

口腔扁平上皮癌の浸潤先進部におけるp53及びその  
関連蛋白の発現に関する免疫組織化学的研究 特にp  
53陽性細胞率検索の意義について

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4502">http://hdl.handle.net/2297/4502</a>

## 口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における p53およびその関連蛋白の発現に関する免疫組織化学的研究 —特にp53陽性細胞率検索の意義について—

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学  
(旧講座名：歯科口腔外科学)  
(主任：山本悦秀教授)

加 藤 広 祿

細胞周期調節遺伝子の変異は腫瘍の悪性転化ならびに増殖に重要である。これらの遺伝子の中でも、腫瘍抑制遺伝子である p53 遺伝子は最も注目されており、その変異が癌の進展や予後の指標となっている。この研究では、口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における p53 蛋白、細胞増殖核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、p21 蛋白の発現と臨床所見ならびに病理組織学的所見との関係を検索した。加えて、これらの蛋白質発現の相関関係についても分析を行った。さらに、p53 蛋白の発現と所属リンパ節転移ならびに累積生存率との関係も検討した。口腔扁平上皮癌の治療前生検標本 66 例を用いて免疫組織化学染色を行った。p53 蛋白陽性細胞率 (labeling index, LI)、PCNA-LI、p21-LI は腫瘍の浸潤先進部において検討された。その結果、p53-LI、PCNA-LI、p21-LI と原発部位、T 分類、N 分類、Stage 分類との間に有意差は認められなかった。p53-LI と PCNA-LI は浸潤様式が高度になるにつれ増加していたが、p21-LI は減少していた。浸潤様式 4D 型の p53-LI は各浸潤様式の p53-LI との間に有意差が認められた (1 型:  $p < 0.01$ , 2 型, 3 型, 4C 型:  $p < 0.05$ )。PCNA-LI において 1 型と 4D 型との間のみ有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。しかし、浸潤様式と p21-LI との間において有意差は認められなかった。各蛋白の相関関係においては、p53-LI が高値の症例では PCNA-LI も高値を示し、統計的に相関が認められた ( $p < 0.01$ )。また、p53-LI が高値の症例では p21-LI は低値を示し、逆相関が認められた ( $p < 0.05$ )。しかし、PCNA-LI が高値の症例では p21-LI は低値を示していたものの、明らかな相関は認められなかった。所属リンパ節転移との関係において、転移を認めた症例は p53-LI が有意に高値を示していた ( $p < 0.05$ )。p53-LI が 25% 以下の症例の 5 年生存率は、p53-LI が 25% 以上の症例の 5 年生存率と比べ有意に高かった ( $p < 0.01$ )。このことより、p53 は口腔扁平上皮癌の増殖と浸潤に重要な役割を果たしていることが示唆された。

**Key words** Oral squamous cell carcinoma, Mode of cancer invasion, p53 protein, Proliferating cell nuclear antigen, p21 protein

癌細胞は継続的無秩序な増殖を特徴としており、この急激な細胞増殖とそれに引き続く転移形成が臨床での治療を困難にしている。したがって、癌の増殖と関連する遺伝子の異常を研究することは、癌の本態解明と治療法の開発にとって重要なことと考えられる。現在、細胞周期を司る遺伝子の中でも癌抑制遺伝子である p53 遺伝子は最も注目される遺伝子であり、その変異の存在を検索することが腫瘍の進展や予後を推定する指標の一つとされている<sup>1)~4)</sup>。これまでに大腸癌<sup>5)</sup>、肺癌<sup>6)</sup>、乳癌<sup>7)</sup>など、さまざまな臓器のヒト癌においてその遺伝子変異が報告されており、腫瘍の診断および治療の標的として臨床応用されてきている<sup>8)~9)</sup>。また、近年行われている遺伝子治療のターゲット遺伝子の多くは p53 遺伝子であり<sup>10)</sup>、頭頸部癌においても遺伝子治療の臨床試験が行われることが予想され、そのターゲット遺伝子である p53 遺伝子およびその関連遺伝子についても詳細な検討が必要である。

ところで、この p53 とその関連遺伝子 p21 および増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) との関連については以下のように考えられている。すなわち p53 遺伝子は、分裂能をもつ細胞に損傷が生じると DNA 損傷のシグナルを受けて細胞内で活性化され、p53 蛋白を発現する。次に、p53 関連遺伝子の一つである p21 遺伝子<sup>11)12)</sup>に働きかけ、p53 蛋白は p21 蛋白の発現を活性化し、サイクリンキナーゼの活性を抑えることにより細胞の増殖を G1 期にて停止させる<sup>13)</sup>。さらに、p21 蛋白は PCNA と結合し、DNA の複製をブロックすることにより、細胞の増殖を抑制していると報告されている<sup>14)</sup>。

一方、口腔扁平上皮癌の深部組織への浸潤像は癌の悪性度と密接な関係があるとする報告が多くみられ、中でも癌浸潤様式分類<sup>15)</sup>は口腔扁平上皮癌の転移や予後と関連する因子の一つとして注目され、多くの施設で治療法を決定する因子の一つとして臨床応用されている。また近年、Bryne<sup>16)</sup>は口腔扁平上皮癌

平成 15 年 11 月 4 日受付、平成 15 年 12 月 8 日受理

Abbreviations: LI, labeling index; PCNA, proliferating cell nuclear antigen

の浸潤先進部における細胞の形態学的特徴が、予後を推定する最も重要な因子であると報告している。

そこで、本研究では口腔扁平上皮癌の浸潤先進部に着目し、同部におけるp53蛋白、PCNA、p21蛋白の発現を免疫組織化学的に検索した。またこれらの出現頻度と臨床的所見、病理組織学的所見との関係ならびにそれぞれの蛋白の相関関係について分析を行った。さらに、p53蛋白の発現と所属リンパ節転移の有無ならびに累積生存率との関係についても検討を加えたので報告する。

## 材料および方法

### I. 対象症例

1989年1月から2001年12月の間に金沢大学医学部附属病院歯科口腔外科で治療された口腔扁平上皮癌一次症例の治療前生検組織66症例を対象とした。生検組織は腫瘍の一部を腫瘍周囲の正常組織を含めて腫瘍表層から深部にかけて切除し、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。症例の内訳は男性34例、女性32例で、年齢は37歳から92歳、平均68歳であった。治療法に関しては66症例中47症例(71.2%)が化学療法と手術の併用療法を施行しており、この併用療法が治療の基本となっていた。また66症例中2例は当科での治療を拒否し、その症例を除いた症例の平均経過観察期間は65か月であった。2002年UICC分類<sup>17)</sup>に基づいて、原発部位、原発腫瘍の大きさ(T分類)、頸部リンパ節転移の有無(N分類)、腫瘍の進展度(Stage分類)について分類した。また、病理組織学的には分化度および癌浸潤様式について分類した。

