、臨床病理学的因子および予後の関連について検討することを目的とした。

対象および方法

I. 対象

1988年1月~1991年12月の期間に金沢大学医学部第一外科で切除された原発性非小細胞性肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 67例を対象とした。切除後直ちに約1gの癌組織を採取し、DNA抽出に用いるため液体窒素を用いて瞬間凍結後-80℃で保存した。免疫染色用には、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして金沢大学医学部附属病院中央検査部に保存されているものを用いた。対象の組織学的内訳は、腺癌39例で平均年齢64.0歳、扁平上皮癌が28例で平均年齢67.8歳であった。腺癌に比べ扁平上皮癌において女性が有意に少なかった。

臨床病理学的因子としては、肺癌取扱い規約⁹⁾により原発腫瘍の大きさや部位の指標となるT因子、所属リンパ節の転移の指標となるN因子、遠隔転移の指標となるM因子で分け検討した。さらに癌巣あるいは癌細胞の形態により、各組織型をさらに細分して高分化、中分化、低分化の3つに分け検討を加えた。これらによって定まる病期分類の内訳はI期26例、II期6例、III A期22例、III B期11例、IV期2例であった(表1)。なお対照には癌組織と同時に採取された正常肺組織を用いた。

II. 新鮮標本からのDNA抽出

DNAの抽出はフェノールクロロホルム法を用いて行った。すなわち凍結した組織1gをハサミで細切し、緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1M 塩化ナトリウム, 1.5mM MgCl₂] (和光純薬工業, 大阪) 中でホモジナイザーを用い破碎懸濁した。次いで、懸濁液をチューブにいれ1500回転、5分間遠心分離した。上清を捨て氷冷TNE溶液 [10mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1M 塩化ナトリウム, 1mM EDTA] (和光) 4mlを加え懸濁し、10%SDS

Table 1. Clinicopathological findings in non-small cell lung cancer cases

Clinicopathological findings	No. of cases (%)					
	All		Adenoca.		Epidermoid ca.	
Sex						
Male	51	(76.1)	26	(66.7)	25	(89.3)
Female	16	(23.9)	13	(33.3)	3	(10.7)
T factor						
1	20	(29.9)	13	(33.3)	7	(25.0)
2	31	(46.3)	17	(43.6)	14	(50.0)
3	9	(13.4)	4	(10.3)	5	(17.9)
4	7	(10.4)	5	(12.8)	2	(7.1)
N factor						
0	36	(53.7)	19	(48.7)	17	(60.7)
1	8	(11.9)	4	(10.3)	4	(14.3)
2	19	(28.4)	12	(30.8)	6	(21.4)
3	4	(6.4)	4	(10.3)	1	(3.6)
M factor						
0	64	(95.5)	38	(97.4)	26	(92.9)
1	3	(4.5)	1	(1.6)	2	(7.1)
Stage						
I	26	(38.8)	15	(38.5)	11	(39.3)
II	6	(9.0)	2	(5.1)	4	(14.3)
III A	22	(32.8)	12	(30.8)	10	(39.7)
III B	11	(16.4)	9	(23.1)	2	(7.1)
IV	2	(3.0)	1	(2.6)	1	(3.6)
Differentiation						
Well	21	(31.3)	15	(38.5)	6	(21.4)
Moderately	25	(37.3)	10	(25.6)	15	(53.6)
Poor	16	(23.9)	11	(28.2)	5	(17.9)

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma.

methylenetetrahydrofolate reductase; MTS1, multiple tumor suppressor 1; SSCP, single-strand conformation polymorphism

Table 2. p16/MTS1 primers for PCR-SSCP used in this study

Exon	Amplified segment (base pairs)	Annealing temperature (°C)		Sequence (5'-3')
1	204	63	Foward	GGGAGCAGCATGGAGCCG
			Reverse	AGTCGCCCGCCATCCCCT
2A	204	55	Foward	AGCTTCCTTTCCGTCATGC
			Reverse	GCAGCACCACCAGCGTG
2B	147	55	Foward	AGCCCAACTGCGCCGAC
			Reverse	CCAGGTCCACGGGCAGA
2C	189	55	Foward	TGGACGTGCGCGCGATG
			Reverse	GGAAGCTCTCAGGGTACAAATTC
3	169	60	Foward	CCGGTAGGGACGGCAAGAGA
			Reverse	CTGTAGGACCCTCGGTGACTGATGA

Table 3. Primers of microsatellite marker used in this study

Microsatellite markers	Amplified segment (base pairs)	Annealing temperature (°C)		Sequence (5'-3')
INFA	168	55	Foward	ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT
			Reverse	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGCT
D9S171	202	55	Foward	AGCTTCCTTTCCGTCATGC
			Reverse	GCAGCACCACCAGCGTG

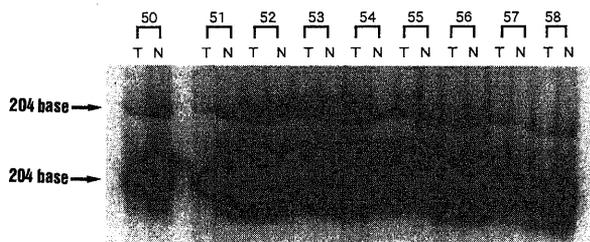


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of exon 2A of p16/MTS1 gene. An abnormally shifted band was noted in case 51. T, tumor tissue; N, normal lung tissue near the tumor site.

(和光) 200 μ l, 10mg/dlのプロテナーゼK溶液 (和光) 60 μ lを加え, 50°Cで12時間攪拌反応させた. Tris-EDTA緩衝液飽和フェノール (和光) 4mlを加え4時間穏やかに攪拌し, 3000回転, 20分間遠心分離しDNAを抽出した. Tris-EDTA緩衝液飽和フェノール4mlにて1回 (3000回転, 30分), Tris-EDTA緩衝液飽和フェノール・クロロホルム (1:1) 4mlにて1回 (3000回転, 20分), クロロホルム4mlにて1回 (3000回転, 10分) 遠心し上層を回収した. 0.1Mの酢酸ナトリウム溶液 (和光) を加えたエタノールを10ml加え攪拌後, -80°Cで2時間放置しDNAを沈殿させた. さらに4°C, 15000回転20分間遠心し上清を取り除き70%エタノールで洗浄した. 得られたDNAを1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.0) に溶解し, 4°Cで保存した. 各DNAは260nmの吸光度を測定し, 1 ODを50 μ g/mlとしてDNA濃度を計算した.

