

原発性非小細胞肺癌におけるRb蛋白およびp53蛋白発現の予後因子としての

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/2297/9447

原発性非小細胞肺癌における Rb 蛋白および p53 蛋白発現の予後因子としての意義

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

横 山 浩 一

悪性腫瘍の発生, 進展に関与している Rb および p53 経路の肺癌における意義を明らかにする目的で本研究を行った。原発性非小細胞肺癌 I 期 153 例を対象に Rb (retinoblastoma) 蛋白および p53 蛋白の発現を免疫組織学的に検出し, 臨床病理学的因子および予後との相関を検討した。免疫組織染色の判定は, 透過顕微鏡画像解析装置 CAS200 を用いた定量分析法にて陽性面積比を測定し, 各標本の陰性コントロールのその 2 倍以上を陽性とした。臨床病理学的因子として性別, 年齢, 組織型, T 因子, 分化度, リンパ管および静脈への脈管侵襲を選択した。I 期症例全体における Rb 蛋白発現率は 62.7% (96/153 例) であった。Rb 蛋白発現率は各臨床病理学的因子のうち組織型で扁平上皮癌 83.0% (44/52 例) と腺癌 49.4% (44/89 例) と有意差を認めた ($p < 0.0001$)。一方 I 期症例全体における p53 蛋白発現率は 54.9% (84/153 例) であり, p53 蛋白発現率は各臨床病理学的因子のうち組織型で扁平上皮癌 67.3% (35/52 例), 腺癌 47.2% (42/89 例) と有意差を認めた ($p < 0.05$)。分化度別では中分化型および低分化型の p53 蛋白発現率 68.6% (35/51 例), および 71.4% (15/21 例) は高分化型の発現率 42.0% (34/81 例) と比べ有意差を認めた (各々 $p < 0.005$, $p < 0.05$)。また, Rb 蛋白発現率と p53 蛋白発現率の間には有意な相関は認めなかった。Rb 蛋白発現と予後との検討では, I 期症例全体では 5 年生存率が Rb 蛋白陽性例 75.7%, 陰性例 59.2% と陰性例に生存率の低下傾向がみられた ($p = 0.05$)。これを組織型別にみた場合, 扁平上皮癌では有意差を認めなかったが, 腺癌において 5 年生存率は Rb 蛋白陽性例 88.6%, 陰性例 60.9% と Rb 蛋白陰性例が有意に不良であった ($p < 0.005$)。T 因子別にみると, T2 では有意差を認めなかったが, T1 における 5 年生存率は Rb 蛋白陽性例 91.0%, 陰性例 68.6% と陰性例が有意に不良であった ($p < 0.01$)。さらに組織型別に T 因子を再分類してみると, 腺癌 T1 の 5 年生存率は Rb 蛋白陽性例 100%, 陰性例 69.2% と陰性例が有意に不良であった ($p < 0.005$)。しかし腺癌 T2, 扁平上皮癌では有意差を認めなかった。また p53 蛋白発現と予後との検討では, 症例全体では 5 年生存率が p53 蛋白陽性例 63.1%, 陰性例 77.7% と陽性例で生存率の低下傾向を認めた ($p = 0.08$)。組織型別の検討では, 扁平上皮癌では有意差を認めなかったが, 腺癌の 5 年生存率は p53 蛋白陽性例 60.2%, 陰性例 88.9% と陽性例が有意に予後不良であった ($p < 0.005$)。T 因子別にみると, T1 における 5 年生存率は p53 蛋白陽性例 75.1%, 陰性例 90.5% と陽性例に予後不良な傾向であった ($p = 0.07$)。組織型別に T 因子を再分類してみると, 腺癌 T1 の 5 年生存率は p53 蛋白陽性例 74.2%, 陰性例 96.9%, 腺癌 T2 の 5 年生存率は陽性例 20.8%, 陰性例 69.3% といずれも陽性例で有意に不良であった (各々 $p < 0.05$)。さらに Rb 蛋白発現および p53 蛋白発現を組み合わせ 4 群に分類し予後を検討した。症例全体では, Rb 蛋白陰性かつ p53 蛋白陽性群の 5 年生存率 37.9% は他の 3 群に比べ有意に予後不良であった ($p < 0.01$)。組織型別にみると扁平上皮癌では有意差を認めなかったが, 腺癌では Rb 蛋白陰性かつ p53 蛋白陽性群の 5 年生存率 35.4% は他の 3 群より有意に不良であった ($p < 0.005$)。さらに腺癌を T 因子で再分類すると, 腺癌 T1 例で Rb 蛋白陰性かつ p53 蛋白陽性群の 5 年生存率 42.9% は他の 3 群より有意に不良であった ($p < 0.001$)。Rb 蛋白発現, p53 蛋白発現, T 因子, リンパ管および静脈侵襲について多変量解析により予後への関与度を検討した。全体では Rb 蛋白陰性, T2 が独立した予後不良因子であった。腺癌では Rb 蛋白陰性, p53 蛋白陽性および T2 が独立した予後不良因子であった。しかし扁平上皮癌ではリンパ管侵襲陽性のみが予後不良因子であった。以上の結果から, I 期原発性非小細胞肺癌, 特に腺癌において, Rb 蛋白発現と p53 蛋白発現は予後規定因子と思われた。また, 両者を組み合わせ検討することで予後不良群を推定する可能性が示唆された。

Key words non-small cell lung cancer, Rb protein, p53 protein, prognostic factor

肺癌は近年増加傾向にあり, 1993 年に男性においては胃悪性腫瘍を抜き癌死因の第 1 位となり¹⁾, 1998 年には男女合計の死亡数は 5 万 1 千人とされ癌死亡の第 1 位となった。原発性肺癌は I 期症例でも 5 年生存率が 60~70% と他臓器癌と比べて予

後不良であり, 臨床病理学的因子以外の分子生物学的因子の予後への関与が示唆され, 予後改善のためには I 期症例のなかから予後不良群を抽出する必要性がある。

さまざまな研究者によって種々の悪性腫瘍と各種癌関連遺伝

平成 11 年 9 月 8 日受付, 平成 11 年 10 月 20 日受理

Abbreviations : DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; MDM2, mouse double minute 2

子の関与が研究されてきたが、悪性腫瘍の発生、進展には、Rb (retinoblastoma) 遺伝子を中心とするRb経路およびp53遺伝子を中心とするp53経路の両経路が重要な役割を果たしていることが判明した。Rb経路の変異は異常増殖能の獲得に必要であり、p53経路の変異はアポトーシス防止のために必要とされる。

Rb 遺伝子は肺癌においては小細胞肺癌のほぼ全例で遺伝子の不活性化がみられるのに対し、非小細胞肺癌では遺伝子の不活性化は10～30%と低頻度であり、予後との関連も低いとの報告もある²⁾。一方、p53 遺伝子に関しては小細胞肺癌の約75%に、非小細胞肺癌では約半数に遺伝子異常がみられると報告されている³⁾。現段階でp53 遺伝子は、癌抑制遺伝子の中で癌の発生、進展に最も関与が深いとされ、遺伝子治療にも用いられている⁴⁾。そこで本研究では、原発性非小細胞肺癌におけるRb 遺伝子とp53 遺伝子の発現を免疫組織学的染色を用いて検出し、臨床病理学的因子およびその予後との相関について検討した。

対象および方法

I. 対象

1987年1月から1991年12月までに金沢大学医学部外科学第一講座にて、絶対治癒切除術を施行した術後病理病期I期の原発性非小細胞肺癌153症例を対象とした。切除材料は病院病理部にてホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックとして保存されているものを使用した。性別は男性100例、女性53例、年齢は41歳から80歳(平均64.9歳)であった。肺癌取り扱い規約改訂第4版⁵⁾に基づく分類では、組織型は扁平上皮癌52例、腺癌89例、その他12例であった。T因子はT1 91例、T2 62例であった。分化度は高分化型81例、中分化型51例、低分化型21例であった。