### II. 免疫組織化学染色法

パラフィン包埋された生検組織を4 $\mu$ mの厚さに薄切し、シランコーティングを施したスライドガラスに貼付させ、100%キシレン(和光純薬、大阪)にて5分間、3回の脱パラフィンを行った。100%エタノール(和光純薬、大阪)にて5分間、3回の脱キシレンを行った後、90%、80%、70%、50%エタノールにそれぞれ5分間、1回ずつ浸し親水化を行った後、蒸留水に浸した。p53蛋白、p21蛋白の免疫組織化学染色の場合、0.01Mクエン酸ナトリウム溶液(pH6.0)に浸した状態で121 $^{\circ}$ C、15分間オートクレーブ処理を行い、抗原性の賦活化を行った。室温まで放置し、新しいPBS(日水製薬、東京)に浸した後、0.3%過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(和光純薬、大阪)加PBSにて20分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを破壊し、正常ヤギ血清(ダコ・ジャパン、東京)にて15分間反応させ、非特異的反応を抑制した。一次抗体としてそれぞれ、マウス抗ヒトp53モノクローナル抗体(NCL-p53-DO7, Novocastra, UK)ならびにマウス抗ヒトPCNAモノクローナル抗体(PC-10, ダコ・ジャパン, 東京)をPBSにて200倍希釈したもの、マウス抗ヒトp21<sup>WAF1/CIP1</sup>モノクローナル抗体(Anti-Human p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, ダコ・ジャパン, 東京)をPBSにて50倍に希釈したものを使用し、4 $^{\circ}$ Cにて24時間反応させた。24時間後、PBSにて5分間、4回洗浄した後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体および抗ウサギイムノグロブリン抗体(ダコ・ジャパン, 東京)を室温で1時間反応させた。PBSにて5分間、4回洗浄した後、ラベルドストレプトアビジン・ビオチンペルオキシダーゼ複合体(ダコ・ジャパン, 東京)にて30分間反応させた。その後PBSにて10分間、3回洗浄した後、発色は0.02%ジアミノベンチジンテ

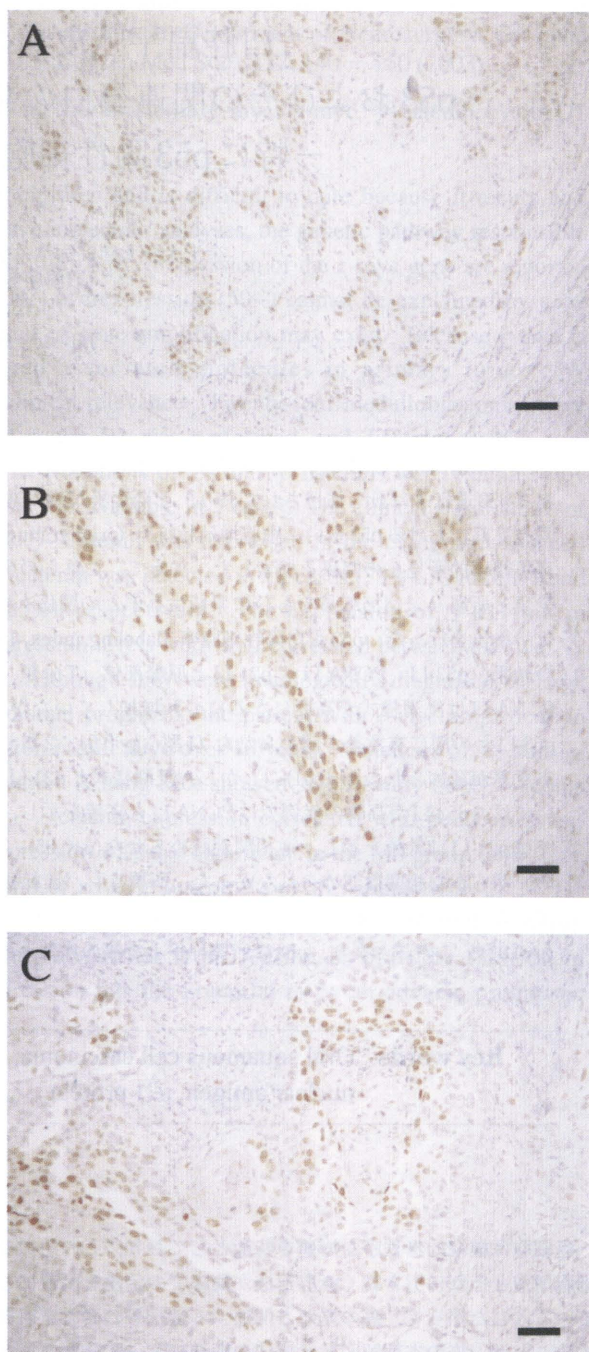


Fig. 1. Immunolocalization of p53 protein, PCNA, p21 protein in oral squamous cell carcinomas. (A) Immunohistochemical staining of p53 protein. The expression of p53 protein was frequently at the invasive front of tumors. (B) Immunohistochemical staining of PCNA. PCNA was expressed at the invasive front of tumor cells. (C) Immunohistochemical staining of p21 protein. p21 protein was expressed in cells inside the foci of tumors. Scale bars indicate 50  $\mu$ m.

テトラヒドロクロライド(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)(和光純薬、大阪)を用い、顕微鏡にて発色状態を確認しながら室温で約5分から10分間反応させた。蒸留水で10分間洗浄後、ヘマトキシリン(武藤化学、東京)にて対

Table 1. Rates of positive specimens of p53, PCNA, p21 proteins and distribution pattern of positive cells according to the mode of cancer invasion

	Rate of positive specimens(%)	Distribution Pattern of positive cells		
		Grades 1, 2	Grade 3	Grades 4C, 4D
p53	45/66(68.2)	Near the basement membrane	Margin of tumor nests	Invasive front
PCNA	66/66(100)	Near the basement membrane	Margin of tumor nests	Invasive front
p21	66/66(100)	Superficial area	Inside of tumor nests	Near the Invasive front

比染色を行った。全課程終了後、脱水、透徹、封入し、光顕的に観察した。

Ⅲ. 陽性細胞率の計測法

p53 蛋白, PCNA, p21 蛋白の免疫組織化学染色切片を用い、それぞれの陽性細胞率を計測した。すなわち、100倍の倍率に設定した光学顕微鏡下で、1切片あたり浸潤先進部を任意に3か所選択、その視野中のすべての癌細胞における陽性細胞の割合を平均したものを各症例のp53陽性細胞率 (labeling index, LI), PCNA-LI, p21-LIとした。そして各々のLIの値が5%以上のものを陽性症例、5%未満のものを陰性症例とした。