Ⅲ. PCR-1本鎖構造多型 (PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism, PCR-SSCP) 法

p16/MTS1の点突然変異のスクリーニングにはPCR-SSCP法を用いた. プライマーは報告されているp16/MTS1 cDNAの塩基配列5)に基づき, エクソン1に1組, エクソン2に3組, エクソン3に1組設定した (表2). この塩基配列のオリゴヌクレオチドプライマー (バイオロジカ, 名古屋) を20 μ Mの濃度に調製し各プライマー3 μ lに対して, 10×リン酸化緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 5mM ジチオトレイトール, 0.1mM スペルミジン, 0.1mM EDTA) (和光) 1.5 μ l, [γ -³²P]ATP (3000 μ Ci) (アマシャム・ジャパン, 東京) 5 μ l, T4ポリヌクレオチドキナーゼ (和光) 15 μ l 単位ずつを加え, 37°Cで30分間保温後, 65°Cで10分間加熱し酵素を失活させプライマーの5'末端を³²Pで標識した. 鋳型DNA50ng (100 μ g/ml) に対して10×PCR反応緩衝液 (100mM Tris-HCl (pH8.8), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton ×100) (和光) 0.5 μ l, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各10 nmol, TaqDNAポリメラーゼ0.05単位 (和光), ジメチルスルオキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (和光) 0.25 μ lおよび標識プライマーを20 pmolずつ加え, 滅菌蒸留水を加えて計5 μ lとした. ミネラルオイル (Sigma, St.Louis, USA) 30 μ lを重層し, PROGRAM TEMP. CONTROL SYSTEM PC-800 (アステック, 福岡) を使用して, 94°C30秒間の熱変性, プライマーに応じて55°Cまたは60°Cまたは63°C40秒間のアニーリング, 72°C1分間のDNA伸長反応を1サイクルとし, 35サイクルの増幅を行った. PCR反応終了後, PCR産物のうち2 μ lをとり, ホルムアミド色素溶液 (95%ホルムアミド, 0.05%プロモフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール, 20mM EDTA) (各和光) を48 μ lを加え80°Cで3分間加熱後, 急冷した.

これに50%グリセロール(和光)を加えて6%ポリアクリルアミドゲル(和光)0.5×Tris-ホウ酸-EDTA緩衝液中で電気泳動した(1.5-2.0kV, 2-4時間)。泳動には灌流式泳動槽を用いて4℃, 15℃の2種類の一定温度を保った。泳動後、ゲルを乾燥させイメージングプレート・BAS CASSETTE 2040(富士フィルム, 東京)に1時間露光した。これをバイオイメージングアナライザー・BAS-1500(富士フィルム)を用いて読み取り, MacBAS Ver.2.2(富士フィルム)を用い画像化した。腫瘍DNAによるバンドが正常DNAのそれと異なる移動度を示した場合、腫瘍DNAが遺伝子構造異常をもつと判定した。

Ⅳ. ヘテロ接合性の欠失 (loss of heterozygosity, LOH) の検出

今回、第9染色体短腕の21部位(9p21)のマイクロサテライトマーカーであるINFAとD9S171を用いて、p16/MTS1遺伝子近傍のLOHを検索した(表3)。各々のプライマー(バイオロジカ)1.5 μ lずつに $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (アマシヤム)5 μ l, 10×ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液1.5 μ l, ポリヌクレオチドキナーゼ(和光)1.5 μ l, 蒸留水を4 μ lで反応させ標識した。この標識されたプライマーを0.25 μ l, 10×緩衝液を0.5 μ l, dNTP混合液を0.4 μ l, Taq DNAポリメラーゼ(和光)0.05 μ l, 標本DNA0.5 μ lに蒸留水を加えて計5 μ lの系にミネラルオイルを20 μ l重層しPCR反応を行った。PCR反応は94℃30秒, 55℃40秒, 72℃1分を35サイクルで行い, 終了後4℃に保存した。これにホルムアミド色素液45 μ l加え, うち4 μ lを90℃に加熱後急冷したものを尿素0.6%ポリアクリルアミドゲル(和光)中で1500Vで4-5時間電気泳動した。ゲルを乾燥させイメージングプレート・BAS CASSETTE 2040に2時間露光した。このプレートをBAS-1500で読み取り画像化した。2つのマイクロサテライトマーカー(D9S171, INFA)の泳動結果をそのラダーパターンで判定した。1検体につき2つのラダーパターンが認められるがどちらかが欠けている場合LOHと判定した。

Ⅴ. p16/MTS1に対する免疫組織化学染色法

ホルマリン固定パラフィン包埋された標本をマイクローム4 μ mの厚さに薄切し, シラン塗装されたスライドに付着させた。これについて100%キシレンにて10分間, 3回の脱パラフィンを行った後, 100%エタノールにて20回振盪を3回, 90%エタノールにて20回振盪を1回, 70%エタノールにて20回振盪を1回の脱水を行った。水道水で1分間洗浄後, PBSに浸した, 0.1Mクエン酸緩衝液(pH6.0)中で500W, 5分間, 3回のマイクロウ

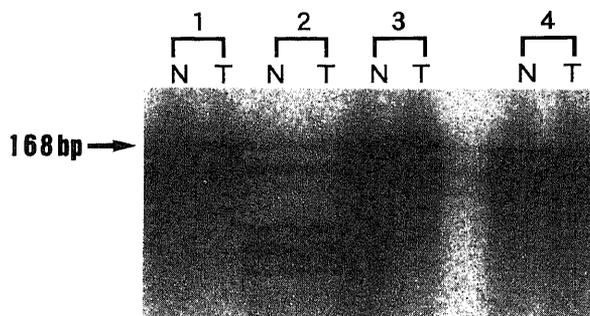
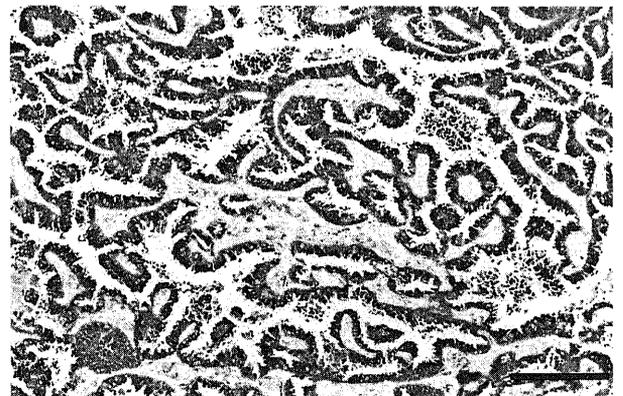


Fig. 2. LOH analysis of microsatellite marker INFA on 9p21 locus. Case 3 shows LOH, while other cases show no LOH. T, tumor tissue; N, normal lung tissue near the tumor site.