II. 方法

1. Rb 蛋白およびp53 蛋白に対する免疫組織染色法

パラフィン包埋された癌組織を4 μ mの厚さに薄切片し、シランコーティングスライド(武藤化学, 東京)に付着させ、100%キシレン(和光純薬, 東京)で10分間、3回の脱パラフィンを行った。ついで、100%3回、90%、70%エタノール(和光純薬)にて親水し、流水水洗した。次に、0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)にて500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行った。20分間室温にて冷却した後、3.0%過酸化水素(和光純薬)加PBSで15分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した。流水水洗後、正常牛血清(ダコジャパン, 京都)を用いて、非特異的反応のプロッキングを室温で10分間行った。ついで、抗Rb蛋白抗体(clone 3H9)(ダコジャパン)はPBSにて30倍に希釈し、抗p53蛋白抗体(DO-7)(ダコジャパン)はPBSにて100倍に希釈し、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させた。続いてPBSにて5分間、3回洗浄後、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ抗体(ダコジャパン)を用いて室温にて20分間反応させ、PBSにて5分間、3回洗浄後、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)を室温にて20分間反応させた。PBSにて5分間、3回洗浄後、発色剤を用いて発色させた。発色剤は、四塩酸3,3'-ジアミノベンチジン(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)(和光純薬)30mgを150mlのPBSに溶解濾過後、30 μ lの3.0%過酸化水素水を加えて作製した。発色の状態を顕微鏡で確認しながら3～6分反応させ、流水で10分間水洗後、20秒間へ

マトキシリンにて核染色を行い、10分間流水水洗による色出しを行った後、100%エタノールで3回脱水、100%キシレンにて3回透徹を行い、マリノール(武藤化学)にて封入した。

2. Rb 蛋白およびp53 蛋白に対する免疫組織染色の判定

免疫組織染色の定量的測定には透過光顕微鏡画像解析装置であるCAS200イメージ分析装置(Cell Analysis Systems, Elmhurst, USA)を用いた。ヘマトキシリンによる核染色は620nmの波長で測光し、DABの吸光度は500nmの波長で測光した。Rb蛋白およびp53蛋白の発現率の測定は定量分析法を用い、全核面積に対するDABで発色した核の面積比(陽性面積比, % positive area)を求めて行った。測定は染色良好な部位より400倍で15～20視野でおこない平均値を求めた。判定は各標本の陰性コントロールの陽性面積比との比を求め、2倍以上を陽性、2倍未満を陰性とした。

3. リンパ管侵襲および静脈侵襲の判定

脈管侵襲については、各症例の原発巣に近接した周辺部におけるリンパ管および静脈内の腫瘍細胞侵襲の有無を検討した。リンパ管侵襲と静脈侵襲は両者とも内皮細胞に裏打ちされた管腔内への集塊状、腺構造様の癌細胞の存在として認められ、癌細胞群と内膜内皮細胞との間の空隙の有無や管腔壁の弾性線維の存在の有無などによってリンパ管侵襲と静脈侵襲とを区別した。分類に当たってはHE染色とエラスチカファンギン染色を併用して判定した。

III. 統計学的処理

測定値は平均値 \pm 標準偏差値で示した。各臨床病理学的因子についてRb, p53蛋白発現率の差の検定には χ^2 検定を用いた。ただし期待度数が5以下のセルがある場合にはFisherの直接確率計算法を用いた。生存率はKaplan-Meier法にて算出し、有意差検定はLog-rank法にて行った。また生存率への関与度についての多変量解析には、Cox比例ハザードモデルを用いた。いずれも危険率5%未満の場合($p < 0.05$)を統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. Rb 蛋白発現の検討

1. Rb 蛋白発現率

症例全体での陽性面積比の平均値は12.67 \pm 10.16%であった。Rb蛋白免疫組織染色像を図1に、CAS200によって得られ

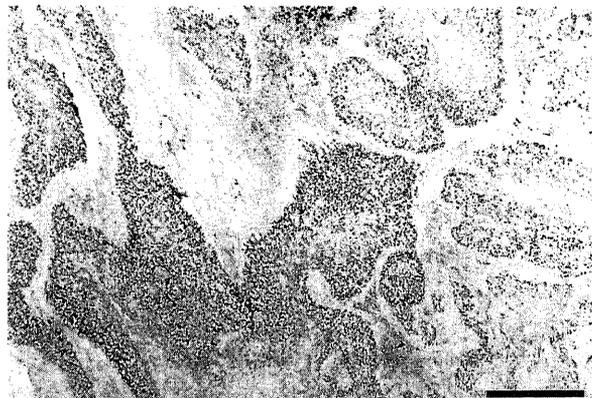


Fig. 1. Immunohistochemical staining for Rb protein in epidermoid carcinoma. The nuclei of Rb protein-positive cells were stained strongly. Scale bar, 500 μ m.

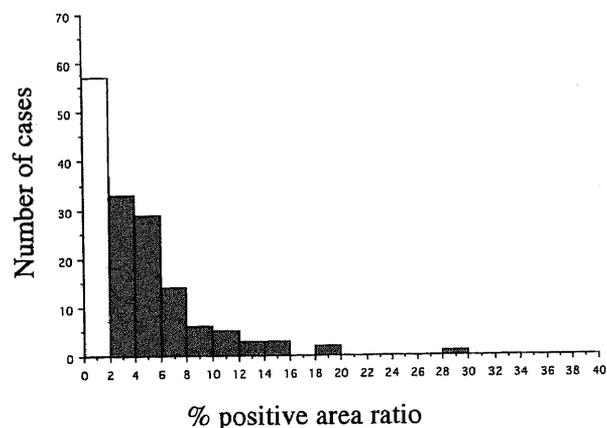


Fig. 2. Distribution of % positive area ratio (% positive area of specimen / % positive area of control) for Rb protein with a CAS 200 image analyzer. □, Rb protein-negative cases; ■, Rb protein-positive cases.

た陽性面積比と各標本の陰性コントロールのそれとの比の分布を図2に示す. 153例中96例(62.7%)でRb蛋白陽性であった.

2. Rb蛋白発現と各臨床病理学的因子との相関

各臨床病理学的因子別のRb蛋白発現率を表1左欄に示す. 性別, 年齢別, T因子別, 分化度別, リンパ管侵襲および静脈侵襲別では発現率に有意差は認めなかった. 組織型別のRb蛋白発現率は, 扁平上皮癌52例中44例(83.0%), 腺癌89例中44例(49.4%)と扁平上皮癌で有意に高い発現率であった($p < 0.0001$).

3. Rb蛋白発現と予後

症例全体の5年生存率は, Rb蛋白陽性例では75.7%, 陰性例では59.2%と, 陰性例で生存率が不良な傾向がみられた($p=0.05$) (図3-A). 組織型別では, 腺癌の5年生存率はRb蛋白陽性例で88.6%, 陰性例で60.9%と陰性例で有意に生存率が不良であった($p < 0.005$) (図3-B). しかし扁平上皮癌の5年生存率はRb蛋白陽性例で71.5%, 陰性例で55.6%であり生存率に有意差は認めなかった(図3-C). T因子別では, T1の5年生存率はRb蛋白陽性例で91.0%, 陰性例で68.6%と陰性例の生存率は有意に不良であった($p < 0.01$) (図4). T2ではRb蛋白発現率と予後に有意差はみられなかった. 分化度別では, 高分化型の5年生存率はRb蛋白陽性例で84.4%, 陰性例で61.0%

Table 1. Correlation between clinicopathological factors and incidence of Rb and p53 protein in 153 stage I non-small cell lung cancer cases

Clinicopathological factors	No. of cases	No. (%) of Rb protein-positive cases	No. (%) of p53 protein-positive cases
All	153	96 (62.7%)	84 (54.9%)
Sex			
Male	100	61 (61.0%)	56 (56.0%)
Female	53	35 (66.0%)	28 (52.8%)
		NS	NS
Age (years)			
≤ 60	46	31 (67.4%)	27 (58.7%)
≥ 61	107	65 (60.7%)	57 (53.3%)
		NS	NS
Histology			
Adenocarcinoma	89	44 (49.4%)	42 (47.2%)
Epidermoid carcinoma	52	44 (83.0%)	35 (67.3%)
Others	12	8 (66.7%)	7 (58.3%)
		*	**
T factor			
1	91	56 (61.5%)	49 (53.8%)
2	92	40 (43.5%)	35 (38.0%)
		NS	NS
Differentiation			
Well	81	47 (58.0%)	34 (42.0%)
Moderately	51	35 (68.6%)	35 (68.6%)
Poorly	21	14 (66.7%)	15 (71.4%)
		NS	***
Lymphatic vessel invasion			
Positive	65	40 (61.5%)	37 (56.9%)
Negative	88	56 (63.6%)	47 (53.4%)
		NS	NS
Venous invasion			
Positive	63	42 (66.7%)	38 (60.0%)
Negative	90	54 (60.0%)	46 (51.1%)
		NS	NS

Chi-square test was performed. NS, not significant.
* $p < 0.0001$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.005$.