Ⅳ. 統計学的処理

p53 蛋白, PCNA, p21 蛋白の発現と臨床病理学的因子であるT分類, N分類, Stage分類, 分化度, 癌浸潤様式との有意差検定は一元配置分散分析法を用いて行った。また、それぞれの蛋白の相関関係の検討には単回帰分析を行い、所属リンパ節転移の有無との有意差検定はStudentのt検定を用いた。生存率の算出には当科での治療を拒否した2例を除いた64症例を対象としKaplan-Meier法を用いて行い、その有意差検定にはLogrank検定を用いた。いずれの検定においても危険率(p値)5%未満を有意差ありと判定した。

成 績

I. 対象症例の臨床的ならびに病理組織学的所見

66症例の原発部位は、舌25例、下顎歯肉17例、上顎歯肉10例、口底8例、頬粘膜4例、硬口蓋2例であった。臨床的因子であるT分類は、T1 11例、T2 35例、T3 9例、T4 11例であり、また、N分類においては、N0 43例、N1 16例、N2 7例であった。Stage分類においては、Stage I 11例、Stage II 24例、Stage III 14例、Stage IV 17例であった。病理組織学的因子である分化度においては高分化型47例、中等分化型16例、低分化型3例であり、癌浸潤様式においては1型7例、2型15例、3型25例、4C型14例、4D型5例であった。

Ⅱ. p53 蛋白, PCNA, p21 蛋白陽性症例数とその発現部位

免疫組織化学染色におけるp53蛋白陽性症例数は66症例中45症例(68.2%)であり、PCNA陽性症例数ならびにp21蛋白陽性症例数は66症例全症例(100%)であった。

p53 蛋白ならびにPCNAの発現部位は、腫瘍の浸潤先進部の腫瘍細胞の核に多く認められ、浸潤様式1型、2型では浸潤先進部の間質と接する腫瘍細胞に両蛋白の発現が多く認められ、浸潤様式3型では腫瘍胞巣中心部よりも辺縁部に多く発現して

おり、浸潤様式4C型、4D型では浸潤先進部の腫瘍胞巣全体に認められた。それに対し、p21蛋白の発現部位はp53蛋白やPCNAとは異なり、浸潤様式1型、2型では間質と接する腫瘍細胞の内側に発現が認められ、浸潤様式3型では腫瘍胞巣辺縁の一層内側の腫瘍細胞が、浸潤様式4C型、4D型では浸潤先進部の腫瘍細胞にはあまり発現しておらず、浸潤先進部よりやや浅いところの腫瘍細胞に発現が認められた(図1, 表1)。

Ⅲ. p53 蛋白陽性症例と臨床所見との関係(表2)

原発部位において舌25症例中16症例(64.0%)、下顎歯肉17症例中13症例(73.3%)、上顎歯肉10症例中6症例(60.0%)、口底8症例中7症例(87.5%)、頬粘膜4症例中2症例(50.0%)、硬口蓋2症例中1症例(50.0%)にp53の発現が認められた。また臨床的因子であるT分類については、T1 11症例中5症例(45.5%)、T2 35症例中28症例(80.0%)、T3 9症例中4症例(44.4%)、T4 11症例中8症例(72.7%)であり、N分類ではN0 43症例中30症例(69.8%)、N1 16症例中11症例(62.5%)、N2 7症例中4症例(57.1%)であった。Stage分類においては、Stage I 11例中5症例(45.5%)、Stage II 24例中20症例(83.3%)、Stage III 14例中8症例(57.1%)、Stage IV 17例中12症例(70.6%)であった。p53陽性症例数と原発部位、T分類、N分類、Stage分類との間に有意差は認められなかった。

Ⅳ. p53 蛋白陽性症例と病理組織学的所見との関係(表2)

分化度においては、高分化型47症例中30症例(63.8%)、中等分化型16症例中12症例(75.0%)、低分化型3症例中3症例(100%)であった。癌浸潤様式においては、1型7症例中5症例(71.4%)、2型15症例中10症例(66.7%)、3型25症例中16症例(64.0%)、4C型14症例中10症例(71.4%)、4D型5症例中4症例(80.0%)であった。p53陽性症例数と分化度、癌浸潤様式との間に有意差は認められなかった。

Ⅴ. 臨床所見とp53-LI, PCNA-LI, p21-LIとの関係(表3)

原発部位におけるp53-LIは舌24.28%、下顎歯肉22.06%、上顎歯肉19.00%、口底24.50%、頬粘膜18.40%、硬口蓋18.40%であった。T分類においてはT1 21.92%、T2 21.22%、T3 33.40%、T4 21.95%であり、N分類はN0 20.61%、N1 25.60%、N2 28.25%であった。Stage分類はStage I 21.92%、Stage II 20.47%、Stage III 25.69%、Stage IV 24.05%であった。p53-LIと原発部位、T分類、N分類、Stageとの間に有意な差は認められなかった。しかし、N分類において有意差は認められないものの、N0からN1、N2となるに従いp53-LIは高率になっており、また、Stage分類においてStage3、4症例ではStage1、2症例に比べp53-LIは高値を示していた。



Table 2. Clinicopathological findings in human oral squamous cell carcinoma

Clinicopathological findings	No. of cases	No. of positive specimens of p53 protein(%)
<b>Primary Sites</b>		
Tongue	25	16(64.0)
Lower gingiva	17	13(73.3)
Upper gingiva	10	6(60.0)
Floor of mouth	8	7(87.5)
Buccal mucosa	4	2(50.0)
Hard palate	2	1(50.0)
<b>T classification</b>		
T1	11	5(45.5)
T2	35	28(80.0)
T3	9	4(44.4)
T4	11	8(72.7)
<b>N classification</b>		
N0	43	30(69.8)
N1	16	11(62.5)
N2	7	4(57.1)
<b>Stage classification</b>		
I	11	5(45.5)
II	24	20(83.3)
III	14	8(57.1)
IV	17	12(70.6)
<b>Cell differentiation</b>		
Well	47	30(63.8)
Moderate	16	12(75.0)
Poor	3	3(100)
<b>Mode of invasion</b>		
1	7	5(71.4)
2	15	10(66.7)
3	25	16(64.0)
4C	14	10(71.4)
4D	5	4(80.0)