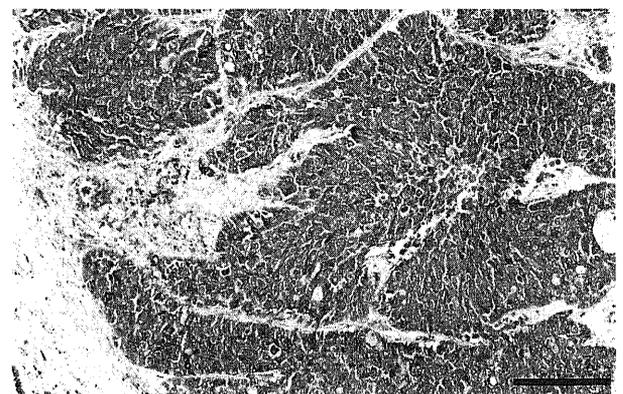
ーブ処理を行い, 室温まで放置した後, 新しいPBSに浸した。次に0.3%過酸化水素加メタノールにて20分間室温で内因性ペルオキシダーゼを阻害し, 10分間水道水で洗浄した。続いて, 10分間ブロッキングを行った後, 抗ヒトp16モノクローナル抗体(マウスIgG2b, クローンG175-405, Pharmingen, San Diego, USA)をPBSで100倍に希釈し, 室温で1時間反応させた。次にPBSにて5分間3回洗浄し, ビオチン標識抗マウスおよび抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体(ダコ・ジャパン, 東京)を用い室温にて20分間反応させ, PBSにて5分間3回洗浄し, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ダコ・ジャパン)にて室温で20分間反応させた。PBSにて5分間3回洗浄後, ジアミノベンジジン(3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)(和光)にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約5分間室温で反応させた。水道水で10分間洗浄したあと, ヘマトキシリンにて核染色を行った。全過程終了後, 脱水, 透徹を施行し封入した。

Ⅵ. 免疫染色の判定

免疫染色を行った後, 判定は透過光顕微鏡画像解析装置CAS200イメージ分析装置(cell-analysis-system, Elmhurst, USA)を用い組織における免疫反応性を定量的に測定した。ヘマトキ



A



B

Fig. 3. Immunohistochemical staining of p16/MTS1 protein in adenocarcinoma (A) and epidermoid carcinoma (B) of the lung. Almost all carcinoma cells show strong positively for anti-p16 protein monoclonal antibody. Scale bars indicates 200 μ m

シリンによる核染色は620nmの波長で測光し、DABの染色強度は500nmの波長で測光した。p16/MTS1の発現による免疫反応性は全核面積に対するDABで発色した核の面積比すなわち陽性面積比(% positive area)の測定によって評価した。染色標本の500nmにおける平均吸光度測定は腫瘍辺縁部の任意の視野を選び、10-15視野で行った。陰性標準標本の平均吸光度測定は5標本から任意選択した10-15視野で行った。さらにDABで発色したp16/MTS1陽性部分の核の500nm吸光度の総和を対象視野における全ての核の500nm吸光度の総和でわった陽性染色比(% positive stain)も合わせ検討した。

Ⅶ. 統計学的処理

p16/MTS1の免疫反応性はすべて平均値±標準偏差($\bar{x} \pm SD$)で示した。平均値の有意差検定には、Mann-whitneyのU検定を用いた。離散量に対しては χ^2 検定を用いた。また、多群間の有意差検定にはKruskal-Wallisの検定を用いた。生存率の算出はKaplan-Meier法を用い、その有意差検定には一般化

Wilcoxon検定を用いた。いずれも、危険率(p値)5%未満を有意差ありとした。

成 績

I. PCR-SSCP法による点突然変異の検出

p16/MTS1遺伝子のエクソン2を2A, 2B, 2Cの3つにわけ、1, 2A, 2B, 2C, 3の5つの領域における遺伝子変異をPCR-SSCP法によってスクリーニングした。DNAが一本鎖の核酸として泳動された場合、1塩基対でも違えば核酸の高次構造に変化が生じゲルの中での抵抗が変化し移動度に差が生じる。このことを利用し腫瘍DNAと正常DNAを一本鎖にして泳動し異なる移動度を示した場合、高次構造の違いが考えられ、この領域の遺伝子異常が示唆された(図1)。

全症例中、エクソン1に2例、エクソン2Aに5例、2Bに2例、2Cに2例、エクソン3に4例の計15例(22.4%)の構造異常を認めた。その組織型では扁平上皮癌が7例(25.0%)、腺癌が8例

Table 4. Correlations between clinicopathological findings and expressions of p16/MTS1 in 67 primary non-small cell lung cancer cases

Clinicopathological findings	No. of cases	% positive area for p16 ($\bar{x} \pm SD$)	% positive stain for p16 ($\bar{x} \pm SD$)
Histological			
Adenoca.	39	17.6±20.8	24.3±25.4
Epidermoid ca.	28	12.0±17.1	15.9±18.3
Sex			
Male	51	13.9±17.7	19.5±21.0
Female	16	19.3±24.3	25.1±23.6
T factor			
1	20	23.3±22.1	30.5±24.4
2	31	14.4±19.4	
3	9	8.8±14.0	
4	7	3.9±5.0	
N factor			
0	36	18.2±21.5	24.2±24.8
1	8	18.4±20.8	22.2±23.8
2	19	10.1±15.6	16.1±20.7
3	4	5.9±4.4	10.2±8.2
Stage			
I	26	23.8±22.8	30.7±25.6
II	6	24.3±20.9	
III A	22	9.3±14.9	
III B	11	4.6±4.7	
IV	2	0.6±0.6	
M factor			
0	64		
1	3	15.9±19.6	21.6±23.1
		1.7±2.0	3.0±3.4
Differentiation			
Well	21	18.3±21.7	25.3±26.4
Moderately	25	11.3±19.7	14.2±21.4
Poorly	16	13.1±13.9	19.9±17.7

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma.