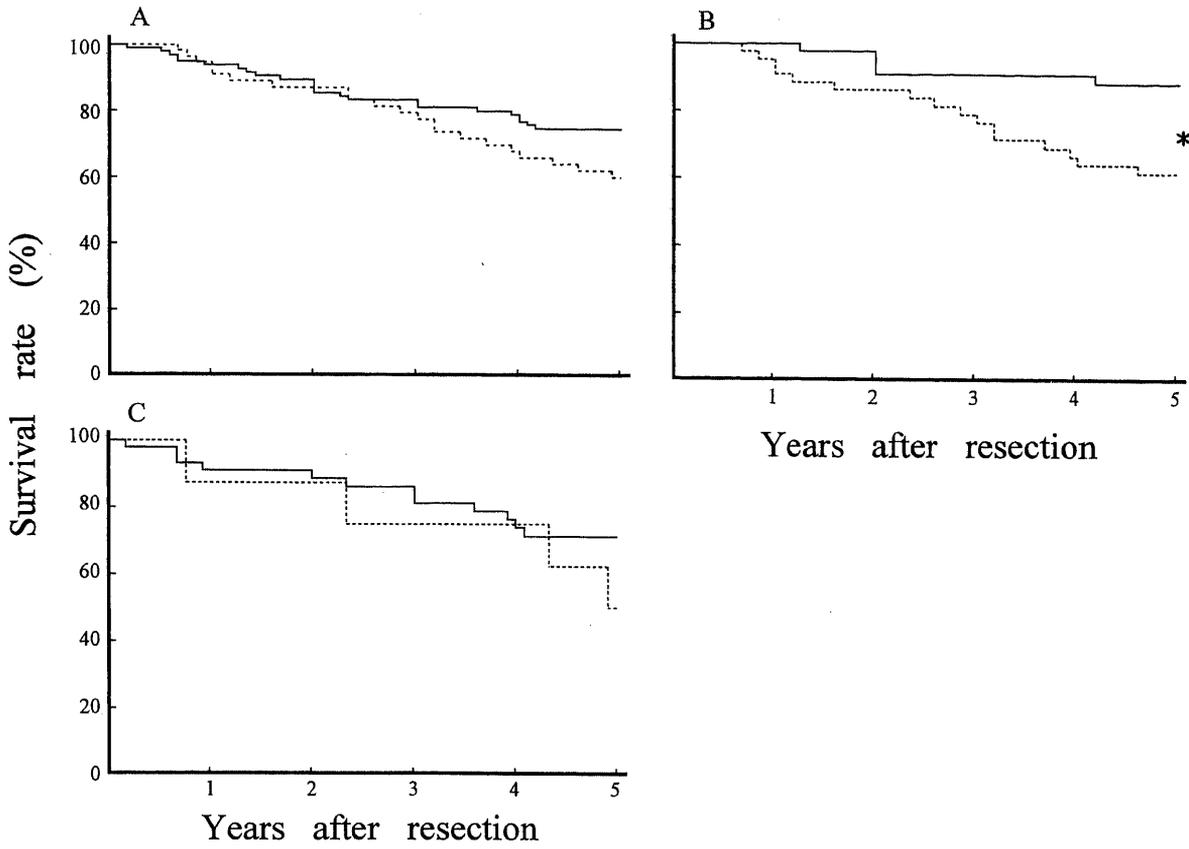


Fig. 3. Survival curves of stage I non-small cell lung cancer patients subdivided according to Rb protein-expression. —, Rb protein-positive cases; - - - - -, Rb protein-negative cases. (A) All patients (n=153). (B) Adenocarcinoma patients (n=89). (C) Epidermoid carcinoma patients (n=52). * $p < 0.005$, by log-rank test.

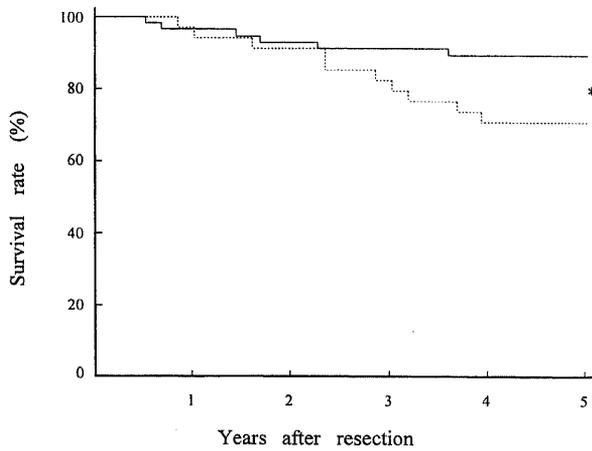


Fig. 4. Survival curves of T1 non-small cell lung cancer patients subdivided according to Rb protein-expression (n=91). —, Rb protein-positive cases; - - - - -, Rb protein-negative cases. * $p < 0.01$, by log-rank test.

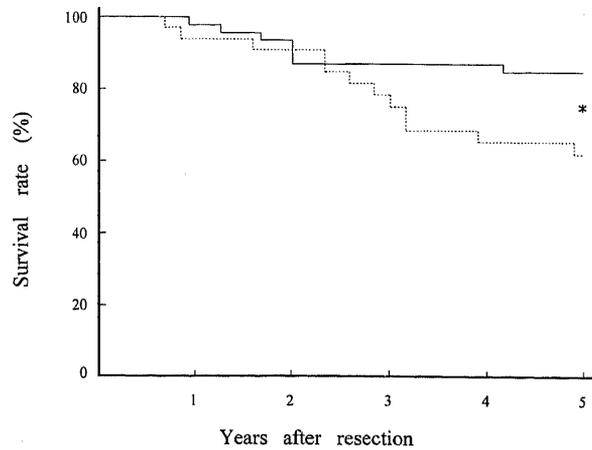


Fig. 5. Survival curves of well differentiated non-small cell lung cancer patients subdivided according to Rb protein-expression (n=81). —, Rb protein-positive cases; - - - - -, Rb protein-negative cases. * $p < 0.05$, by log-rank test.

Table 2. Comparison of survival rate based on Rb protein-expression on stage I non-small cell lung cancers

Histology	No. of cases	Survival rate (%) ^{a)}				p-value ^{b)}
		Rb protein				
		Positive		Negative		
		3-year	5-year	3-year	5-year	
Adenocarcinoma	89	90.9	88.6	76.1	60.9	<0.005
T1	63	100	100	80.8	69.2	<0.005
T2	26	63.6	54.5	69.8	39.9	NS
Epidermoid carcinoma	52	81.3	71.5	77.8	55.6	NS
T1	22	94.7	89.2	66.7	66.7	NS
T2	30	71.1	57.8	80.0	40.0	NS

NS, not significant.

a) By Kaplan-Meier method.

b) By log-rank test.