Table 3. Relationship between clinical parameters and p53-LI, PCNA-LI, p21-LI

Clinical parameter	Labeling index		
	p53-LI	PCNA-LI	p21-LI
<b>Primary Sites</b>			
Tongue	24.28	21.62	22.99
Lower gingiva	22.06	24.76	21.69
Upper gingiva	19.00	18.65	24.39
Floor of mouth	24.50	29.01	18.25
Buccal mucosa	18.40	26.48	23.00
Hard palate	18.40	16.45	27.65
<b>T classification</b>			
T1	21.92	22.32	22.05
T2	21.22	22.60	22.44
T3	33.40	21.46	21.83
T4	21.95	29.17	23.16
<b>N classification</b>			
N0	20.61	22.22	23.39
N1	25.60	25.62	19.64
N2	28.25	26.49	22.27
<b>Stage classification</b>			
I	21.92	22.72	22.05
II	20.47	21.21	23.45
III	25.69	22.42	19.55
IV	24.05	25.59	23.58

Table 4. Relationship between degrees of differentiation and p53-LI, PCNA-LI, p21-LI

	No. of cases	p53-LI	PCNA-LI	p21-LI
Well	47	20.88	24.13	21.54
Moderate	16	23.99	21.23	23.85
Poor	3	33.50	25.63	25.37

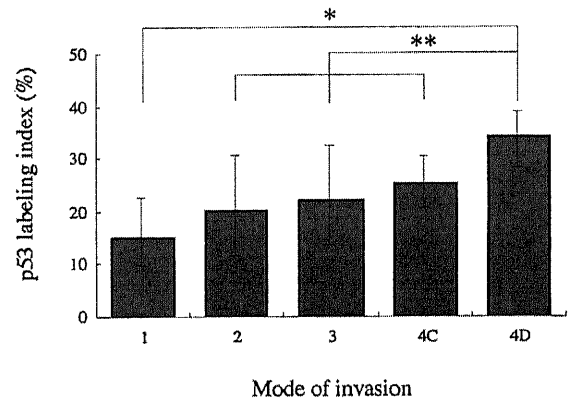


Fig. 2. Relationship between mode of cancer invasion and p53-LI. The higher degree of the mode of cancer invasion was associated with the higher p53-LI, and tumors with grade 4D differed significantly from those with other invasion grades. grade 1: \*p<0.01, grades 2, 3, 4C: \*\*p<0.05, by one-way ANOVA.

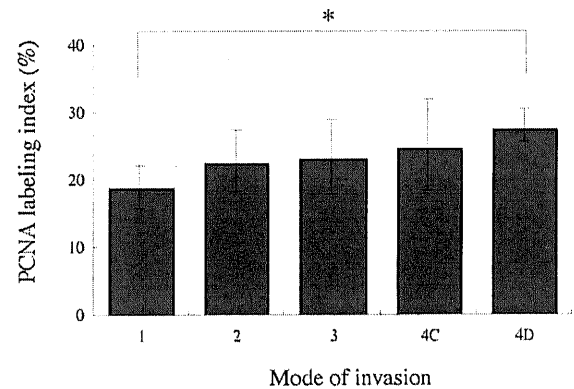


Fig. 3. Relationship between mode of cancer invasion and PCNA-LI. The higher-degree of invasion was associated with the higher PCNA-LI, and a significant difference was observed only between grades 1 and 4D. \*p<0.01, by one-way ANOVA.

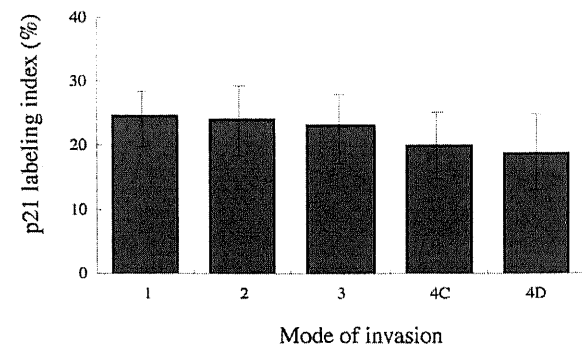


Fig. 4. Relationship between mode of cancer invasion and p21-LI. The higher degree of invasion was associated with the lower p21-LI, without significant difference.

原発部位におけるPCNA-LIは舌21.62%, 下顎歯肉24.76%, 上顎歯肉18.65%, 口底29.01%, 頬粘膜26.48%, 硬口蓋16.45%であった。T分類においてはT1 22.32%, T2 22.60%, T3 21.46%, T4 29.17%であり, N分類はN0 22.22%, N1 25.62%, N2 26.49%であった。Stage分類はStage I 22.72%, Stage II 21.21%, Stage III 22.42%, Stage IV 25.59%であった。PCNA-LIにおいて, T分類ではT4が29.17%と最も高率となっており, Stage分類ではStage IVが25.59%と最も高い陽性細胞率を示した。N分類ではN0からN1, N2となるに従い高率になっていた。しかし, PCNA-LIと原発部位, T分類, N分類, Stageとの間に有意な差は認められなかった。

原発部位におけるp21-LIは舌22.99%, 下顎歯肉21.69%, 上顎歯肉24.39%, 口底18.25%, 頬粘膜23.00%, 硬口蓋27.65%であった。T分類においてはT1 22.05%, T2 22.44%, T3 21.83%, T4 23.16%であり, N分類はN0 23.39%, N1 19.64%, N2 22.27%であった。Stage分類はStage I 22.05%, Stage II 23.45%, Stage III 19.55%, Stage IV 23.58%であった。p21-LIにおいても臨床所見との間に有意な差は認められなかった。

Ⅶ. 分化度とp53-LI, PCNA-LI, p21-LIとの関係

分化度におけるp53-LIは高分化型20.88%, 中等度分化型23.99%, 低分化型33.50%であった。またPCNA-LIについては高分化型24.13%, 中等度分化型21.23%, 低分化型25.63%であり, p21-LIは, 高分化型21.54%, 中等度分化型23.85%, 低分化型25.37%であった。病理組織学的因子の一つである分化度とp53-LI, PCNA-LI, p21-LIとの関係を検討したところ, それぞれの蛋白質の陽性細胞率との間に有意差は認められなかった。しかし, p53-LI, p21-LIにおいては分化度が下がるにつれ, 陽性細胞率は高値を示す傾向にあった(表4)。

Ⅶ. 浸潤様式とp53-LI, PCNA-LI, p21-LIとの関係

各浸潤様式におけるp53-LIは, 1型15.14%, 2型20.47%, 3型22.33%, 4C型24.75%, 4D型34.25%となり, 浸潤様式が高度になるにつれてLIも高値を示し, 浸潤様式4D型の症例は各浸潤様式との間に有意差が認められた(1型: \*p<0.01, 2型, 3型, 4C型: \*\*p<0.05)(図2)。