*p<0.05.

(20.5%) であり両者の間に有意差は認めなかった。T分類, N分類, M分類, 病期別分類, 分化度のいずれの項目も, p16/MTS1 遺伝子構造異常の有無との間に有意な関連を示さなかった。なお, 正常DNAには構造異常は認めなかった。

II. LOHの検出と臨床病理学的因子

ヒトの細胞は父方由来と母方由来2つの相同染色体をもつ2倍体細胞である。この2つの相同染色体のうちどちらか一方が欠失している状態をヘテロ接合性の欠失とし, 発癌過程において重要な役割を果たしている。DNA上の繰り返し配列であるマイクロサテライトマーカーは個人々人において多型性をもっており, 父方と母方でその繰り返し配列の鎖長が異なり区別できる。正常組織と癌組織のDNAにおいてそれぞれの相同染色体のどちらかが欠失してバンドとして認めなければLOHと判定した(図2)。

LOHが認められた症例は26例(38.8%)であり, 扁平上皮癌は11例(39.3%), 腺癌は15例(38.5%)で両者の間に有意差は認めなかった。T分類, N分類, M分類, 病期別分類, 分化度のいずれの項目も, LOHの有無と有意な関連は示さなかった。p16/MTS1 遺伝子の構造異常を認めた15例中, LOHが存在した症例は7例(42.0%)であったが, それらの症例に臨床学病理学的特徴は認められなかった。p16/MTS1 遺伝子の構造異常を

認めなかった52例中, LOHが存在した症例は19例(36.5%)であったが, それらの症例に臨床学病理学的特徴は認められなかった。

III. p16/MTS1 発現

1. p16/MTS1 免疫組織染色像

肺扁平上皮癌と肺腺癌のp16/MTS1 免疫組織染色像を図3A, Bに示す。p16/MTS1は細胞質, 核の双方に染色された。また, 腫瘍中心部に比べ, 腫瘍辺縁部では核がより強く染色される傾向があった。Geradtsら¹⁰⁾はp16/MTS1についてウエスタンブロットティングと免疫染色による細胞核と細胞質の免疫反応性を比較した場合, ウエスタンブロットティングと細胞核の免疫反応性との間により高い相関を認めた報告している。したがって本研究において細胞核の染色率をCAS200の定量プログラムを用い測定した。正常肺組織でも一部の気管支腺, 肺胞上皮に淡いp16/MTS1の染色をみた。

2. 各臨床病理学的因子別にみたp16/MTS1の発現

NSCLC全体でのp16/MTS1陽性面積比は 15.2 ± 9.4 で同じく陽性染色比は 20.8 ± 12.9 であった。組織型別では, p16/MTS1陽性面積比は腺癌で 17.6 ± 10.4 , 扁平上皮癌での 12.0 ± 7.1 であり, 両者の間に有意差は認められなかった。p16/MTS1陽性染色比は腺癌で 24.3 ± 12.7 , 扁平上皮癌で 15.9 ± 9.7 であり,

Table 5. Correlations between clinicopathological findings and expression of p16/MTS1 in 28 epidermoid carcinomas of the lung cases

Clinicopathological findings	No. of cases	% positive area for p16 ($\bar{x} \pm SD$)	% positive stain for p16 ($\bar{x} \pm SD$)
Sex			
Male	25	13.0 \pm 9.0	17.2 \pm 9.5
Female	3	3.2 \pm 1.2	5.5 \pm 2.0
T factor			
1	7	19.7 \pm 10.6	25.0 \pm 8.4
2	14	12.0 \pm 8.9	15.7 \pm 10.3
3	5	5.6 \pm 4.0	9.5 \pm 6.3
4	2	0.4 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3
N factor			
0	17	31.6 \pm 11.0	37.5 \pm 12.5
1~3	11	8.7 \pm 7.3	13.5 \pm 9.1
M factor			
0	26	12.7 \pm 8.8	16.8 \pm 9.4
1	2	2.1 \pm 1.3	3.6 \pm 2.3
Stage			
I	11	14.5 \pm 9.5	19.1 \pm 8.8
II	4	31.6 \pm 11.0	37.5 \pm 12.0
III A	10	4.7 \pm 3.0	8.3 \pm 5.0
III B	2	0.4 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3
IV	1	0.2	1.8
Differentiation			
Well	6	4.4 \pm 2.3	10.2 \pm 6.2
Moderately	15	12.8 \pm 10.6	15.2 \pm 10.7
Poorly	5	14.8 \pm 8.0	20.9 \pm 9.5

* $p < 0.05$.

同様に両者の間に有意差は認めなかった。病期別分類では、I期のp16/MTS1陽性面積比は 23.8 ± 11.4 、II期は 24.3 ± 10.5 、III A期は 9.3 ± 7.5 、III B期は 4.6 ± 2.4 、IV期は 0.6 ± 0.6 であり、病期進行とともに有意な低下を示した ($p < 0.05$)。同様にp16/MTS1陽性染色比でもI期は 30.7 ± 12.8 、II期は 29.1 ± 11.9 、III A期は 14.7 ± 10.0 、III B期は 8.7 ± 4.6 、IV期は 1.1 ± 0.9 であり、病期進行とともに有意な低下を示した ($p < 0.05$)。T分類ではp16/MTS1陽性面積比、陽性染色比ともにT因子が増大するとともに有意な低下を示した ($p < 0.05$)。性別、年齢 (60歳以上, 60歳未満) N分類, M分類, 分化度による差は認めなかった (表4)。

組織型別に検討を加えると、扁平上皮癌ではN因子が増大するとともに、p16/MTS1陽性面積比、陽性染色比の双方が有意に低下した ($p < 0.05$)。性別、年齢 (60歳以上, 60歳未満), M分類, 分化度による差は認めなかった (表5)。腺癌では高分化型のp16/MTS1陽性面積比は 23.8 ± 11.8 、中分化型+低分化型のそれは 10.9 ± 8.8 であり、分化度が低くなるにつれp16/MTS1陽性面積比は有意に低値を示した ($p < 0.05$)。同様にp16/MTS1陽性染色比も分化度によって有意差を認めた ($p < 0.05$)。性別、年齢 (60歳以上, 60歳未満) N分類, M分類, 分化度による差は認めなかった (表6)。