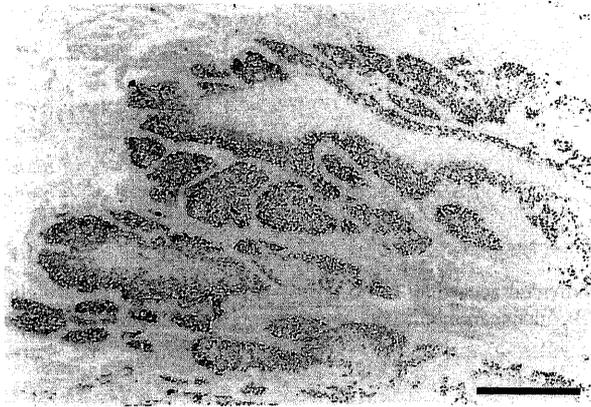
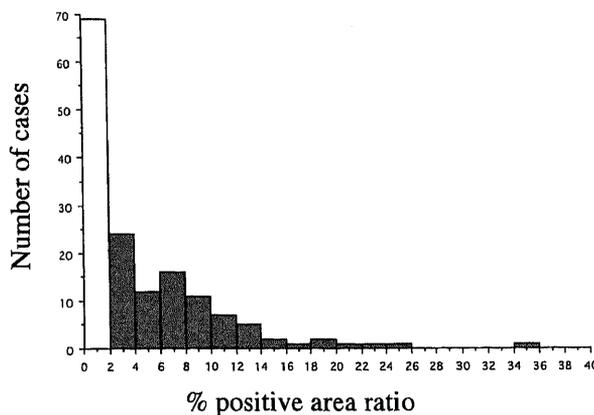
Fig. 6. Immunohistochemical staining of p53 protein in epidermoid carcinoma. The nuclei of p53 protein-positive cells were stained strongly. Scale bar, 500 μ m.

Fig. 7. Distribution of % positive area ratio (% positive area of specimen / % positive area of control) for p53 protein with a CAS 200 image analyzer. □, p53 protein-negative cases; ▨, p53 protein-positive cases.

と陰性例は有意に生存率が不良であった ($p < 0.05$) (図5)。中分化型、低分化型では有意差を認めなかった。

さらに組織型別にT因子を再分類してみると、腺癌T1の5年生存率はRb蛋白陽性例で100%、陰性例で69.2%であり陰性例は有意に生存率が不良であった ($p < 0.005$)。腺癌T2、扁平上皮癌T1、T2のいずれも生存率に有意差は認められなかった(表2)。

II. p53蛋白発現の検討

1. p53蛋白発現率

症例全体での陽性面積比の平均値は $15.15 \pm 14.78\%$ であった。p53蛋白免疫組織染色像を図6に、CAS200によって得られた陽性面積比と各標本の陰性コントロールのそれとの比の分布を図7に示す。153例中84例(54.9%)にp53蛋白陽性であった。

2. p53蛋白発現率と臨床病理学的因子との相関

各臨床病理学的因子別のp53蛋白発現率を表1右欄に示す。性別、年齢別、T因子別、リンパ管侵襲および静脈侵襲別では発現率に有意差は認めなかった。組織型別のp53蛋白発現率は、扁平上皮癌52例中35例(67.3%)、腺癌89例中42例(47.2%)と扁平上皮癌で有意に高い発現率であった ($p < 0.05$)。分化度別のp53蛋白発現率は、高分化型81例中34例(42.0%)、中分化型51例中35例(68.6%)、低分化型19例中15例(78.9%)と分化度が高くなるにつれ発現率の低下がみられ、高分化型は中分化型、低分化型に比べ有意差をもって発現率の低下を認めた(各々 $p < 0.005$, $p < 0.05$)。

3. p53蛋白発現と予後

症例全体の5年生存率はp53蛋白陽性例では63.1%、陰性例では77.7%と、陽性例で生存率が不良な傾向を示した ($p=0.08$) (図8-A)。組織型別では、腺癌の5年生存率はp53蛋白陽性例で60.2%、陰性例で88.9%であり陽性例で有意に生存率が不良であった ($p < 0.005$) (図8-B)。しかし扁平上皮癌の5年生存率はp53蛋白陽性例で72.3%、陰性例で58.8%であり生存率に有意差は認めなかった(図8-C)。T因子別では、T1の5年生存率はp53蛋白陽性例で75.1%、陰性例で90.5%であり、T1では陽性例の生存率は不良な傾向を示した ($p=0.07$)。T2では差はみられなかった。分化度別では、高分化型の5年生存率はp53蛋白陽性例で64.3%、陰性例で84.4%と陽性例は有意に予後が不良であった ($p < 0.05$) (図9)。中分化型、低分化型では有意差

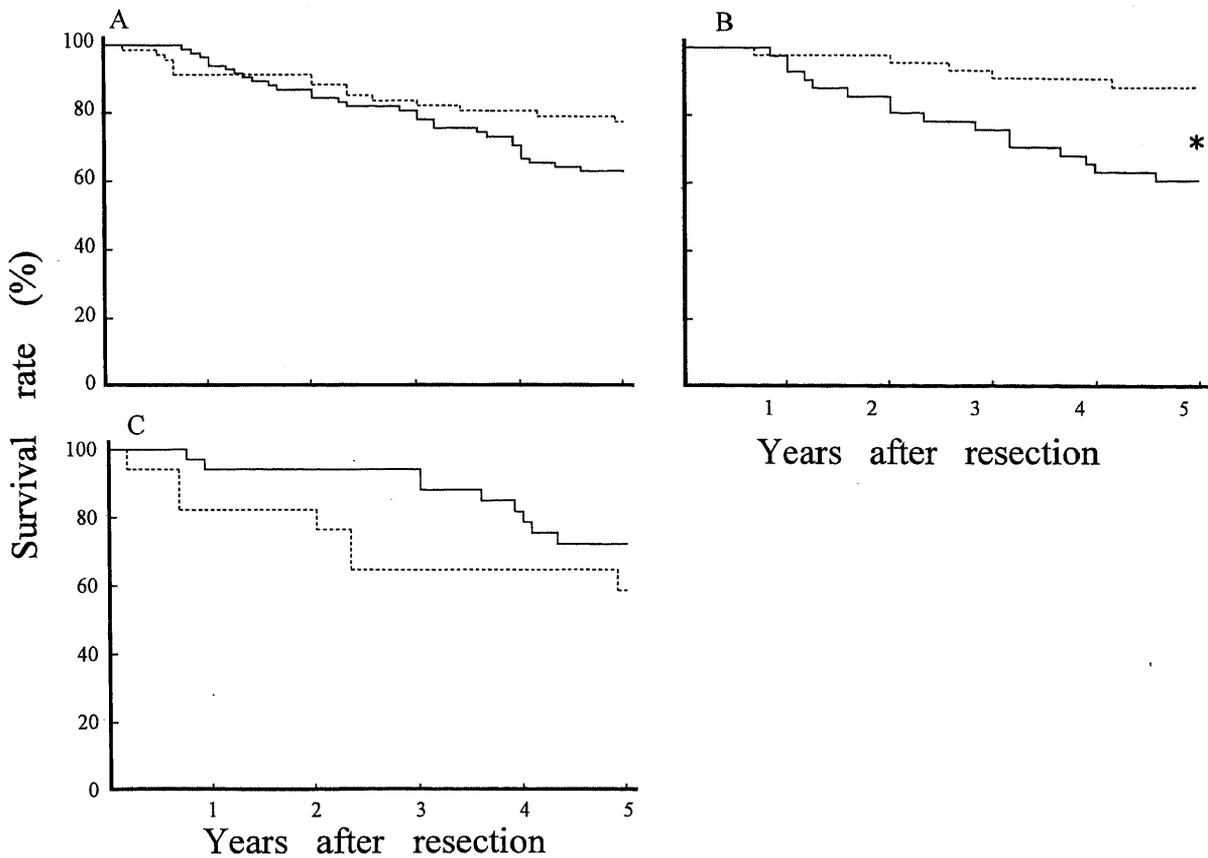


Fig. 8. Survival curves of stage I non-small cell lung cancer patients subdivided according to p53 protein-expression. —, p53 protein-positive cases; , p53 protein-negative cases. (A) All patients (n=153). (B) Adenocarcinoma patients (n=89). (C) Epidermoid carcinoma patients (n=52). * $p < 0.005$, by log-rank test.