各浸潤様式におけるPCNA-LIは, 1型18.63%, 2型22.39%, 3型23.05%, 4C型24.66%, 4D型27.58%となり, 各浸潤様式におけるPCNA-LIにおいても, 浸潤が高度になる程, LIも高値を示し, 各浸潤様式の比較において, 1型と4D型の間にのみ有意差が認められた(p<0.01)(図3)。

各浸潤様式におけるp21-LIは, 1型24.68%, 2型24.07%, 3型22.98%, 4C型19.85%, 4D型18.78%となり, 浸潤様式が高度になるにつれ, LIが低値を示していたが, 各浸潤様式の間に有意差は認められなかった(図4)。

Ⅷ. 各蛋白質間の相関関係

1. p53-LIとPCNA-LIとの関係

それぞれの臨床組織において, p53-LIとPCNA-LIの関係を検討したところ, p53-LIが高値を示した症例ではPCNA-LIも高値を示し, 統計学的に検討した結果, p53-LIとPCNA-LIとの間に相関関係が認められた( $\gamma = 0.315, p < 0.01$ )(図5)。

2. p53-LIとp21-LIとの関係

p53-LIとp21-LIの関係を検討したところ, p53-LIが高値を示した症例ではp21-LIは低値を示し, 検討した結果, p53蛋白とp21蛋白との間に逆相関が認められた( $\gamma = -0.2048, p < 0.05$ )(図6)。

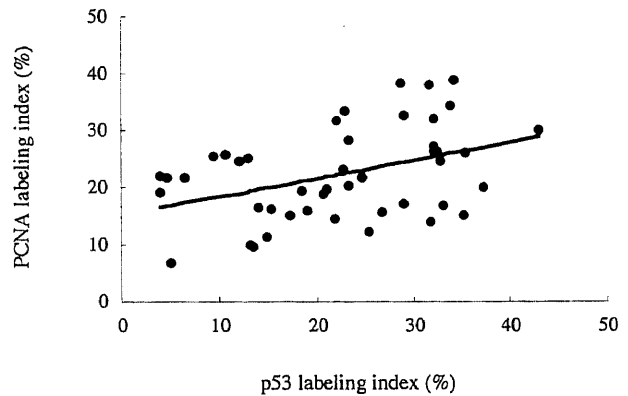


Fig. 5. Relationship between p53-LI and PCNA-LI. Tumors with a high p53-LI showed a high PCNA-LI ( $\gamma = 0.315, p < 0.01$  by simple regression analysis).

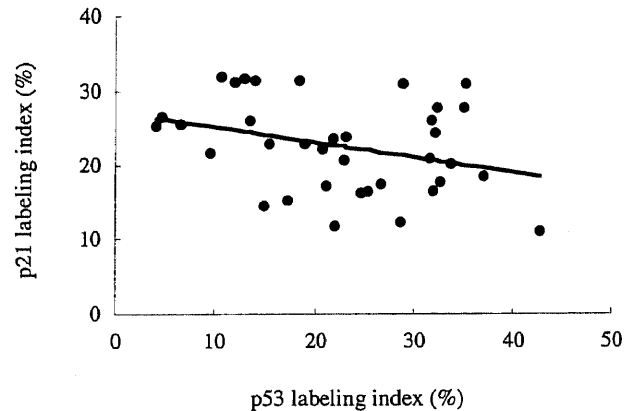


Fig. 6. Relationship between p53-LI and p21-LI. Tumors with a high p53-LI showed a low p21-LI ( $\gamma = -0.2048, p < 0.05$  by simple regression analysis).

3. PCNA-LIとp21-LIとの関係

PCNA-LIとp21-LIの関係を検討したところ, PCNA-LIが高値を示した症例ではp21-LIは低値を示す傾向があったものの, PCNA-LIとp21-LIの間に相関関係は認められなかった。

Ⅸ. p53-LIと所属リンパ節転移の有無および生存率との関係

所属リンパ節転移の有無とp53-LIとの関係を検索したところ, 転移を認めた症例では転移を認めなかった症例に比べp53-LIは高値を示していた(p<0.05)(図7)。またKaplan-Meier法による累積生存率の分析では, p53-LIに関してはp53-LIが25%以上と高い症例の5年生存率は42.1%であるのに対し, p53-LIが25%未満と低い症例においては73.3%であり, p53-LIが25%以上と高い症例ほど予後不良であった(p<0.01)(図8)。

考 察

発癌とは一般に, 細胞の複数の遺伝子の変化が多段階に生じることにより起こる現象である<sup>18)</sup>。すなわち, 腫瘍発生に関与する幹細胞の癌抑制遺伝子の不活性化と癌遺伝子の活性化が多

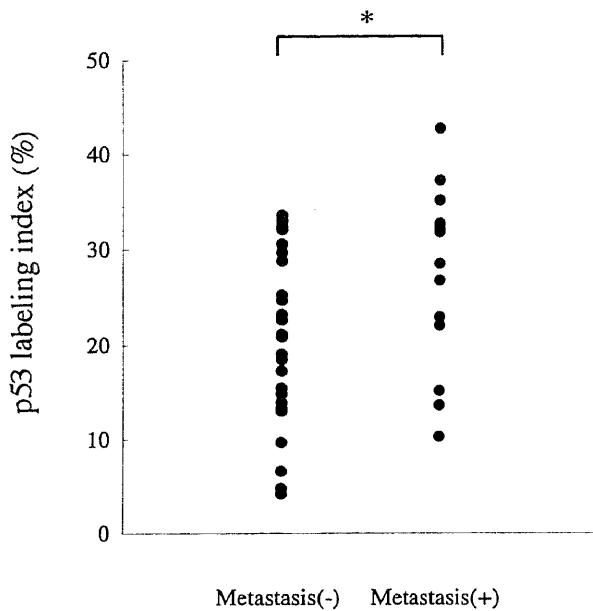


Fig. 7. Relationship between p53-LI and lymph node metastasis. The groups of carcinomas with lymph node metastasis showed significantly high p53-LI. (\*  $p < 0.05$  by Student *t*-test).