3. p16/MTS1発現とLOHとの相関、遺伝子構造異常

NSCLC全症例でLOHを認めた症例のp16/MTS1陽性面積比は 10.0 ± 9.2 であり、LOHを認めない症例のその 18.5 ± 9.1 に対し低値であった ($p < 0.05$)。p16/MTS1陽性染色比においてもLOHを認めた症例は認めない症例に比し低値であった ($p < 0.05$)。p16/MTS1構造異常の有無とp16/MTS1発現の指標である陽性面積比及び陽性染色比との間に相関関係は認めなかった。また、p16/MTS1構造異常の有無とLOHの有無との間に相関は認めなかった。

4. LOH, p16/MTS1遺伝子構造異常の有無別にみた生存率の検討

NSCLC全症例に対し、LOHの有無でそれぞれの術後3年および5年生存率を算出した。LOHを認めた症例と認めなかった症例との間に生存率に差を認めなかった。さらに、p16/MTS1遺伝子の構造異常の有無でそれぞれの術後3年および5年生存率を算出した。p16/MTS1遺伝子の構造異常を認めた症例と認めない症例との間に生存率に有意な差は認めなかった。

5. p16/MTS1発現からみた生存率の検討

p16/MTS1発現と予後との関係を陽性面積比値を2群に分けて検討した。全症例をp16/MTS1陽性面積比が15.0以上のp16/MTS1高発現群、15.0未満のp16/MTS1低発現群とし、そ

Table 6. Correlations between clinicopathological findings and expression of p16/MTS1 in 39 adenocarcinomas of the lung cases

Clinicopathological findings	No. of cases	% positive area for p16 ($\bar{x} \pm SD$)	% positive stain for p16 ($\bar{x} \pm SD$)
Sex			
Male	26	14.8 ± 8.9	21.7 ± 11.5
Female	13	23.0 ± 12.8	29.6 ± 15.1
T factor			
1	13	25.2 ± 11.6	33.5 ± 13.5
2	17	16.4 ± 10.1	22.6 ± 12.8
3	4	12.9 ± 10.0	18.8 ± 12.8
4	5	5.3 ± 2.7	10.7 ± 5.5
N factor			
0	19	25.0 ± 11.8	32.9 ± 13.5
1~3	20	9.6 ± 3.8	16.9 ± 4.4
M factor			
0	38	18.0 ± 10.5	24.9 ± 12.7
1	1	1.0	2.3
Stage			
I	15	30.5 ± 11.8	39.3 ± 13.8
II	2	9.6 ± 4.8	12.3 ± 5.4
III A	12	13.1 ± 9.5	20.0 ± 12.4
III B	9	5.6 ± 2.4	10.4 ± 4.7
IV	1	1.0	2.3
Differentiation			
Well	15	23.8 ± 11.8	31.3 ± 14.2
Mod. + Poorly	24	10.9 ± 8.8]*	12.7 ± 11.3]*

Mod. Moderately. * $p < 0.05$.

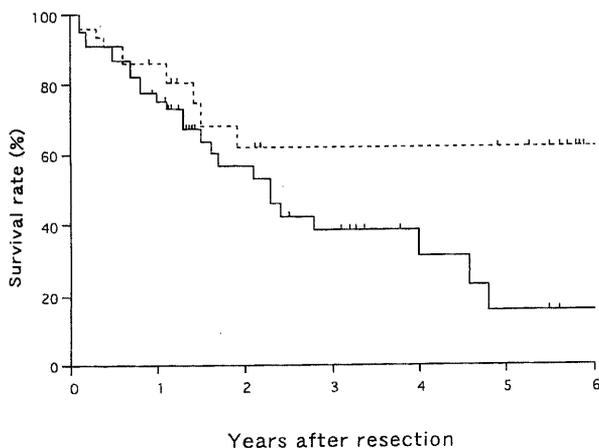


Fig. 4. Survival curves of 67 patients with non-small cell lung cancer divided into the groups of high p16/MTS1 staining rate (-----) and low p16/MTS1 staining rate (——).
* $p < 0.05$ by generalized Wilcoxon test.

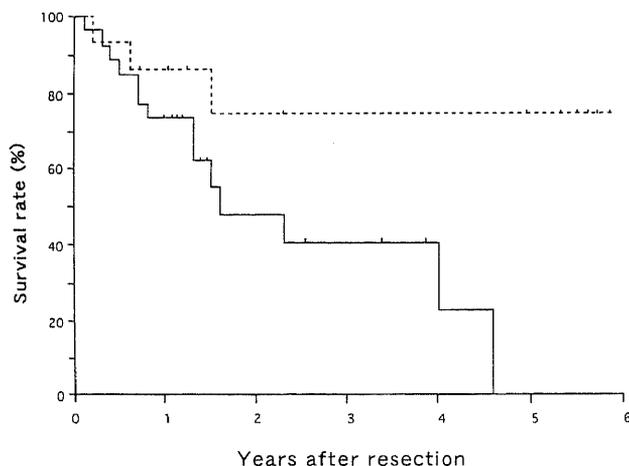


Fig. 5. Survival curves of 39 patients with adenocarcinoma of the lung divided into the groups of high p16/MTS1 staining rate (-----) and low p16/MTS1 staining rate (——).
* $p < 0.05$ by generalized Wilcoxon test.

それぞれの3年生存率を算出した。その結果、p16/MTS1高発現群の3年生存率62.5%、5年生存率62.5%に対し、p16/MTS1低発現群ではそれぞれ40.5%、19.2%とp16/MTS1高発現群で有意に生存率が高かった ($p < 0.05$) (図4)。症例を組織別に分けると、扁平上皮癌においてp16/MTS1高発現群とp16/MTS1低発現群に差はなかった。腺癌ではp16/MTS1高発現群の3年生存率74.1%、5年生存率74.1%であるのに対し、p16/MTS1低発現群ではそれぞれ37.5%、0%でありp16/MTS1高発現群で有意に生存率が高かった ($p < 0.05$) (図5)。

考 察

細胞の増殖速度を調節する機構の一つに細胞周期の制御がある。アデノウイルスDNA上E2遺伝子のプロモーター部位に結合する細胞由来の因子であるE2FはpRBより解離し活性型E2F

となり、増殖関連遺伝子の転写活性化し細胞周期をG1期からS期に進行する²¹⁾¹⁴⁾。このpRBを特異的にリン酸化する活性をもつサイクリンとCdkの複合体があげられる。Cdkは単独では活性がなく、特異的な調節サブユニットであるサイクリンが結合することではじめて活性を発揮することになる。哺乳類細胞では数種類のサイクリンとCdkが報告されているが、G1/S期移行に働くものとして現在までにサイクリンD/Cdk4・Cdk6、サイクリンE/Cdk2の2種の複合体が知られている³⁾⁴⁾。Cdk自身は、種々のサイクリンによって正のCdk阻害因子によって負の修飾を受けて、DNAの複製や修復を調節している。近年、Cdkの活性を阻害するインヒビターの存在が明らかになった。これまで報告されたインヒビターは2つのグループに大別される。1つはp21, p27, p57のファミリーで、サイクリンD/Cdk4, Cdk6, サイクリンE/Cdk2, サイクリンA/Cdk2の活性を阻害する。2つ目は阻害活性がサイクリンD/cdk4, 6に特異的なインヒビターでINK4 (inhibitor of Cdk4) と呼ばれるものである。このファミリーに属する一連の蛋白のうち、最初に同定されたものがp16/MTS1である⁵⁾。

p16/MTS1は当初Cdk4に結合する細胞内蛋白としてその存在が確認された。この後、p16/MTS1遺伝子のcDNAがクローニングされ、その蛋白は4回の繰り返しからなるアンキシリンリピート構造をもつことが明らかになった⁷⁾。p16/MTS1を強制発現させた細胞のうちあるものはG1期で増殖を停止するが、その効果は用いた細胞のpRBの状態に依存する。すなわち、pRBを発現していない細胞株にp16/MTS1を強制発現させても増殖の停止はみられない¹³⁾¹⁴⁾。これは、p16/MTS1のG1-S移行制御作用がpRB-E2F系を介したものであることを裏付けるものである。また、p16/MTS1の機能に異常があるとCdk4/サイクリンD1の活性が阻害されず、pRBとE2Fの結合が障害され、細胞の分裂、増殖サイクルが亢進して癌化に及ぶと予想される。Cdk4遺伝子を培養細胞で過剰発現させ、p16/MTS1に対し量的優位な状態に導くとG1期は短縮し細胞増殖が促進するとの報告もある^{15)~17)}。

一方、第9染色体短腕の異常は以前より種々の癌細胞株で高頻度に認めると報告されていた^{18)~20)}。これらの遺伝子異常は9p21に認め、癌細胞のみで欠失していることからこの部位には癌抑制遺伝子が存在するだろうと考えられていた。このような中で、p16/MTS1遺伝子は、ヒト悪性黒色腫の培養株の第9染色体短腕の共通ホモ欠失領域から単離された⁷⁾⁸⁾。この遺伝子によってコードされる蛋白質がCdk4活性を阻害するp16/INK4と一致することがわかった。さらに多くのヒト癌細胞株でも同遺伝子座位におけるホモ接合性欠失が高度にみつかったため、p53遺伝子に匹敵する広範な癌抑制遺伝子として注目を集めた⁷⁾¹⁷⁾。臨床材料では細胞株よりその頻度は少ないものの食道癌、肝癌、グリオーマ、白血病などで異常が検出された^{21)~28)}。

p16/MTS1遺伝子異常の形態であるが、グリオーマ、肝癌、白血病にみられるp16/MTS1遺伝子異常はヘテロ接合性の消失やホモ接合性欠失による場合が多い。一方、肺癌、頭頸部癌、食道癌では塩基配列の変異に起因するp16/MTS1遺伝子異常が多く報告されている²³⁾²⁴⁾²⁸⁾²⁹⁾。他の癌抑制遺伝子ではナンセンス突然変異やミスセンス突然変異が多いのに比し、p16/MTS1遺伝子の異常は癌の種類によって遺伝子異常の形態が大きく異なり組織特異性があることが判明している。肺癌細胞株を用いた検討では、約80%にp16/MTS1が異常発現しており、その半

数に p16/MTS1 遺伝子異常が認められた。また、肺癌臨床検体では約 30% の遺伝子異常を認めたと報告されている²⁸⁾。しかし p16/MTS1 遺伝子の変異と臨床病理学的因子と関連や予後に及ぼす影響を検討した研究は少ない³⁰⁾。本研究では、肺癌臨床検体を用いて p16/MTS1 遺伝子の塩基配列の異常を PCR-SSCP 法によって検索するとともに、ヘテロ接合性の欠失を多形性マーカーにより検索した。PCR-SSCP 法は、ゲノム DNA 中の異なった塩基配列により生じる一本鎖 DNA の高次構造の違いをポリアクリルアミドゲル電気泳動による移動度の差として検出する方法である³¹⁾。しかし、PCR-SSCP 法によって一回の泳動で解析できる DNA の長さは制限される。一方、400 塩基対以下であれば高い検出効率が保たれるため、本研究では 5 組のプライマーを設定し p16/MTS1 遺伝子全長を検索した。また、マイクロサテライトマーカーの多型を用いた LOH-PCR 解析では、癌抑制遺伝子の存在する染色体部位のヘミ欠失を LOH という形で高頻度で検出することができる。以上の特性を利用し、9p21 に存在する多形性マーカーである INFA, D9S171 を用いて LOH を検出した。さらに、免疫染色による p16/MTS1 の免疫反応性は CAS200 を用いて定量的に分析した。CAS200 では、染色された顕微鏡画像から二つの異なる中心波長を持つバンドパス光学フィルターを介して測光することにより、免疫組織染色陽性部分の吸光度を定量的に求めることが可能である。したがって、CAS200 による定量では、測定者の主観を取り除くことが可能であり、染色性の微弱な部分に対しても客観的な測定が行える³⁴⁾。

p16/MTS1 遺伝子は 3 個のエクソンと 2 個のイントロンからなり、mRNA のサイズは 981 塩基対である⁹⁾。その蛋白質の分子量は 15.8 kD であり、156 個のアミノ酸からなる。p16/MTS1 遺伝子の全塩基配列にしめるグアニン (G) とシトシン (C) の割合は 70% を越え、CpG ジヌクレオチドの割合も他の癌抑制遺伝子に比べ高い。これに伴う PCR 反応の効率低下が臨床検体を用いた p16/MTS1 遺伝子異常の検索に難渋する一因と考えられている³³⁾。これを回避するため、本研究では PCR バッファーに DMSO を加え、PCR 反応における CG 重合を防止し増幅効率の向上を図った。また、CpG ジヌクレオチドはメチル化されたシトシン (C) からチミン (T) への転位がおこることが知られており、事実 p16/MTS1 遺伝子の点突然変異は CpG 部位に多発している³⁴⁾。興味あることにこれらの変異はエクソン 2 に集中しており、同程度の頻度で CpG が存在するエクソン 1 では突然変異はほとんどみられないと報告されている^{33,34)}。本研究では、エクソン 2 に変異の 78.3% が集中しており、それを支持する結果が得られた。

NSCLC の原発巣と転移巣で p16/MTS1 遺伝子の異常を検索したところ、原発巣では異常が検出されなかったのに対し、転移巣では 27% に異常が認められたと報告されている¹⁷⁾。この結果からは、p16/MTS1 遺伝子は NSCLC の癌化の後期段階と進展に参与する可能性が示唆された。一方で p16/MTS1 発現の変化をメラノーマで検索した検討では、前癌病変の 100% にその発現が検出されたのに対し、原発巣では 52%、転移巣では 72% で発現を認めなかったと報告されている³⁵⁾。以上より p16/MTS1 遺伝子や p16/MTS1 の発現は癌の進行に付随して変化するものと予想される。本研究では、p16/MTS1 の発現をその免疫反応性で検討する限り、全症例で T 因子や病期の進行につれその発現は低下を示した。特に扁平上皮癌では、N 因子が

進行するとともに有意な発現低下が認められた。腺癌症例では、p16/MTS1 発現は分化度と相関した。

かかる現象は NSCLC の個々の癌細胞で何らかの原因で p16/MTS1 が低量となり、個々の癌細胞の増殖が進み最終的に腫瘍径の増加を起こし T 因子に影響を及ぼすことが示唆される。同様に N 因子の進行でも p16/MTS1 異常細胞がリンパ節に移動し増殖するためにより速い細胞周期回転を必要としていることも示唆される。しかし組織型での相違や癌の転移や浸潤における p16/MTS1 の働きは細胞周期制御だけで説明できず、今後の研究にその解明を期待される。

このように p16/MTS1 はいくつかの臨床病理学的因子と相関することから、p16/MTS1 の発現を知ることで、その癌組織の特性を知り予後を予測できる可能性が期待できる。

本研究では p16/MTS1 の免疫反応性を 2 群に分け肺癌切除後の予後と検討したところ、腺癌では p16/MTS1 発現低値群は高値群に比し有意に生存率が低かった。また、扁平上皮癌では p16/MTS1 発現と臨床病理学的諸因子は相関したが、予後との相関は認められなかった。なお腺癌では p16/MTS1 発現と臨床病理学的諸因子との間に相関は認められなかった。したがって p16/MTS1 は現在用いられている臨床病理学的因子と関連を有さずその予後に関与していると考えられた。また p16/MTS1 遺伝子の構造異常の有無による生存率では有意な差を認めなかった。しかし、p16/MTS1 遺伝子異常と臨床病理学的因子との相関は認められなかった。

一方、p16/MTS1 の発現と p16/MTS1 遺伝子異常の相関についてみると、LOH が認められたものは p16/MTS1 発現が有意な低値を示した。しかし、蛋白発現が低値を示す症例の中で遺伝子異常を証明できない症例がおおよそ 20% あった。これまでも、約 80% の細胞株で p16/MTS1 が欠損しているものの、p16/MTS1 遺伝子の異常はその約半数の 40% で確認されたのみであったとの報告がある¹⁷⁾。蛋白の発現異常、とりわけその発現低下がコードされている遺伝子の異常に起因しない症例が存在することは確実である。かかる事象の説明として、プロモーター部位の塩基配列異常、DNA のメチル化による発現の変化、p16/MTS1 自体の変性過程に対する抵抗性の発生などが考えられる。p16/MTS1 については、肺癌、頭頸部癌、グリオーマにおける発現低下は翻訳部位の異常よりもむしろそのプロモーター部位のメチル化に起因する頻度が高いとの報告がある^{34) 36)}。プロモーター部位のメチル化は、p16/MTS1 のみならず他の癌抑制遺伝子の不活化の 1 つのメカニズムとして注目される。メチル化を生じる酵素の一つにメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) がある。教室の Kamiya ら³⁷⁾ は、この MTHFR 遺伝子の多形性に注目し、p16/MTS1 発現との相関関係を検討した。NSCLC 57 例を MTHFR の多型部位のアミノ酸配列によって 3 つのグループに分けた。その結果あるアミノ酸配列を示すグループがほかのグループに比べ有意に低い p16/MTS1 発現を示したと報告している。この事実は、p16/MTS1 発現異常に MTHFR 遺伝子の多形性が関与している可能性を示している。すなわち、MTHFR が p16/MTS1 遺伝子のメチル化を引き起こし p16/MTS1 発現低下により細胞周期や発癌過程の異常を発生させると推測される。本研究で用いた DNA は、新鮮標本より抽出したため変性などの影響はほとんど受けていないものと思われる。しかし、p16/MTS1 遺伝子異常の検出率は過去の報告に比べ低率であっ

た。これには、正常細胞が混入しLOHの頻度が過少評価されている可能性も考えられる。腫瘍をヌードマウスに移植し、混入正常細胞を除去する方法なども報告されている²⁵⁾³⁸⁾。

以上、本研究ではp16/MTS1発現低下がNSCLCの病期進行と深く関わり、p16/MTS1発現低値症例の予後は高値症例に比し不良であることが判明した。このことからp16/MTS1は細胞周期制御因子のひとつとしてNSCLCの発癌過程や病期進行を反映し、予後を予測する重要な因子の一つであることが明らかとなった。今回の研究ではp16/MTS1遺伝子異常はNSCLCの病期進行や予後に相関を認めず、蛋白発現における結果との解離を示した。すなわちp16/MTS1発現異常がその遺伝子異常のみに起因しないことが予想される。今後p16/MTS1発現に影響を与える他のメカニズムの解明が必須と考えられる。

結 論

NSCLC67例を対象にp16/MTS1遺伝子異常と蛋白発現を検索し以下の結論を得た。

1. NSCLC67例中、p16/MTS1構造異常を15例(22.4%)に、染色体9p21のLOHを26例(38.8%)に認めた。
2. 全症例において、p16/MTS1染色率は臨床的病期の進行とともに、またt因子の増大とともに有意に低下した。
3. 扁平上皮癌において、p16/MTS1染色率はN因子が増大とともに有意に低下した。腺癌において、p16/MTS1染色率は低分化症例が高分化症例に比し有意に低値であった。
4. p16/MTS1遺伝子構造異常や染色体9p21のLOHの有無とNSCLCの臨床病理学的因子とに相関を認めなかった。
5. p16/MTS1染色率とp16/MTS1遺伝子構造異常との相関を認めなかった。p16/MTS1染色率は、LOHを認めた群は認めない群に比べ有意に低値であった。
6. p16/MTS1遺伝子構造異常やLOHの有無と生存率とに相関を認めなかった。
7. NSCLC、とりわけ腺癌においてp16/MTS1高発現群は低発現群に比べ有意に良好な生存率を示した。肺腺癌においてp16/MTS1発現は予後予測因子となりうる事が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始、直接実験のご指導を賜りました大村健二講師、川上和之助手に心から感謝いたします。本研究の遂行にあたりご協力頂きました金沢大学医学部第一外科教室員の皆様に深く感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第97回日本外科学会総会(1997, 京都)において発表した。

文 献

- 1) 渡辺洋宇. 肺癌の診断・治療. クリニカルスタディ 15: 299-302, 1994
- 2) 秋山徹. 癌抑制遺伝子の機能と変異 RB蛋白質の機能. 実験医学 10: 2159-2165, 1992.
- 3) Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487-497, 1993
- 4) Pines J. Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochem Soc Trans* 21: 921-925, 1993
- 5) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif

in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707, 1993

- 6) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816, 1993
- 7) Kamb A, Gruis NA, Weaver Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day R Sr, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994
- 8) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756, 1994
- 9) 日本肺癌学会編. 臨床・病理: 肺癌取り扱い規約, 改訂第4版, 23-30頁, 金原出版, 東京, 1995
- 10) Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 55: 6006-6011, 1995
- 11) 安田秀世. 哺乳類細胞のG1/S, G2/M転移とサイクリン・cdc2キナーゼ. *細胞* 24: 274-278, 1992
- 12) Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 7: 1572-1583, 1993
- 13) Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 375: 506-510, 1995
- 14) Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8: 2939-2952, 1994
- 15) Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene* 9: 3375-3378, 1994
- 16) Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Henglein B, Jansen Durr P. Activation of the E2F transcription factor by cyclin D1 is blocked by p16INK4, the product of the putative tumor suppressor gene MTS1. *Oncogene* 9: 3475-3482, 1994
- 17) Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11045-11049, 1994
- 18) Cheng JQ, Jhanwar SC, Lu YY, Testa JR. Homozygous deletions within 9p21-p22 identify a small critical region of chromosomal loss in human malignant mesotheliomas. *Cancer Res* 53: 4761-4763, 1993
- 19) Kowalczyk J, Sandberg AA. A possible subgroup of ALL with 9p-. *Cancer Genet Cytogenet* 9: 383-385, 1983
- 20) Diaz MO, Rubin CM, Harden A, Ziemin S, Larson RA, Le Beau MM, Rowley JD. Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 322: 77-82, 1990

- 21) Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 265: 415-417, 1994
- 22) Spruck CHR, Gonzalez Zulueta M, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC, Jones PA. p16 gene in uncultured tumours. *Nature* 370: 183-184, 1994
- 23) Zhou X, Tarmin L, Yin J, Jiang HY, Suzuki H, Rhyu MG, Abraham JM, Meltzer SJ. The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors. *Oncogene* 9: 3737-3741, 1994
- 24) Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the MTS1 / CDK4I (multiple tumor suppressor/ cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 54: 3396-3397, 1994
- 25) Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8: 27-32, 1994
- 26) Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54: 6353-6358, 1994
- 27) Ueki K, Rubio MP, Ramesh V, Correa KM, Rutter JL, von Deimling A, Buckler AJ, Gusella JF, Louis DN. MTS1/CDKN2 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 3: 1841-1845, 1994
- 28) Hayashi N, Sugimoto Y, Tsuchiya E, Ogawa M, Nakamura Y. Somatic mutations of the MTS (multiple tumor suppressor) 1/CDK4I (cyclin-dependent kinase-4 inhibitor) gene in human primary non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1426-1430, 1994
- 29) Zhang SY, Klein Szanto AJ, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, Goodrow TL. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res* 54: 5050-5053, 1994
- 30) Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yoshimatsu T, Yoshino I, Yano K, Nakanishi R, Ichiyoshi Y, Yasumoto K. Prognostic value of the immunohistochemical detection of p16INK4 expression in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 80: 389-395, 1997
- 31) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766-2770, 1989
- 32) 永里敦. 甲状腺分化癌の再発因子に関する分子生物学的研究-免疫組織学的研究-. *十全医会誌* 105: 350-362, 1996
- 33) Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ, Serrano M, Hannon GJ, Shiseki M, Zariwala M. Mutations in the p16 INK4/MTS1/CDKN2, p15 INK4B /MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res* 55: 1448-1451, 1995
- 34) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1: 686-692, 1995
- 35) Reed JA, Loganzo F, Jr., Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 55: 2713-2718, 1995
- 36) 大野厚子. 新しい癌抑制遺伝子p16/CDKN2/MTS1 geneの肺癌における異常. *日本臨床* 54: 503-506, 1996
- 37) Kamiya H, Kawakami K, Miyanaga T, Omura K, Oda M, Murakami S, Watanabe Y. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is associated with expression of p16 in human lung cancer. *Oncol Rep* 5: 911-914, 1998
- 38) Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 11: 210-212, 1995