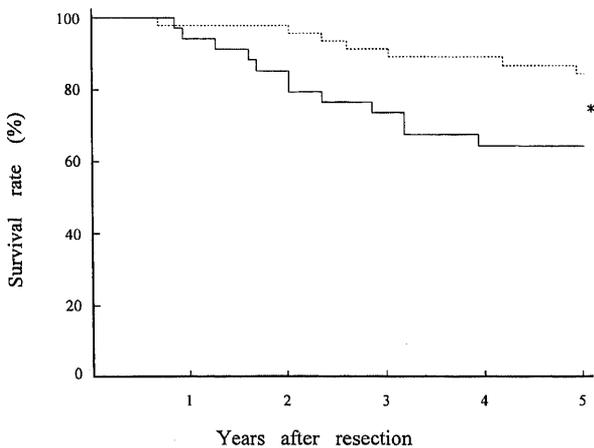


Fig. 9. Survival curves of well differentiated non-small cell lung cancer patients subdivided according to p53 protein-expression (n=81). —, p53 protein-positive cases; , p53 protein-negative cases. * $p < 0.05$, by log-rank test.

を認めなかった。

さらに組織型別にT因子を再分類してみると、肺癌T1の5年生存率はp53蛋白陽性例で74.2%、陰性例で96.9%であり陽性例で有意に生存率が不良であった ($p < 0.05$)。また腺癌T2の5年生存率はp53蛋白陽性例で20.8%、陰性例で69.3%と、陽性例で有意に生存率が不良であった ($p < 0.05$)。しかし扁平上皮癌では、T1、T2のいずれでも予後に有意差は認めなかった(表3)。

III. Rb蛋白発現とp53蛋白発現との相関

症例全体でRb蛋白陽性例と陰性例の間にp53蛋白発現率の差は認められなかった。また組織型別でもRb蛋白陽性例と陰性例の間にp53蛋白発現率の差は認められなかった。

Rb蛋白発現およびp53蛋白発現を組み合わせて予後の検討を行った。すなわち、Rb蛋白陽性、陰性およびp53蛋白陽性、陰性で4群に分けた。症例全体での5年生存率はRb蛋白陰性かつp53蛋白陽性で37.9%と他の3群に比べ有意に生存率が不良であった ($p < 0.01$) (図10-A)。組織型別では、腺癌での5年生存率はRb蛋白陰性かつp53蛋白陽性群で35.4%と他の3群より有意に生存率が不良であった ($p < 0.005$) (図10-B)。しかし扁平上皮癌では4群間に差を認めなかった(図10-C)。また腺癌T1における4群間の比較では、Rb蛋白陰性かつp53蛋白陽性群の5年生存率は42.9%と他の3群より有意に生存率が不良であった ($p < 0.001$) (図10-D)。

IV. 多変量解析による予後不良因子の解析

症例全体におけるRb蛋白陰性、p53蛋白陽性、T2、リンパ管侵襲陽性および静脈侵襲陽性の各因子について多変量解析を行い、予後への関与度について検討した(表4)。その結果、症例全体ではRb蛋白陰性($p < 0.05$)とT2($p < 0.005$)が独立した予後不良因子であった。p53蛋白陽性は予後不良因子の傾向を

示した。さらに腺癌、扁平上皮癌についても同様に検討した(表5, 6)。腺癌ではRb蛋白陰性($p < 0.05$)、p53蛋白陽性($p < 0.05$)およびT2($p < 0.01$)が独立した予後不良因子であったが、扁平上皮癌ではリンパ管侵襲陽性($p < 0.01$)のみが独立した予後不良因子であった。

Table 3. Comparison of survival rate based on p53 protein-expression on stage I non-small cell lung cancers

Histology	No. of cases	Survival rate (%) ^{a)}				p-value ^{b)}
		p53 protein				
		Positive	Negative	3-year	5-year	
Adenocarcinoma	89	75.2	60.2	91.1	88.9	<0.005
T1	63	83.9	74.2	96.9	96.9	<0.05
T2	26	51.9	20.8	77.9	69.3	<0.05
Epidermoid carcinoma	52	88.0	72.3	64.7	58.8	NS
T1	22	94.7	89.2	66.7	66.7	NS
T2	30	71.1	57.8	80.0	40.0	NS

NS, not significant.

a) By Kaplan-Meier method.

b) By log-rank test.

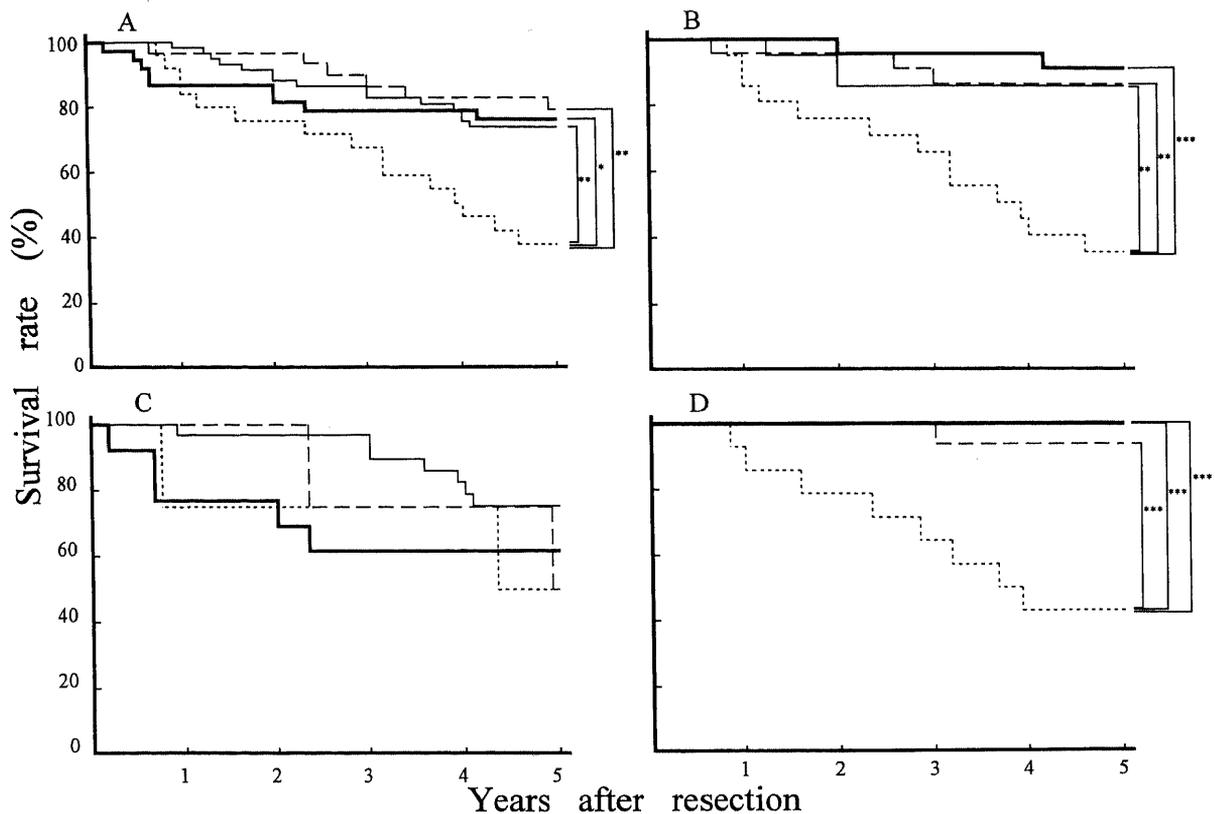


Fig. 10. Survival curves of stage I non-small cell lung cancer patients subdivided according to the Rb and p53 status.—, cases of Rb-positive and p53-positive tumor; —, cases of Rb-positive and p53-negative tumor; ·····, cases of Rb-negative and p53-positive tumor; - · - ·, cases of Rb-negative and p53-negative tumor. (A) All patients (n=153). (B) Adenocarcinoma patients (n=89). (C) Epidermoid carcinoma patients (n=52). (D) T1 in adenocarcinoma patients (n=63). * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, by log-rank test.

Table 4. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on stage I non-small cell lung cancers

Variables	χ^2	p-value
Rb expression-negative	4.998	0.0254
p53 expression-positive	2.983	0.0841
T2	9.690	0.0019
Lymphatic vessel invasion-positive	1.975	0.1599
Venous invasion-positive	0.014	0.9044

Table 5. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on stage I adenocarcinoma patients

Variables	χ^2	p-value
Rb expression-negative	5.366	0.0205
p53 expression-positive	6.536	0.0106
T2	7.470	0.0063
Lymphatic vessel invasion-positive	0.017	0.8959
Venous invasion-positive	0.473	0.4914

Table 6. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on stage I epidermoid carcinoma patients

Variables	χ^2	p-value
Rb expression-negative	0.092	0.7611
p53 expression-positive	2.073	0.1500
T2	2.278	0.1312
Lymphatic vessel invasion-positive	6.795	0.0091
Venous invasion-positive	3.742	0.0531

考 察

癌抑制遺伝子は細胞の癌化を抑制する遺伝子群の総称であり、その機能が失活することによって癌が発生、増殖する⁶⁾。現在報告されている癌抑制遺伝子には、Rb遺伝子、p53遺伝子、APC (Adenomatous polyposis coli) 遺伝子、p16遺伝子、ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) 遺伝子などがあるが、Rb遺伝子は1986年にWeinbergら⁷⁾により最初に単離された癌抑制遺伝子である。Rb遺伝子は第13染色体のq14上に存在し、産物であるRb蛋白は核に局在する分子量約110kDaの蛋白質である⁸⁾。Rb蛋白の働きは非磷酸化状態でS期の開始に必要な転写因子E2F (E2 promotor factor) と複合体を形成しE2Fの働きを抑制し細胞周期をG1期で止めることである^{9)~10)}。Rb蛋白が磷酸化を受けE2Fとの結合がはずれると、細胞周期がS期に進行する。Rb蛋白を中心とした増殖調節機構がRb経路であり、この経路に異常が生じると細胞周期がG1/S期において制御不能となり異常増殖をきたす可能性がある。

Rb遺伝子の産物であるRb蛋白は半減期が6時間以上の安定

な核内蛋白質であり、ほとんどの正常組織で発現している。これまでにRb遺伝子の異常は網膜芽細胞腫、骨肉腫、乳癌、膀胱癌、膠芽腫、白血病など50%以上の悪性腫瘍で報告されている^{7)11)~14)}。肺癌における異常は小細胞肺癌ではほぼ100%にみられるのに対し、非小細胞肺癌では10~30%と比較的低頻度であり、非小細胞肺癌ではRb遺伝子の関与が乏しいとの報告が多い²⁾。

p53遺伝子は、1989年にRb遺伝子について2番目に同定された癌抑制遺伝子であり、種々の悪性腫瘍でもっとも高頻度に遺伝子変異が検出されている¹⁵⁾。p53蛋白の主な機能は、G1期、G2/M期での細胞周期の停止¹⁶⁾、アポトーシスの誘導¹⁷⁾であり、遺伝子の守護神とも呼ばれている¹⁸⁾。このp53蛋白を中心とした機構がp53経路である。p53経路の異常によりアポトーシスを回避した細胞は永久増殖能を獲得し突然変異・遺伝子増幅・染色体異常が蓄積し、より悪性度が高くなるものと推定される¹⁹⁾。

p53遺伝子には野生型 (正常型) と変異型がある。野生型p53遺伝子の産物である野生型p53蛋白の半減期は5~20分と非常に短い。p53蛋白がMDM (Mouse double minute) 2蛋白と結合することによってポリユビキチン化され分解を受けるためである²⁰⁾²¹⁾。一般に変異型p53蛋白は野生型p53蛋白の機能を有していない。変異型p53蛋白によってはMDM2蛋白の転写が行われず、ユビキチン化の傷害がおこるので半減期は20時間以上と非常に長くなり細胞内に高濃度に蓄積する傾向がある²²⁾。本研究で用いたモノクローナル抗体 (DO-7) では野生型、変異型p53蛋白のいずれも染色されるが、半減期の長さから免疫組織染色にて同定されるのは変異型p53蛋白と考えて差し支えない。肺癌におけるp53遺伝子の異常は小細胞肺癌で75~85%、非小細胞肺癌で45~50%であり^{23)~25)}、現段階では肺癌の発生、進展に関与する確率をもっとも高い癌抑制遺伝子である。

本研究では、Rb蛋白の発現異常を免疫組織学的に評価し、臨床病理学的因子や予後との関連をp53蛋白発現と合わせて検討した。免疫組織染色による検索において、同一の癌組織内で発現異常が腫瘍の辺縁にのみ、あるいは局所性にみられる例が少なくない。標本周辺は免疫染色の際の乾燥等で生じる偽陽性のため、検討より除外した。Rbに関してXuら²⁶⁾は、異常Rb蛋白は核内に進入できないため免疫染色ではRb遺伝子変異はRb蛋白欠損と表現されると述べている。また正常Rb遺伝子を有する腫瘍細胞は異なった染色性を示すが、これは細胞周期によりRb蛋白量が異なることから免疫染色で陰性から強陽性となりうるためとも述べている。p53遺伝子については海老名ら²⁷⁾は、細胞内PCRを用いて同一の肺癌組織内における免疫組織染色陰性の癌細胞にも陽性細胞と同じ遺伝子変異があり、免疫染色能の差はmRNA量の差であることを示した。これらの結果から、免疫組織染色の判定に関しては標本周辺以外の免疫染色陽性の部分を選択し評価の対象とした。

免疫組織染色の判定には透過光顕微鏡画像解析装置である画像解析装置CAS200を使用した。従来の光学顕微鏡を用いた判定では、陽性・陰性の判定や染色の強弱の判定には測定者の主観や経験に依存し、測定者により測定値にばらつきがあるといわれている。そこで、画像解析装置CAS200を用いることで染色強度を数値化し免疫組織染色の客観的な評価、検討を行った。

腫瘍の発生、進展にRb遺伝子異常が重要な役割を果たして

いるが、腫瘍により関与の段階はさまざまである。骨肉腫²⁸⁾や網膜芽細胞腫⁷⁾などでは腫瘍の発生段階で関与するとされる。一方肝細胞癌²⁹⁾や膀胱癌¹²⁾などでは進行癌への段階で関与するとされる。さて肺癌では河野ら³⁰⁾は異形成から発癌への経路にRb遺伝子の不活化が関与すると述べている。

Rb蛋白発現率と予後との関連をみると、症例全体では陰性例で予後不良な傾向が認められ、組織型別では腺癌で陰性例が有意に予後不良であった。しかし、扁平上皮癌では予後の差を認めず、I期非小細胞肺癌では、特に腺癌においてRb蛋白発現は予後因子となりうるものと思われた。また多変量解析により、症例全体および腺癌において、Rb蛋白陰性は独立した予後不良因子であることが判明した。非小細胞肺癌ではRb遺伝子異常と予後との関連がないとする報告が多い^{23,31)}。しかしXuら³²⁾は、I期、II期101例の非小細胞肺癌についてRb蛋白発現は独立した予後因子であったと述べている。またDosaka-Akitaら³³⁾は、91例のI期からIII A期の非小細胞肺癌について全体ではRb蛋白発現と予後との相関を認めなかったが、腺癌44例では陰性例は予後不良の傾向であったと述べている。本研究ではI期に絞って検討したが、症例全体および腺癌において、Rb蛋白陰性は独立した予後不良因子との結果を得、I期の早期非小細胞肺癌でも予後因子の可能性が示唆された。

本研究では、T1、T2のRb蛋白発現率に有意差を認めなかったが、T1のみについてみるとRb蛋白陰性例の予後が有意に不良であった。これを組織型別でみると、扁平上皮癌では差がみられなかったが、腺癌ではRb蛋白陰性例で予後に有意差がみられた。これは非小細胞肺癌、特に腺癌においてRb遺伝子異常が癌化の比較的早期から関与し、より悪性度を高めることに関与している可能性を示すものと考えられた。しかしT2ではRb蛋白発現による予後の差を認めなかったが、その原因として、腫瘍の進行に伴いRb蛋白発現以外の因子の関与がより大きくなり予後の差として現れなくなったものと考えられた。教室の高島³⁴⁾は原発性非小細胞肺癌384例の検討で、癌の進行度、リンパ管侵襲はT因子と関連があると述べているが、腫瘍の増大に伴い諸因子がこの時点で関与が大きくなるものと思われる。

一方、p53遺伝子異常はヒト腫瘍において最も高頻度に認められており、種々の悪性腫瘍において発現の意義が検討されてきた。胃癌、乳癌においてはp53は悪性度の増強に関与し、p53蛋白発現は予後不良因子といわれ^{35,36)}、大腸ではp53遺伝子異常が腺腫から早期癌への進展に関与していることが明らかにされた³⁷⁾。肝細胞癌では癌化の早期段階では関与していないと報告されている²⁹⁾。肺においてはFranklinら³⁸⁾が気管支における過形成部位からp53の変異を報告しており、また横田ら³⁰⁾は、正常細胞から異形成への変化にp53が関与していると述べている。肺癌においてはp53遺伝子異常は早期の段階から関与しているものと思われた。

肺癌におけるp53蛋白発現と予後との関連については、一般に非小細胞肺癌での発現例は予後不良とする報告が多い。Nishioら³⁹⁾は非小細胞肺癌208例について検討し、症例全体では有意差を認めなかったが腺癌100例では予後因子となり得たと述べている。教室の家接⁴⁰⁾、大竹⁴¹⁾もI期からIV期の原発性非小細胞肺癌の検討でp53蛋白陽性は予後不良因子となりうるかと結論している。しかしI期の早期癌については議論が分かれている。教室の家接⁴⁰⁾、Horioら⁴²⁾、Mitsudomiら⁴³⁾はI期で

は有意差を認めないと報告しているのに対し、Quinlanら⁴⁴⁾、Isobeら⁴⁵⁾、Harpoleら⁴⁶⁾は予後不良因子であったと報告している。

本研究ではp53蛋白陽性は予後不良な傾向が認められたが、有意差は得られなかった。組織型別にみると、腺癌において陰性例は有意に予後不良であったが、扁平上皮癌では相関を認めなかった。Rb蛋白発現、p53蛋白発現、T因子および脈管侵襲との多変量解析により腺癌においてはp53蛋白陽性は独立した予後不良因子であることが判明した。

Rb、p53の蛋白発現を個別に検討した報告では、予後因子であるとするもの、そうではないとするものがあり、統一した見解は得られていない。Rb蛋白、p53蛋白双方の異常例は、異常増殖能を有し、アポトーシスを回避し遺伝子異常が蓄積し、より悪性度が高くなることが予想される²⁶⁾。Dosaka-Akitaら³³⁾はIからIII A期の非小細胞肺癌についてRb蛋白、p53蛋白およびras p21蛋白の発現と予後の検討で、個々では有意差を認めなかったが、Rb蛋白とras p21蛋白、またはRb蛋白とp53蛋白を組み合わせることで生存率に有意差を認めたと報告し、予後因子としての可能性を示した。またXuら^{26,32)}も同様に、Rb蛋白陰性かつp53蛋白陽性群は予後不良因子であったと報告している。

本研究でRb蛋白発現、p53蛋白発現の両者を組み合わせて予後の検討を行ったところ、Rb蛋白陰性かつp53蛋白陽性群が他の3群より有意に予後不良であった。組織型別に検討すると、扁平上皮癌では有意差はみられなかったが、腺癌ではRb蛋白陰性かつp53蛋白陽性群が有意に予後不良であった。腺癌をさらにT1に絞るとこの差は顕著であった。これらの結果から、原発性非小細胞肺癌I期において、Rb蛋白、p53蛋白発現はこれらを組み合わせることで予後不良群の抽出の可能性が示唆された。また腺癌では、この傾向はさらに明確となり、臨床的に有用であると思われる。Xuら²⁶⁾は扁平上皮癌でもRb蛋白、p53蛋白発現の組み合わせは予後因子であったと報告しているが、本研究では扁平上皮癌においてはその様な傾向は確認することができなかった。今回の検討においては扁平上皮癌はRb蛋白、p53蛋白発現のいずれも予後規定因子とはならなかった。教室の大竹⁴¹⁾は、扁平上皮癌においてBcl-2蛋白が予後因子である可能性を示唆しており、今後の検討時には非小細胞肺癌を一括せず、組織型により分類して検討すべきであるとも思われた。

以上の結果より、I期原発性非小細胞肺癌、特に腺癌において、Rb蛋白、p53蛋白は早期の癌化の段階から関与し、また癌の悪性度の増強にも関連している可能性が示唆された。多変量解析により各々は独立した予後規定因子となりうることも示唆された。さらに両者を組み合わせ検討することで、I期症例の中から予後不良群の推定ができる可能性が示唆された。

結 論

原発性非小細胞肺癌I期153例を対象に免疫組織染色法にてRb蛋白およびp53蛋白発現を検出し、臨床病理学的因子および予後との関連を検討し、以下の結論を得た。

1. I期症例全体におけるRb蛋白発現率は62.7% (96/153例)であった。
2. 症例全体ではRb蛋白陰性例は予後不良な傾向を認め(p=0.05)、組織型別では腺癌のRb蛋白陰性例は予後不良であつ

た ($p < 0.005$). T 因子別では T 1 の Rb 蛋白陰性例が有意に予後不良であった ($p < 0.01$). 組織型別に T 因子を再分類すると, 腺癌 T 1 において Rb 蛋白陰性例は有意に予後不良であった ($p < 0.005$).

3. 1 期症例全体における p53 蛋白発現率は 54.9% (84/153 例) であった.

4. 症例全体では p53 蛋白陽性例は予後不良な傾向を認め ($p = 0.08$), 組織型別では腺癌の p53 蛋白陽性例は予後不良であった ($p < 0.005$). T 因子別では T 1 の p53 蛋白陽性が予後不良な傾向であった ($p = 0.07$). 組織型別に T 因子を再分類すると, 腺癌 T 1 および T 2 における p53 蛋白陽性例は有意に予後不良であった ($p < 0.05$).

5. Rb 蛋白発現と p53 蛋白発現との間の相関はみられなかった.

6. Rb 蛋白発現および p53 蛋白発現の組み合わせによる予後の検討では, 1 期症例全体では Rb 蛋白陰性かつ p53 蛋白陽性群は他の 3 群より予後不良であった ($p < 0.01$). 腺癌および細分類による腺癌 T 1 でも同様に予後不良であった (各々 $p < 0.005$, $p < 0.001$).

7. 多変量解析の結果, 症例全体では Rb 蛋白陰性および T 2 が独立した予後不良因子であった. 腺癌では Rb 蛋白陰性, p53 蛋白陽性および T 2 が独立した予後不良因子であった. しかし扁平上皮癌ではリンパ管侵襲陽性のみが独立した予後不良因子であった.

以上, 原発性非小細胞肺癌 I 期, 特に腺癌において, Rb 蛋白および p53 蛋白発現は予後規定因子としての可能性が示唆された. また, 両者を組み合わせて検討することで予後不良群の推定が可能と思われた.

謝 辞

稿を終えるに臨み, 終始, 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表します. また CAS200 の使用に際し, 御指導いただきました医学部附属病院病理部野々村昭孝助教授に心から感謝いたします. さらに本研究の遂行に際し, 御指導, 御協力を頂きました金沢大学医学部外科学第一講座の小田 誠講師をはじめとする皆様, 標本作製・免疫組織染色等に御指導いただきました田中洋子氏に心から感謝いたします.

文 献

- 1) 財団法人厚生統計協会編. 国民衛生の動向. 厚生指針臨時増刊号 46: 46-58, 1999
- 2) Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes CH, Piantadosi S, Cordon-Cardo C, Slamon DJ and the Lung Cancer Study Group. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 8: 1913-1919, 1993
- 3) Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 103: 449S-456S, 1993
- 4) Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 2: 985-991, 1996

- 5) 日本肺癌学会編. 臨床・病理, 肺癌取扱規約, 改訂第 4 版, 24-121 頁, 金原出版, 東京, 1995
- 6) Knudson AG Jr. Mutation and cancer. *Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823, 1971
- 7) Friend SH, Bernards R, Rogell S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastomas and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-646, 1986
- 8) Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258: 424-429, 1992
- 9) Bagchi S, Weinmann R, Raychaudhuri P. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65: 1063-1072, 1991
- 10) Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65: 1053-1061, 1991
- 11) Borg A, Zhang QX, Alm P, Olsson H, Sellberg G. The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of gene protein expression. *Cancer Res* 52: 2991-2994, 1992
- 12) Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84: 1251-1256, 1992
- 13) Venter DJ, Bevan KL, Ludwig RL, Riley TE, Jat PS, Thomas DG, Noble MD. Retinoblastoma gene deletions in human glioblastomas. *Oncogene* 6: 445-448, 1991
- 14) Tang JL, Yeh SH, Chen PJ, Lin MT, Tien HF, Chen YC. Inactivation of the retinoblastoma gene in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 82: 502-507, 1992
- 15) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
- 16) Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1: 3-11, 1997
- 17) Canman CE, Kastan MB. Role of p53 in apoptosis. *Adv Pharmacol* 41: 429-460, 1997
- 18) Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992
- 19) Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992
- 20) Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95: 5-8, 1998
- 21) Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420: 25-27, 1997
- 22) 中尾光喜, 長田陽一, 本田慶臣, 阿南 正. p53 の蛋白質量はどのように制御されているか: その分解・安定化機構に迫る. 細胞工学別冊 p53 癌抑制の分子メカニズムと臨床応用 (佐谷秀行監修), 第 1 版, 59-72 頁, 秀潤社, 東京, 1998
- 23) Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997
- 24) Sidransky D, Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 47: 285-301, 1996

- 25) Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Takahashi R. Role of the retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest* 85: 988-993, 1990
- 26) Xu HJ, Cagle PT, Hu SX, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res* 2: 1169-1176, 1996
- 27) 海老名雅仁, Ilona LR, 貫和敏博. 肺癌組織における癌抑制遺伝子p53のClonality: In situ PCRを用いたMapping. 癌と化学療法. 24: 406-411, 1997
- 28) Hansen MF. Molecular genetic considerations in osteosarcoma. *Clin Orthop* 270: 237-246, 1991
- 29) Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T. Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 51: 5520-5525, 1991
- 30) 河野隆志, 横田 淳. ヒトがんにおけるがん抑制遺伝子の異常. 癌と化学療法 20: 1265-1273, 1993
- 31) Nishio M, Koshikawa T, Yatabe Y, Kuroishi T, Suyama M, Nagatake M, Sugiura T, Ariyoshi Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Prognostic significance of cyclin D1 and retinoblastoma expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 3: 1051-1058, 1997
- 32) Xu HJ, Qianlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86: 695-699, 1994
- 33) Dosaka-Akita H, Hu SX, Fujino M, Harada M, Kinoshita I, Xu HJ, Kuzumaki N, Kawakami Y, Benedict WF. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 79: 1329-1337, 1997
- 34) 高嶋一郎. 原発性非小細胞肺癌における所属リンパ節, 原発巣の臨床病理学的研究. 十全医会誌 105: 406-519, 1996
- 35) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50: 859-862, 1992
- 36) Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, Tamaki K, Tamakuma S, Fukutomi T, Mukai K, Hirohashi S. Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 82: 835-840, 1991
- 37) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990
- 38) Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, Wistuba II, La Rosa FG, Kennedy T, Ritchey DM, Miller YE. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *J Clin Invest* 100: 2133-2137, 1997
- 39) Nishio M, Koshikawa T, Kuroishi T, Suyama M, Uchida K, Takagi Y, Washimi O, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R, Takahashi T. Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 14:497-502, 1996
- 40) 家接健一. 原発性非小細胞肺癌におけるp53蛋白発現および腫瘍増殖能に関する研究. 十全医会誌 102: 492-505, 1993
- 41) 大竹由美子. 原発性非小細胞肺癌におけるBcl-2蛋白およびp53蛋白発現の予後因子としての意義について. 十全医会誌 106: 96-104, 1997
- 42) Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, Shimokata K, Yamakawa K, Nakamura Y, Ueda R et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 53: 1-4, 1993
- 43) Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T, Osaki T, Nakanishi R, Shirakusa T. Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 2018-2023, 1993
- 44) Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM: Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 52: 4828-4831, 1992
- 45) Isobe T, Hiyama K, Yoshida Y, Fujiwara Y, Yamakido M. Prognostic significance of p53 and ras gene abnormalities in lung adenocarcinoma patients with stage I disease after curative resection. *Jpn J Cancer Res* 85: 1240-1246, 1994
- 46) Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 55: 51-56, 1995

Rb and p53 Protein Expression in Non-small Cell Lung Cancers: Correlation with Survival Time Koichi Yokoyama, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920-8640 — J. Jusen Med Soc., 108, 568 — 579 (1998)

Key words non-small cell lung cancer, Rb protein, p53 protein, prognostic factor

Abstract

The present study investigated whether Rb and/or p53 protein expression are important factors influencing the survival of lung cancer patients. One-hundred fifty three curatively resected stage I non-small cell lung cancer specimens were analyzed by immunohistochemical staining. Staining were quantified with a CAS 200 image analyzer. Rb protein expression was noted in 96 (62.7%) of 153 patients. There was a higher incidence of Rb protein-positive cases in the epidermoid carcinoma group (44 of 52 cases, 83.0%) than in the adenocarcinoma group (44 of 89 cases, 49.4%) ($p < 0.0001$). p53 protein expression was noted in 84 (54.9%) of 153 patients. There were more p53 protein-positive cases in the epidermoid carcinoma group (67.3%) than in the adenocarcinoma group (47.2%) ($p < 0.05$). No relationship was observed between Rb protein expression and p53 protein expression. There was a tendency that the 5-year survival of the Rb protein-negative group was shorter than that of the Rb protein-positive group among patients overall ($p = 0.05$), although a significant difference was observed only in adenocarcinoma patients ($p < 0.005$). In T1 cases, the 5-year survival of the Rb protein-negative group was significantly shorter than that of the Rb protein-positive group ($p < 0.01$). There was a tendency that the 5-year survival of the p53 protein-positive group was shorter than that of the p53 protein-negative group among patients overall ($p = 0.08$), although a significant difference was again observed only in adenocarcinoma patients ($p < 0.005$). The patient cohort was subdivided according to Rb and p53 expressions into four groups. The 5-year survival for the Rb protein-negative and p53 protein-positive group was significantly shorter than those of the other 3 groups ($p < 0.01$) in all patients. Among adenocarcinoma patients, the 5-year survival for the Rb protein-negative and p53 protein-positive group was significantly shorter than those of the other 3 groups ($p < 0.005$). But no tendency was observed in epidermoid carcinoma patients. By multivariate analysis in all patients, it was revealed that Rb protein-negative and T2 were independent indicators of poor prognosis. Among adenocarcinoma patients, it was indicated that Rb protein-negative, p53 protein-positive and T2 were independent indicators of poor prognosis. In epidermoid carcinoma patients, neither Rb nor p53 status was a significant prognostic factor in this cohort. These results suggest that Rb protein-negative and p53 protein-positive might be independent indicators of an unfavorable prognosis in stage I non-small cell lung cancer, particularly in adenocarcinomas. These combined immunohistochemical analyses may also be useful for stratifying non-small cell lung cancer patients into good / poor prognosis subgroups.