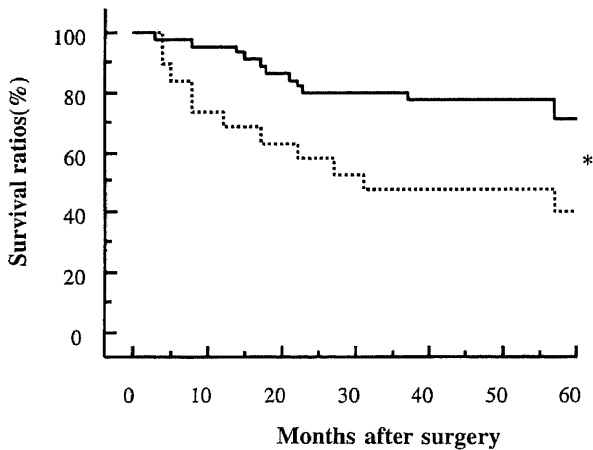


Fig. 8. Survival curves of low p53-LI cases (<25%) and high p53-LI cases ( $\geq 25\%$ ). Survival ratio of low p53-LI cases was 73.3% (—) and that of high p53-LI cases was 42.1% (.....). \*  $p < 0.01$ , by Logrank test.

段階で起こり、腫瘍細胞が出現する。そしてその癌抑制遺伝子の一つとしてp53遺伝子がある<sup>19)20)</sup>。

p53遺伝子の機能として、転写調節機能、他の細胞内蛋白質との相互作用によるシグナル伝達機能、DNA複製に関与する蛋白質複合体の構成要素、DNA結合能、エキソヌクレアーゼ活性<sup>21)</sup>があげられる。これらの機能が複合的に作用し、その結果、細胞周期停止、アポトーシス誘導、DNA修復、DNA複製調節、分化誘導といった細胞内のイベントが引き起こされる。

p53蛋白質はLaneら<sup>22)</sup>、Linzerら<sup>23)</sup>によって、1979年にSV40でトランスフォームした細胞において、Large T抗原と共沈し

てくる55kDの細胞由来の未知蛋白質として発見された。当初は、癌遺伝子の一つと考えられていたが、マウスの腫瘍細胞においてp53遺伝子の機能喪失型の変異が観察されることや、正常型p53遺伝子の過剰発現系において、p53蛋白質が細胞増殖抑制作用を示すことから、反対に細胞周期の負の制御因子としての働きが考えられるようになった。その後、変異型p53蛋白質の発現やp53遺伝子異常が多くの臓器の悪性腫瘍においてみられることが報告されるようになり、p53遺伝子が癌抑制遺伝子であることが確認され、この遺伝子の変異や欠失が細胞の癌化と深い関わりをもつと考えられるようになった<sup>24)~26)</sup>。ヒト癌のうちで最も高頻度に遺伝子異常が認められるのはp53であり、頭頸部癌を含めて全体の癌の約50%にp53遺伝子異常が見つかる。そして、癌細胞において高発現しているp53蛋白質は変異型p53蛋白質であることが明らかになった。

正常である野生型p53蛋白質の半減期が15分程度と比較的短時間であるのに対し、変異型p53蛋白質の半減期は4~20時間程度と延長する。このため、変異型p53蛋白質の蓄積をきたし、免疫組織化学的にp53遺伝子産物の検索が可能になることで、種々の臓器における癌とともに、口腔扁平上皮癌においてもその検索がなされるようになり、その遺伝子変異が高頻度に生じていることが明らかにされてきた<sup>27)</sup>。

また、p53遺伝子はそのアミノ酸配列の特徴から、他の遺伝子の発現を調節する転写因子としての役割を持つことが明らかになった。多数のp53関連遺伝子が存在しているが、その一つとしてp21遺伝子がある。p21遺伝子をコードする蛋白質は、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase) の阻害蛋白質であることが見出され<sup>11)</sup>、野生型p53蛋白質はこのp21遺伝子に作用し、p21蛋白質の発現を活性化することによりサイクリン依存性キナーゼの活性を抑え、細胞の増殖をG1期にて停止させるとともに損傷部の修復を行う。さらに、p21蛋白質はPCNAと結合し、DNAの複製をブロックすることにより細胞の増殖を抑制している。しかし、p53遺伝子に変異が生じるとp21遺伝子の活性が抑制され、PCNAによるDNAの複製をブロックすることができず、細胞は増殖していくこととなる。そのためp53蛋白質とp21蛋白質の発現に関しては種々の報告がなされており<sup>28)</sup>、胃癌においてはp53蛋白質とp21蛋白質の発現とその予後について報告している<sup>29)</sup>。

腫瘍の増殖活性を検索することは、間接的にその腫瘍の生物学的悪性度を知ることになり、治療法の選択や患者の予後の推定を行う上で重要な情報の一つとなっている。種々の腫瘍においてPCNAやKi-67などの免疫組織化学染色による腫瘍の増殖活性の検討が研究され報告されている。PCNAは増殖細胞関連抗原の一つで、抗体は全身性エリテマトーデスの患者血清中に存在し、増殖細胞の核抗原と特異的に反応する自己抗体としてMiyachiら<sup>30)</sup>により報告された。その後の研究により、PCNAはS期に急激に増加する分子量36kDの核蛋白質 (cyclin) と同一であり、さらにDNA合成に重要な役割を持つDNAポリメラーゼの補助蛋白質であることが明らかにされた<sup>31)~33)</sup>。そして、p53蛋白質と増殖能に関してPCNAやKi-67を用いて検討されており<sup>34)35)</sup>、p53蛋白質が過剰に発現している腫瘍にPCNAやKi-67が過剰に発現していることから、p53蛋白質が増殖に関わっていると示唆している。

さらに口腔扁平上皮癌の転移や予後の推定、治療法を決定する要因の一つとしてTNM分類とともに重要とされているもの

に、癌浸潤様式である山本-小浜分類がある。この浸潤様式の 4C 型、4D 型は高転移性の腫瘍であり、抗癌剤の効果も期待できず、予後も悪い結果となっている<sup>36)</sup>。また、Bryne<sup>16)</sup>は口腔扁平上皮癌の浸潤先進部を重要視しており、浸潤先進部の腫瘍細胞の形態学的特徴が予後を推定する最も重要な因子であると報告している。従って、口腔癌において増殖能を検討することとともに、腫瘍の浸潤能を検討することも重要となっている。

これまで p53 蛋白ならびに p21 蛋白と増殖能との関係を述べた報告はみられるものの、浸潤能との関係を検討した報告はない。そこで、本研究では p53 蛋白、p21 蛋白、PCNA の発現と、TNM 分類、分化度とともに癌浸潤様式である山本-小浜分類との関係を免疫組織化学的に検討した。

その結果、p53 蛋白の発現部位については、いずれの浸潤様式においても、腫瘍細胞の浸潤先進部に主に発現していた。また PCNA も同様に、浸潤先進部の腫瘍細胞に発現しており、これは浸潤先進部の腫瘍細胞が増殖能を有していると考えられた。しかし、p21 蛋白の発現は浸潤先進部というよりは浸潤先進部のやや浅いところの細胞に発現が認められた。この浸潤先進部の p53 蛋白、p21 蛋白、PCNA の発現部位から浸潤先進部の腫瘍細胞の p53 遺伝子に変異が生じ、変異した p53 蛋白が p21 蛋白の発現を抑制することにより cell cycle が G1 期にて停止することなく促進するとともに、PCNA と p21 蛋白の結合を抑制することにより、増殖能が上昇していると考えられた。

各臓器における p53 蛋白の免疫組織化学的検討を行った報告によると大腸癌 46.5%<sup>24)</sup>、肺癌 82%<sup>5)</sup>、乳癌 15.5%<sup>25)</sup>、子宮頸癌 62%<sup>26)</sup>に p53 蛋白の発現を認めており、臓器により差がみられる。口腔扁平上皮癌に関しては Girod<sup>35)</sup>は、54% とほとんどが約半数に発現が認められたと報告している。今回のわれわれの検索結果では 68.5% に p53 蛋白の発現を認め、これまでの報告と比べ高率となった。

臨床所見との検討においては、原発部位、T 分類、N 分類、Stage 分類それぞれの因子と p53-LI、p21-LI、PCNA-LI との間に有意差は認められなかった。病理組織学的においても分化度との間に有意差は認められなかった。しかし、口腔癌の浸潤様式との検討においては、p53-LI は癌浸潤が高度になるにつれ高値を示し、浸潤様式 4D 型の症例は各浸潤様式との間に有意差が認められた。PCNA-LI においては癌浸潤が高度になるにつれ高値を示す傾向にあり、1 型と 4D 型の間のみ有意差が認められた。しかし、p21 蛋白の場合は逆に、浸潤様式が高度になるに従い陽性細胞率が低値を示した。つまり、高浸潤性の腫瘍細胞は p53 蛋白を過剰に発現し、その関連遺伝子である p21 遺伝子の活性化を抑制することにより p21 蛋白の発現が抑えられる。そして PCNA の発現が促進されることにより腫瘍細胞は増殖し、浸潤していくことが示唆された。

また、p53-LI、p21-LI、PCNA-LI の相関関係を検討した結果において、p53 蛋白と PCNA との間に相関関係があり、また p53 蛋白と p21 蛋白との間、p21 蛋白と PCNA との間に逆相関関係がみられた。このことは前述した p53 蛋白、PCNA、p21 蛋白の作用機序における相互関係に基づいた結果となった。

さらに、転移の有無と p53-LI との関係において、転移を認めた症例の p53-LI は転移を認めなかった症例に比べ高値を示していた。また Kaplan-Meier 法による累積生存率の分析では、p53-LI が 25% 未満の症例の 5 年生存率は 73.3% であるのに対し、p53-LI が 25% 以上の症例においては 42.1% となり、治療法に大きな

差異がないにもかかわらず、p53-LI が 25% 以上の症例ほど予後不良という結果であった。この理由として、高浸潤癌は一般的に高転移性で予後不良といわれており、その高浸潤癌の症例ほど p53-LI が高値を示していたためと考えられ、治療前生検組織における p53 の発現およびその LI を検索することは、口腔扁平上皮癌の予後や転移の予測因子の一つとして有用であることが示唆された。

以上の結果から、p53 蛋白が口腔扁平上皮癌の増殖や浸潤に対し重要な役割を果たしていると考えられ、今後さらに p53 遺伝子やその他の遺伝子異常について詳細な検討が必要と思われる。

## 結 論

口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における p53 蛋白、PCNA、p21 蛋白の発現を検討する目的で、治療前生検組織 66 症例を用いて免疫組織化学的検討を行ったところ、以下の結果を得た。

1. 免疫組織化学染色における p53 蛋白陽性症例数は 66 症例中 45 症例 (68.2%) であり、PCNA 陽性症例数ならびに p21 蛋白陽性症例数は 66 症例全症例 (100%) であった。
2. p53-LI、PCNA-LI、p21-LI と臨床所見との間に有意な差は認められなかった。しかし、N 分類において有意差は認めないものの、N0 から N1、N2 となるに従い p53-LI は高値を示し、また Stage 分類において Stage 3、4 症例では Stage 1、2 症例に比べ p53-LI は高値を示した。PCNA-LI、p21-LI と原発部位、T 分類、N 分類、Stage との間に有意差は認められなかった。
3. 分化度と p53-LI、PCNA-LI、p21-LI との関係を検討したところ、それぞれの蛋白質の陽性細胞率との間に有意差は認めなかった。しかし、p53-LI、p21-LI においては分化度が下がるにつれ、LI は高値を示す傾向にあった。
4. 各浸潤様式における p53-LI は、浸潤様式が高度になるにつれて高値を示し、浸潤様式 4D 型の症例は各浸潤様式との間に有意差が認められた (1 型:  $p < 0.01$ , 2 型, 3 型, 4C 型:  $p < 0.05$ )。
5. 各浸潤様式における PCNA-LI においても、浸潤が高度になる程高値を示し、各浸潤様式の比較において、1 型と 4D 型の間のみ有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。
6. p21-LI と浸潤様式においては、浸潤様式が高度になるにつれ低値を示していたが、各浸潤様式の間には有意差は認められなかった。
7. それぞれの臨床組織において、p53-LI と PCNA-LI の関係を検討したところ、p53-LI が高値を示した症例では PCNA-LI も高値を示し、相関関係が認められた ( $p < 0.01$ )。p53-LI と p21-LI の関係を検討したところ、p53-LI が高値を示した症例では p21-LI は低値を示し、逆相関が認められた ( $p < 0.05$ )。PCNA-LI と p21-LI の関係を検討したところ、PCNA-LI が高値を示した症例では p21-LI は低値を示す傾向があったものの、相関は認められなかった。
8. 所属リンパ節転移の有無と p53-LI との関係を検索したところ、転移を認められた症例では p53-LI は高値を示す結果となった ( $p < 0.05$ )。
9. Kaplan-Meier 法による累積生存率の分析では、p53-LI が 25% 以上と高い症例ほど予後不良であった ( $p < 0.01$ )。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌の増殖や浸潤において、これらの蛋白が非常に重要な役割を果たしていると考えられた。



## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導と御検閲を賜りました恩師金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野山本悦秀教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究を直接御指導、御助言頂きました同細胞浸潤学分野川尻秀一助手に心より謝意を表します。更に、本研究の遂行にあたり御支援、御協力頂いた同分野の田中彰博士、野口夏代博士、中谷弘光院生に深く感謝致します。最後に御協力頂きました同分野の大学院生、医局員の皆様に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨の一部は、第19回日本口腔腫瘍学会総会(2001年1月、栃木)、第25回日本頭頸部腫瘍学会(2001年6月、北海道)、第21回日本口腔腫瘍学会総会(2003年1月、沖縄)に於いて発表した。

## 文 献

- 1) Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Koivula T, Isola J. Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst* 84: 883-887, 1992
- 2) Lipponen PK. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 53: 265-270, 1993
- 3) Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH, Smith HS. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 84: 845-854, 1992
- 4) Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL. Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 66: 558-562, 1992
- 5) Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Ikeuchi T, Tonomura A, Nakamura Y, White R, Miki Y, Utsunomiya J, Koike M. Genetic change and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 50: 7166-7173, 1990
- 6) Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris A. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679, 1990
- 7) Osborne RJ, Merlo GR, Mitsudomi T, Venesio T, Liscia DS, Cappa PM, Chiba I, Takahashi T, Nau MM, Callahan R, Minna JD. Mutations in the p53 gene in primary human breast cancers. *Cancer Res* 51: 6194-6198, 1991
- 8) Isabel BC, Chris J, Meijer LM, Peter JF Snijders, Gordon BS, Jan MM Walboomers, Issac van der Waal. P53 immunoexpression in non-malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. *J Pathol* 191: 132-137, 2001
- 9) Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, Nakamura Y. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 345: 1257-1259, 1995
- 10) Fang B, Roth JA. Tumor-suppressing gene therapy. *Cancer Biol Ther* 2: 115-121, 2003
- 11) el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825, 1993
- 12) 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
- 13) Qin LF, Ng IO, Fan ST, NG M. p21/WAF1, p53 and PCNA expression and p53 mutation status in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 79: 424-428, 1998
- 14) Waga S, Honnon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369: 574-578, 1994
- 15) Yamamoto E, Kohama G, Sunagawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-2180, 1983
- 16) Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognosis. *Oral Dis* 4: 70-77, 1998
- 17) LH Sobin, Ch Witteking. International union against cancer. TNM classification of malignant tumors, 6<sup>th</sup> ed. 2002
- 18) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990
- 19) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science* 244: 217-221, 1989
- 20) Janice M. Nigro, Suzanne J. Baker, Antonette C. Preisinger, J. Milburn Jessup, Richard Hosteller, Karen Cleary, Sandra H. Signer, Nancy Davidson, Stephen Baylin, Peter Devilee, Thomas Glover, Francis S. Collins, Ainsley Weslon. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708, 1989
- 21) Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F. p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85: 1089-1099, 1996
- 22) Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278: 261-263, 1979
- 23) Linzer D.I, 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
- 24) Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138: 807-813, 1991
- 25) Cattaretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Della D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 41: 178-183, 1988
- 26) Holm R, Skomedal H, Helland Å, Kristensen G, Børresen A, Nesland JM. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant, and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 169: 21-26, 1993
- 27) Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Sugiura C, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K Totsuka Y, Fukuda H. Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39: 163-169, 2003
- 28) Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, Le QT, Silverman S, Fu KK. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 35:

333-342, 1999

29) Okumura T, Maehara Y, Kabashima A, Takahashi I, Kakeji Y, Sugimachi K. Combined Evaluation of expressions of p53 and p21 proteins as prognostic factors with gastric carcinoma. *Oncol* 63: 353-361, 2002

30) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978

31) Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell of HeLa cells. *J Cell Biol* 84: 795-802, 1980

32) Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 326: 515-517, 1987

33) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI.

Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374-376, 1984

34) Lan HA, Zain RB, Saitoh M, Muramatsu Y, Shrestha P, Mori M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of oral mucosa—a marker for poor tumor differentiation, increasing nuclear atypia and invasiveness? *Anticancer Res* 16: 3059-3605, 1996

35) Girod SC, Krueger G, Pape HD. p53 and Ki 67 expression in preneoplastic and neoplastic lesions of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 22: 285-288, 1993

36) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of oral cavity. *Head Neck* 6: 939-947, 1984

**Immunohistochemical study of p53 and cell cycle-related proteins at the invasive front of oral squamous cell carcinomas - significance of examination of p53 labeling index** Koroku Kato Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. J. J. Med Soc.*, 112, 151 — 159 (2003)

**Key words** Oral squamous cell carcinoma, Mode of cancer invasion, p53 protein, Proliferating cell nuclear antigen, p21 protein

#### Abstract

Abnormalities in cell cycle-controlling genes are thought to be important in the malignant transformation and proliferation of tumors. Among these genes, the tumor suppressor gene p53 is most notable, and its mutations provide an indicator of tumor progression and prognosis. This study examined the expression of p53 protein, PCNA, and p21 protein at the invasive front of oral squamous cell carcinomas by immunohistochemical staining, and investigated the relationship of these proteins to clinical and histopathological findings; in addition, this issue considered possible correlations among these proteins. Moreover, relationship between the expression of p53 protein and lymph node metastasis and survival rates were examined. Sixty-six biopsy specimens of oral squamous cell carcinoma were examined by immunohistochemical staining. The p53 labeling index (p53-LI), PCNA labeling index (PCNA-LI), and p21 labeling index (p21-LI) were examined at the invasive front. The p53-LI, PCNA-LI, and p21-LI did not significantly correlate with the primary site, T classification, N classification, or Stage classification. Both p53-LI and PCNA-LI increased, but p21-LI decreased as the mode of cancer invasion accelerated. p53-LI of tumors with grade 4D was significantly higher than that of other invasion grades (grade 1;  $p < 0.01$ , grade 2, 3, 4C;  $p < 0.05$ ). There was a significant difference in PCNA-LI only between grades 1 and 4D ( $p < 0.01$ ). However, there were no significant differences between mode of invasion and p21-LI. Tumors with a high p53-LI showed a high PCNA-LI. The statistical analysis showed a correlation between p53-LI and PCNA-LI ( $p < 0.01$ ). Tumors with a high p53-LI showed a low p21-LI, and the statistical analysis revealed a negative correlation between p53-LI and p21-LI ( $p < 0.05$ ). The groups of carcinomas with lymph node metastasis showed a high p53-LI ( $p < 0.05$ ). Survival ratio of low p53-LI cases was 73.3% and high p53-LI cases was 42.1%. Significant difference was recognized among them by the Kaplan-Meier method ( $p = 0.01$ ). Consequently, p53 protein may play an important role in the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinomas.