

膵癌におけるp16癌抑制遺伝子の異常 臨床病理学的事項との対比

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/2297/4581

膵癌における *p16* 癌抑制遺伝子の異常；臨床病理学的事項との対比

金沢大学がん研究所 腫瘍制御研究部門腫瘍内科 (主任：澤武紀雄教授)

大 坪 公 士 郎

癌抑制遺伝子である *p16* の異常は各種悪性腫瘍組織や膵癌では培養細胞株においてかなりの頻度で出現すると報告されているが¹, 膵癌組織での検討は未だ少なく, 膵癌におけるその臨床病理学的な意義は不明なままである. 本研究では, ヒト膵癌組織での *p16* 蛋白と遺伝子レベルでの異常を検索し, さらにその異常の有無と各種臨床病理学的事項とを対比し, その臨床病理学的意義を明らかにしようとした. ヒト膵癌組織60例で, 抗 *p16* 抗体 G175-405 を用い免疫組織染色を行った. また, マイクロダイセクション法にて抽出した DNA を用いて PCR, 非ラジオアイソトープ一本鎖高次構造多型分析 (PCR nonradioisotopic-single strand conformation polymorphism analysis, non RI-SSCP) 法や直接シーケンス法などにより, ホモ接合性欠失, 変異, プロモーター領域のメチル化などの遺伝子異常の検討を行った. さらに, *p16* 蛋白および遺伝子異常の有無と各種臨床病理学的事項を対比検討した. 免疫組織染色において, 核に染色された細胞が癌組織の5%以上にみられた場合を陽性, 但し, 核の染色強度が内部コントロールの核と同程度のものを強陽性, 内部コントロールより弱い場合を弱陽性とする. *p16* 蛋白は膵癌60例中22例 (37%) で強陽性, 24例 (40%) で弱陽性, 14例 (23%) で陰性であった. 一方, *p16* の変異は9例 (15%) にみられたが, 蛋白発現との関係を見ると, 蛋白陰性群で21% (3/14), 蛋白弱陽性群で17% (4/24), 蛋白強陽性群で9% (2/22) に変異がみられた. また, ホモ接合性欠失は認められず, メチル化は検索しえた35例中蛋白弱陽性を呈した2例にのみみられた. 免疫染色陰性, 弱陽性を異常とみなすと, 膵癌60例の *p16* の異常は, 蛋白レベルで38例 (63%), 遺伝子レベルで11例 (18%) にみられた. 蛋白異常群38例では遺伝子異常が9例 (24%) でみられたのに対し, 蛋白正常群22例では遺伝子異常は2例 (9%) のみであり, 免疫染色異常群において遺伝子異常の頻度が多い傾向がみられた. また, 臨床病理学的因子との対比では, *p16* 蛋白の異常の有無では, いずれにも明らかな有意差は認めなかったが, *p16* 蛋白に異常を認めた群は認めなかった群に比し, 腫瘍径が大きい傾向がみられた. また, *p16* 遺伝子の異常の有無では占拠部位, 組織型, 臨床病期に有意差は認めなかったが, *p16* 遺伝子の異常群では認めなかった群に比し, 有意に腫瘍径が大きく, 生存期間が短かった ($P < 0.05$). 以上の結果より, *p16* 異常を有する膵癌は生物学的悪性度が高く, *p16* 異常は膵癌の予後不良の予測マーカーになりうることを示唆された.

Key words *p16*, pancreatic carcinoma, immunohistochemical staining, mutation, hypermethylation

近年, 発癌やその進展における分子機構が解明され, それに伴い膵癌においても種々の癌関連遺伝子の異常が報告されている. 膵癌組織においては, *K-ras* 癌遺伝子コドン12の点突然変異が, 75~100%と高頻度に出現することが指摘されており^{1)~4)}, また, *p53* 癌抑制遺伝子でも, 40~76%の遺伝子変異が報告されている¹⁾⁵⁾⁶⁾. このような点に注目して, 当教室では膵癌の遺伝子診断への応用をめざして内視鏡的に採取した純膵液や十二指腸液において, *K-ras*, *p53* の遺伝子異常に関する検討を行い, 世界に先駆けてその臨床的有用性を報告してきた^{7)~13)}.

最近, 細胞周期の進行はサイクリンとサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase, CDK) の複合体により制御されていることが明らかとなり, 細胞周期の研究は急速に進歩している¹⁴⁾¹⁵⁾. CDK はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (cyclin dependent kinase inhibitor, CDKI) によりその活性が負に調節されているが¹⁶⁾¹⁷⁾, このうち, 癌細胞において高頻度に異常が

認められているものに *p16* がある. *p16* 蛋白は CDK4 と結合する蛋白として1993年 Serrano ら¹⁸⁾により同定された. さらに, 1994年に Kamb ら¹⁹⁾と Nobori ら²⁰⁾のグループが別々にヒト染色体 9p21 に存在する癌抑制遺伝子 (multiple tumor suppressor gene 1, MTS1) を単離したところ, *p16* 蛋白をコードする遺伝子であることが判明した. *p16* の異常は各種悪性腫瘍組織や膵癌では培養細胞株において比較的高頻度に発現することが報告されているが^{1)21)~30)}, 臨床材料を用いた膵癌組織での検討は未だ少ない^{31)~34)}, また, その蛋白と遺伝子レベルで対比して検索したり, 臨床病理学的事項との対比より研究された報告はなく, 膵癌における *p16* 異常の臨床病理学的意義は不明なままである.

本研究では, 膵癌組織で *p16* 蛋白と遺伝子の異常を検索し, さらにその異常の有無と各種臨床病理学的事項と対比し, 膵癌における *p16* 異常の臨床病理学的意義を明らかにしようとした.

平成12年11月30日受付, 平成13年1月11日受理

Abbreviations: CDK, cyclin dependent kinase; CDKI, cyclin dependent kinase inhibitor; E2F, E2 promoter factor; MSP, methylation specific PCR; non RI-SSCP, nonradioisotopic-single strand conformation polymorphism analysis; pRb, retinoblastoma protein

対象と方法

I. 膵癌組織

1987年4月から2000年3月まで、金沢大学がん研究所附属病院およびその関連施設にて切除された膵癌症例計60例（うち剖検2例を含む）を対象とした。性別は男性33例、女性27例であり、年齢は42歳から89歳まで、平均年齢は66.7歳であった。

膵癌組織は、20%ホルマリンに16時間固定されたパラフィン包埋標本を用い、免疫染色用に3~4 μ m、DNA抽出用に8~10 μ mの組織切片を作製した。

II. p16 免疫染色

3~4 μ mの膵癌組織の切片を、100%キシレンにて5分間3回脱パラフィンを行った後、100%エタノールで3分間2回、95%エタノールで3分間、90%エタノールで3分間、80%エタノールで3分間、70%エタノールで3分間、50%エタノールで3分間の処理を行った。蒸留水で1分間洗浄後、0.05M PBS (pH 7.6) にて3分間3回洗浄し、20分間非特異的なブロッキング抗体としてウシ血清アルブミンを加えた。その後、一次抗体の抗ヒト p16 モノクローナル抗体 G175-405 (PharMingen, San Diego, USA) を PBS で100倍に希釈し、4℃で16時間反応させた。次に、0.05M PBS にて3分間3回洗浄し、二次抗体のビオチン標識抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体およびビオチン標識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20分間反応させた。続いて、0.05M PBS にて3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, 東京) を20分間反応させた。さらに、0.05M PBS にて3分間3回洗浄し、3,3'-ジアミノベンゼンジジン (diaminobenzidine, Sigma, St. Louis, USA) にて3~5分間発色させた。その後、蒸留水にて1分間洗浄後、ヘマトキシリンにて核染色を行い封入した。なお、陽性対照として膵以外の疾患にて手術ないしは剖検時に得られた正常膵組織より切片を作製し、同様な方法にて p16 の免疫染色を行った。また、陰性対照としては、正常膵組織の切片を G175-405 の代わりにウサギ正常血清 IgG を反応させ、同様な方法にて免疫染色を行った。

III. DNA 抽出

8~10 μ mの組織切片を、100%キシレンにて5分間3回脱パラフィンを行った後、100%エタノールで3分間2回、95%エタノールで3分間、90%エタノールで3分間、80%エタノールで3分間、70%エタノールで3分間、50%エタノールで3分間の処理を行い、ヘマトキシリンにて核染色を行った。その後、検鏡下にマイクロダイセクション法にて選択的に膵癌組織のみを抽出し、以下に述べるように、Goelz²⁵⁾の方法を改変して処理した。まず、2% SDS (和光, 大阪) を含有した Tris-HCl EDTA (TE) 緩衝液 (pH 9.0) 1ml とプロテイナーゼ K (和光) 1mg の混合液内に入れ、48℃で16時間恒温を保った。その後、2本のチューブに分注し、それぞれにフェノール 250 μ l、クロロホルム 250 μ l を加え、10,000 g で10分間遠心した。次に、上清のみを別のチューブに移し、それぞれにクロロホルム 500 μ l を加え、10,000 g で10分間遠心した。さらに、上清を3本のチューブに分注し、それぞれに2倍量の99.5%エタノールを加えた後、-80℃で30分間放置し、10,000gで10分間遠心した。次に、上清を捨てた後、70%エタノール 100 μ l を加え洗浄し、その後遠心エバポレーター (佐久間製作所, 東京) にて乾燥させた。3本のチューブのうち2本にそれぞれ超純水 50 μ l ずつ加

え混合した後、もう1本のチューブに移し混合し、計100 μ lのDNAを作成した。その後、260nm吸光度の測定によりDNA濃度を定量した。

IV. PCR

p16 PCR プライマーは、エクソン1、エクソン2 (5' fragment)、エクソン2 (3' fragment) の3つの部位に分けて設計した³⁶⁾³⁷⁾ (表1)。これらのプライマーを用いて、抽出した DNA 約100ng を鋳型としてエクソン1とエクソン2 (5' fragment) については、10 \times PCR 用反応緩衝液 (Perkin-Elmer Cetus, Foster, USA) 2 μ l、各2.5 μ Mの4種類のdNTP混合液 (宝酒造, 京都) 1.6 μ l、5U/ μ l AmpliTaq™ DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus) 0.2 μ l、5 μ M プライマー混合液 4 μ l に、超純水を適量加えて全量20 μ lとして反応液を調製した。一方、エクソン1で上記のPCRの条件でバンドが得られなかった場合とエクソン2 (3' fragment) については、2 \times グアニン-シトシン (GC) 緩衝液 I (宝酒造) 10 μ l、各2.5 μ Mの4種類のdNTP混合液 1.6 μ l、5U/ μ l Takara LA Taq™ (宝酒造) 0.2 μ l、5 μ M プライマー混合液 4 μ l に超純水を適量加えて全量20 μ lとして反応液を調製した。その後、Takara™ MP MT3000 (宝酒造) を用いて以下の条件でPCR反応を行った。すなわち、前加熱を95℃2分間行った後、変性95℃1分間、アニーリング60~62℃1分間、伸長72℃1分間を1サイクルとし、40~45サイクル行い、72℃6分間の伸長反応を追加した。得られたPCR産物は、2% NuSieve™ 3:1 アガロースゲル (FMC Bioproducts, Rockland, USA) を用い、Tris-氷酢酸-EDTA [Tris 40mM, 氷酢酸 20mM, EDTA 2mM (pH8.0)] 泳動緩衝液にて電気泳動を Mupid-2 (コスモ・バイオ, 東京) を用いて行い、SyBr Green I (ニッポンジーン, 東京) にて20分間染色を行った。その後、画像解析装置デンストグラフ (アトー, 東京) を用いて画像解析を行った。単一のバンドが目的とする部位に得られることにより増幅を確認した。なお、単一のバンドが得られなかった場合は、対立遺伝子がいずれも欠失している可能性を考え、ホモ接合性欠失の存在を疑った。

V. 非ラジオアイソトープ一本鎖高次構造多型分析 (PCR nonradioisotopic-single strand conformation polymorphism analysis, non RI-SSCP) 法

PCR産物が単一のバンドとして得られた場合には、上述のDNA抽出液の5 μ lを用いて0.05%ブROMフェノールブルー、0.05%キシレンシアノールを加えた95%ホルムアミド液5 μ lを加え、95℃5分間熱変性させた後直ちに冷却し、15%ポリアクリルアミドゲル (アトー) を用いて4℃、150V、12~24時間の条件で、循環冷却恒温装置スーパースタットミニPID (アトー)、緩衝液循環式熱交換機テンプコン (アトー) に接続した2連式ミニスラブゲル AE6410 (アトー) にて50mM Tris グリシン [Tris 50mM, グリシン 384mM (pH 8.3)] 電気泳動緩衝液にて電気泳動を行った。その後、SyBr Green II (ニッポンジーン) にて20分間染色を行った後、画像解析装置デンストグラフを用いて画像解析を行った。野生型と異なる泳動度を認めたバンドを変異バンドとし³⁸⁾、カッターにて切り出し以下のシークエンスの解析に使用した。

VI. 直接シークエンス法による塩基配列の決定

non-RI SSCP 法により得られた変異バンドに蒸留水30 μ lを加え、80℃30分間加熱することにより、ポリアクリルアミドゲルよりDNAを抽出した。この抽出液を鋳型として前述と同様

の条件にて PCR 反応を行った。その後、PCR 産物 $20\mu\text{l}$ を DNA 抽出膜 Takara SUPREC™-02 (宝酒造) に移した後、Tris-EDTA [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA] 緩衝液 $400\mu\text{l}$ を加え、1500g で8分間の遠心操作を3回繰り返した。鋳型 DNA $100\mu\text{g}$ に Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing キット (Perkin-Elmer Cetus) の反応液 $8\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{M}$ プライマー混合液 $1\mu\text{l}$ 、超純水を適量加えて全量 $20\mu\text{l}$ として反応液を調製した。これに Takara™ MP MT3000 を用いて以下の条件で PCR 反応を行った。すなわち、前加熱を 96°C 1分30秒間行った後、 96°C 30秒間、 50°C 15秒間、 60°C 4分間を1サイクルとし、25サイクル行った。得られた反応液を精製用スピナカラム Centri sep (Perkin-Elmer Cetus) を用いて未反応な過剰な蛍光色素を除去して精製し、減圧乾燥させた。その後、Template Suppression Reagent (TSR) (Perkin-Elmer Cetus) $20\mu\text{l}$ を加えた後、 95°C 2分間熱変性し、自動シーケンス解析装置 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズジャパン、千葉) を用い、電気泳動を行うシーケンス反応を行い塩基配列を決定した。

Ⅶ. メチル化の解析

Gonzalez-Zulueta ら³⁹⁾の方法に従い制限酵素を用いた方法によりプロモーター領域のメチル化の有無を検討した。制限酵素はメチル化感受性制限酵素である *Sac* II、*Hpa* II (Roche, Mannheim, Germany)、メチル化非感受性制限酵素である *Msp* I (Roche) を用いた。まず、鋳型 DNA 約 $1\mu\text{g}$ に $10\times$ 緩衝液 $2.5\mu\text{l}$ 、制限酵素 10U を加え、超純水を適量加えて全量 $25\mu\text{l}$ として反応液を調製した。この反応液を Takara™ MP MT3000 を用い、 37°C で12時間恒温を保ち、Microcon (Millipore, Bedford, USA) にてプライマーなどを除き、鋳型 DNA を作成した。PCR プライマーは Chabert ら⁴⁰⁾の設定したプライマー

に倣い、表1に示すプライマーを用いた。制限酵素未処理の DNA、3つの制限酵素にて処理した DNA 計4つの DNA 約 100ng を鋳型として $10\times$ 緩衝液 $1\mu\text{l}$ 、各 $2.5\mu\text{M}$ の4種類の dNTP 混合液 $0.8\mu\text{l}$ 、 $5\text{U}/\mu\text{l}$ AmpliTaq™ ポリメラーゼ $0.1\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{M}$ プライマー混合液 $2\mu\text{l}$ に超純水を適量加えて全量 $10\mu\text{l}$ として反応液を調製した。その後、Takara™ MP MT3000 を用いて以下の条件で PCR 反応を行った。すなわち、前加熱を 95°C 2分間行った後、変性 95°C 1分間、アニーリング 62°C 1分間、伸長 72°C 1分間を1サイクルとし、35~40サイクル行い、 72°C 6分間の伸長反応を追加した。メチル化感受性制限酵素にてバンドが得られ、メチル化非感受性制限酵素にてバンドが得られない場合をメチル化陽性、メチル化感受性制限酵素、メチル化非感受性制限酵素いずれでもバンドが得られない場合をメチル化陰性と判定した。

Ⅷ. 臨床病理学的検討

膵癌症例計 60 例について腫瘍径、占拠部位、組織型、臨床病期について膵癌取り扱い規約 (日本膵臓学会編)⁴¹⁾に従い分類し、予後についても術後の追跡調査を行った。

臨床病理学的事項を確認できた症例について、p16 免疫染色、p16 遺伝子解析でそれぞれ異常を認めた群と認めなかった群に分け、腫瘍径 (TS1 と 2 に対して TS3 と 4)、占拠部位 (膵頭部に対して膵体尾部)、組織型 (乳頭腺癌、高分化型管状腺癌に対して中~低分化型管状腺癌)、臨床病期 (Stage 1 と 2 に対して Stage 3 と 4、TNM 分類による)、予後 (手術後 6ヶ月を超えて生存に対して手術後 6ヶ月以内に死亡) について有意差があるか χ^2 検定にて検討し、いずれも危険率 (p 値) 5%未滿を有意差ありと判定した。さらに、Kaplan-Meier 法により、p16 免疫染色、p16 遺伝子解析でそれぞれ異常を認めた群と認めなかった群につき、生存期間に有意差があるかについても検討した。

Table 1. p16 primers for PCR-SSCP and hypermethylation analysis

Exon	Amplified segment (bp)	Annealing temperature ($^\circ\text{C}$)	Sense primers (5'-3')	Antisense primers (5'-3')
1	204	62	GGGAGCAGCATGGAGCCG	AGTCGCCCCGCATCCCCT
2 (5' fragment)	132	62	TCTCTCTGGCAGGTCATGAT	AGCACCACCAGCGTGTCCAG
2 (3' fragment)	206	60	TTCTGACACGCTGGTGGT	GATCATCAGTCTCACCTGA
Hypermethylation	160	62	GGGAGCAGCATGGAGCCG	CTGGATCGGCCTCCGACCGTA

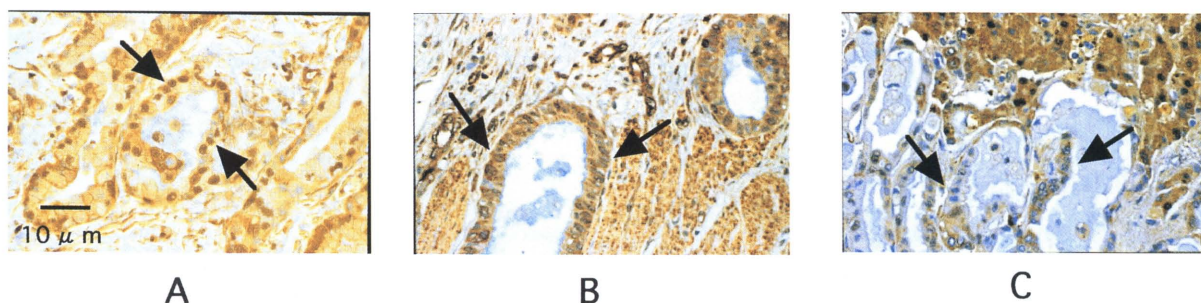


Fig. 1. Immunohistochemical staining of p16 protein in the pancreatic carcinomas. (A) Strongly positive. (B) Weakly positive. (C) Negative staining ($\times 400$). The cancer cells were indicated with arrows.

Table 2. Clinicopathological parameters and p16 abnormalities in pancreatic carcinomas

Case number	Age (year)	Sex	Location	Size (TS)	Pathology	Stage	Survival (months)	E-1	E-2 5'	E-2 3'	Hypermethylation
I. Immunohistochemistry of p16: negative											
1	83	M	B	4	Adenosquamous	3	3	-	M (M)	M (S)	-
2	55	M	T	3	Well	3	5	-	M (M)	-	-
3	70	F	H	1	Well	3	28	-	-	M (M)	-
4	62	M	T	3	Mod	4	2	-	-	-	-
5	74	F	H	2	Mod	2	5	-	-	-	-
6	65	F	H	2	Mod	2	-	-	-	-	-
7	57	F	H	3	Well	2	10	-	-	-	-
8	49	M	H	1	Well	1	-	-	-	-	-
9	74	F	H	2	Mod	2	5	-	-	-	-
10	71	F	H	2	Pap	3	-	-	-	-	-
11	72	M	B	2	Mod	4	1	-	-	-	-
12	58	M	H	2	Mod	1	-	-	-	-	-
13	62	M	H	3	-	1	11	-	-	-	-
14	74	F	T	2	Mod	3	1	-	-	-	-
II. Immunohistochemistry of p16: weakly positive											
15	59	M	H	3	Mod	3	3	M (F)	-	-	-
16	72	F	H	1	Por	1	15	-	M (M)	-	-
17	71	F	H	2	Mod	3	2	-	M (M)	-	-
18	76	M	B	4	Mod	3	5	-	-	M (M)	-
19	50	M	H	-	Mod	3	5	-	-	-	+
20	51	M	B	3	Well	4	6	-	-	-	+
21	67	F	H	3	Pap	1	>87	-	-	-	-
22	85	M	H	2	Adenosquamous	3	7	-	-	-	-
23	72	M	B	2	Mod	1	10	-	-	-	-
24	61	M	H	2	Mod	1	26	-	-	-	-
25	71	F	T	2	Mod	3	7	-	-	-	-
26	66	M	H	3	Well	1	35	-	-	-	-
27	57	M	H	2	Por	4	5	-	-	-	-
28	67	F	-	-	Mod	2	>60	-	-	-	-
29	64	F	H	2	Mod	2	6	-	-	-	-
30	49	F	B~T	2	Well	2	-	-	-	-	-
31	69	F	B	2	Well	1	>12	-	-	-	-
32	71	F	H	3	Mod	1	>39	-	-	-	-
33	59	F	B	4	Mod	4	2	-	-	-	-
34	77	F	H	3	Well	3	-	-	-	-	-
35	67	M	H	4	Por	4	2	-	-	-	-
36	56	M	B	4	Por	3	>6	-	-	-	-
37	79	F	H	1	Well	3	-	-	-	-	-
38	74	M	H	2	Mod	2	16	-	-	-	-
III. Immunohistochemistry of p16: strongly positive											
39	45	M	H	3	Por	2	-	M (M)	-	-	-
40	74	M	B	2	Mod	4	1	-	-	M (S)	-
41	72	F	H	1	Well	3	9	-	-	-	-
42	72	F	H	2	Well	3	17	-	-	-	-
43	68	M	B	2	Mod	3	15	-	-	-	-
44	70	F	H	2	Mod	3	2	-	-	-	-
45	48	M	H	2	Pap	1	26	-	-	-	-
46	55	M	H	2	Mod	4	6	-	-	-	-
47	66	F	T	2	Well	4	4	-	-	-	-
48	73	M	B	4	Well	4	8	-	-	-	-
49	65	F	H	3	Pap	1	>130	-	-	-	-
50	56	M	T	2	Por	3	9	-	-	-	-
51	65	M	H	2	Mod	3	6 (AMI*)	-	-	-	-
52	-	M	H	-	Por	-	-	-	-	-	-
53	55	M	H	2	Mod	3	15	-	-	-	-
54	83	M	T	2	Mod	3	4	-	-	-	-
55	89	M	H	1	Well	4	2	-	-	-	-
56	69	M	H	2	Well	3	10	-	-	-	-
57	42	F	H	1	Well	4	5	-	-	-	-
58	68	M	H	2	Por	2	1	-	-	-	-
59	65	F	H	3	Por	3	-	-	-	-	-
60	54	F	H	2	por	3	-	-	-	-	-

H, head; B, body; T, tail. TS1 ≤ 2.0cm, 2.0cm < TS2 ≤ 4.0cm, 4.0cm < TS3 ≤ 6.0cm, 6.0 < TS4. pap, papillary adenocarcinoma; well, well differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; por, poorly differentiated adenocarcinoma. *, This patient died of acute myocardial infarction. M (M), missense mutation; M (S), silent mutation; M (F), frame shift mutation. -, no detectable mutation nor hypermethylation; +, positive hypermethylation.

成 績

I. 免疫組織染色法による p16 蛋白の発現

一般に p16 免疫染色では図1に示すごとく核のみならず細胞質も染色されるが, 検鏡下に1,000個の癌細胞を数え, 細胞質の染色の如何に関わらず, 核に染色された細胞が癌組織の5%以上にみられた場合を陽性, 5%以下の場合を陰性と判定した⁴²⁾. 同一標本において, 非癌部の膵腺房細胞やリンパ球を内部コントロールにして, 核の染色強度が内部コントロールの核と同程度のものを強陽性, 内部コントロールの核より弱い場合を弱陽性と判定した⁴³⁾. ほとんどの症例において癌組織の染色強度はほぼ一様であり, 判定は比較的容易であったが, 一部の症例では同一切片内でも染色強度が異なる部位がみら

れ, そのような場合には, 1,000個の細胞を切片全体から均等に選択し, 前述の判定基準に従い分類した. ここで, p16 免疫染色強陽性を p16 蛋白発現正常, 免疫染色弱陽性を蛋白発現減弱, 免疫染色陰性を蛋白発現消失と考え, 蛋白発現が低下している減弱, 消失例を p16 蛋白異常とした. この様な基準にて p16 蛋白の膵癌組織における発現をみると, p16 蛋白は膵癌 60 例中 22 例 (37%) で正常, 24 例 (40%) で減弱, 14 例 (23%) で消失であった.

II. PCR 法による検討

表2に示すごとく, 膵癌 60 例中, エクソン 2 (5' fragment) では全例で PCR バンドが得られたが, エクソン 2 (5' fragment) と同じ PCR の条件ではエクソン 1 とエクソン 2 (3' fragment) では当初 PCR バンドが得られた症例は約半数に過ぎなかった. そこで, エクソン 1 で上記の PCR の条件でバンドが得られな

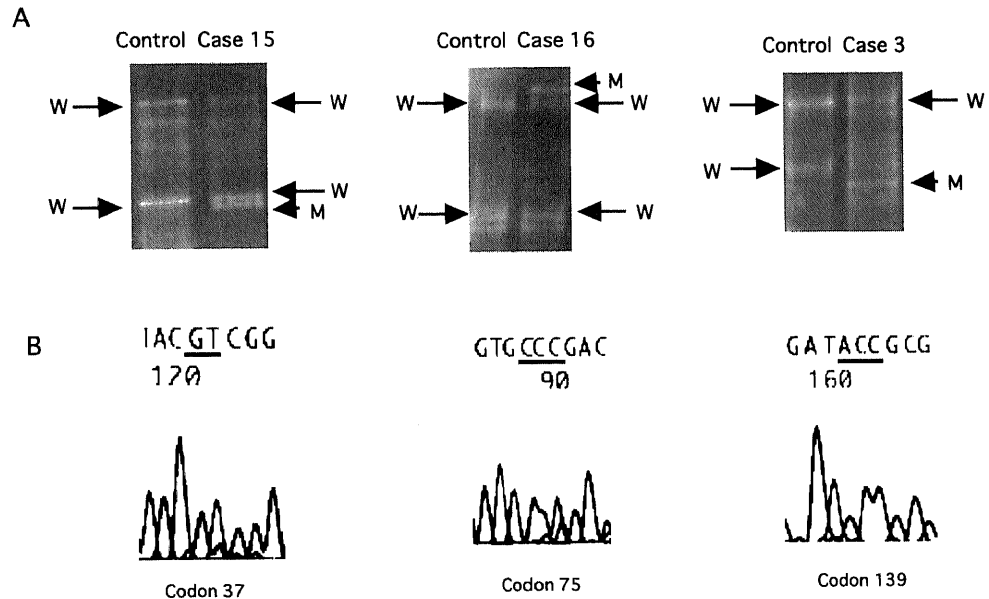


Fig. 2. (A) Non RI-SSCP analyses of *p16*. (B) Sequence analyses of the samples shown in (A). In non RI-SSCP, mutant bands were found as extra bands (arrow head) compared with wild type ones (arrow). Sequence analyses showed 1bp deletion in exon 1 in case 15 and missense mutations in exon 2 (5' fragment) in case 16 and exon 2 (3' fragment) in case 3, respectively (see Table 3). W, wild type; M, mutant type.

Table 3. *p16* mutations identified in pancreatic carcinomas

Case number	Immunohistochemistry	Exon	Codon	DNA sequencing alterations
1	Negative	2 (5' fragment)	80	GAG→GGG (Glu→Gly)
		2 (3' fragment)	93	GGG→GGA (Gly→Gly)
2		2 (5' fragment)	75	CAC→CCC (His→Pro)
3		2 (3' fragment)	139	GCC→ACC (Ala→Thr)
15	Weakly positive	1	37	GGT→G T (1bp deletion)
16		2 (5' fragment)	75	CAC→CCC (His→Pro)
17		2 (5' fragment)	78	GCC→GTC (Ala→Val)
18		2 (3' fragment)	107	GTG→GAG (Val→Glu)
39	Strongly positive	1	3	CCT→TCT (Pro→Ser)
40		2 (3' fragment)	106	GGG→GGA (Gly→Gly)

Glu, Glutamic acid; Gly, Glycine; His, Histidine; Pro, Proline; Ala, Alanine; Thr, Threonine; Val, Valine; Ser, Serine.

かった場合とエクソン 2 (3' fragment) については、2×GC 緩衝液 I, Takara LA Taq™を用いて PCR 反応を行ったところ、エクソン 1 では 2 例 (症例 20, 38) を除く全例、エクソン 2 (3' fragment) では全例において PCR 産物のバンドが得られた。PCR 産物のバンドが得られた症例に関しては、以下の non RI-SSCP 法により変異の有無について検討した。

Ⅲ. non RI-SSCP 法と直接シーケンス法による塩基配列の決定

上述の PCR 産物を non RI-SSCP 法により、p16 遺伝子の変異について検索したところ、表 2 に示すごとく、エクソン 1 では 2 例、エクソン 2 では 8 例 (5' fragment で 4 例、3' fragment で 4 例)、のべ 10 例において変異バンドがみられ、エクソン 2 で変異の頻度が高い傾向がみられた。ただし、症例 1 において、エクソン 2 (5' fragment) とエクソン 2 (3' fragment) の両者に変異が認められたため、p16 の変異は結局膵癌で 15% (9/60) であった。

変異バンドがみられたのべ 10 症例につき、直接シーケンス法による塩基配列の決定を行った (図 2)。10 症例の内訳は、表 3 に示すごとく、ミスセンス突然変異 (missense mutation) 7

例、サイレント突然変異 (silent mutation) 2 例、フレームシフト突然変異 (frame shift mutation) 1 例であり、ナンセンス突然変異 (nonsense mutation) は認めなかった。ただし、フレームシフト突然変異を認めた 1 例については、その下流のアミノ酸が TGA とストップコドンとなることが確認された。また、コドン 75 においてヒスチジンからプロリンへの変異が 2 症例でみられた以外は、同じコドンに 2 症例以上の変異はみられず、明らかな変異の好発部位は認めなかった。

Ⅳ. メチル化の解析

メチル化に関しては、蛋白発現消失群 7 例、減弱群 16 例、正常群 12 例の計 35 例について検討することができた。蛋白発現減弱群 16 例中 2 例においてメチル化感受性制限酵素 Sac II, Hpa II において PCR バンドが得られ、メチル化非感受性制限酵素 Msp I において PCR バンドが得られず、これら 2 例はメチル化陽性と判定した (図 3)。なお、蛋白発現消失群 7 例、減弱群の残る 14 例、正常群 12 例の計 33 例については、メチル化感受性制限酵素 Sac II, Hpa II, メチル化非感受性制限酵素 Msp I においていずれも PCR バンドが得られず、メチル化陰性と判定した。なお、メチル化陽性の 2 例はいずれも変異は認めず、変異とメチル化を同時に認めた症例はなかった。

ここで、蛋白発現が低下している免疫染色陰性および弱陽性の計 38 例を p16 蛋白異常群、蛋白発現が保たれている免疫染色陽性の計 22 例を p16 蛋白正常群に分けて、遺伝子異常との関係を見ると、p16 蛋白異常群 38 例中遺伝子異常は 9 例 (24%)、p16 蛋白正常群 22 例中遺伝子異常は 2 例 (9%) であり、有意差はみられなかったが (p = 0.23)、p16 蛋白異常群では正常群に比べて遺伝子異常が多い傾向がみられた。

Ⅴ. 臨床病理学的事項の検討

まず、p16 蛋白発現異常の有無と臨床病理学的因子との関連について検討した。p16 蛋白発現異常の有無と腫瘍径、占拠部位、組織型、臨床病期、予後との関係ではいずれにも明らかな有意差は認めなかった (表 4)。しかし、腫瘍径に関しては、p16 蛋白の発現異常の有無で比較した p 値は p = 0.081 であり、

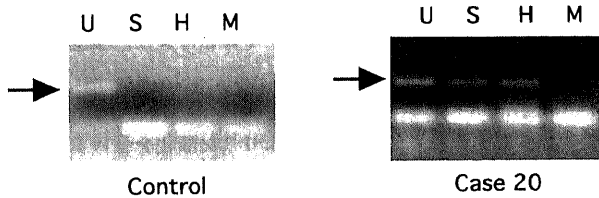


Fig. 3. Hypermethylation analyses using restriction enzyme. In control hypermethylation analysis showed a PCR band only in undigested enzyme (arrow). In case 20 with weakly positive staining of p16, hypermethylation analysis showed positive because the same PCR bands were obtained with or without the digestion with Sac II and Hpa II, whereas PCR band was not obtained after the digestion with Msp I (arrow). U, undigested; S, Sac II; H, Hpa II; M, Msp I.

Table 4. Correlations between clinicopathological parameters and decrease or loss of p16 protein in pancreatic carcinomas

Parameters	Number	Decrease or loss of p16 protein (%)	P
Tumor size			
TS1 & TS2	38	21 (55)	0.081
TS3 & TS4	19	15 (79)	
Tumor location			
Head	40	24 (60)	0.53
Body & tail	19	13 (68)	
Pathological findings ^a			
Pap & well	22	12 (55)	0.40
Mod & por	35	23 (66)	
Clinical stage			
I & II	22	17 (77)	0.11
III & IV	37	21 (57)	
Survival (months)			
≤6	25	14 (56)	0.33
>6	23	16 (70)	

^apap, papillary adenocarcinoma; well, well differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; por, poorly differentiated adenocarcinoma.

Table 5. Correlations between clinicopathological parameters and alterations of *p16* gene in pancreatic carcinomas

Parameters	Number	<i>p16</i> alterations (%)	p
Tumor size			
TS1 & TS2	38	4 (11)	0.049
TS3 & TS4	19	6 (32)	
Tumor location			
Head	40	6 (15)	0.30
Body & tail	19	5 (26)	
Pathological findings ^a			
Pap & well	22	3 (14)	0.54
Mod & por	35	7 (20)	
Clinical stage			
I & II	22	2 (9)	0.15
III & IV	37	9 (24)	
Survival (months)			
≤6	25	2 (8)	0.022
>6	23	8 (35)	

^apap, papillary adenocarcinoma; well, well differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; por, poorly differentiated adenocarcinoma.

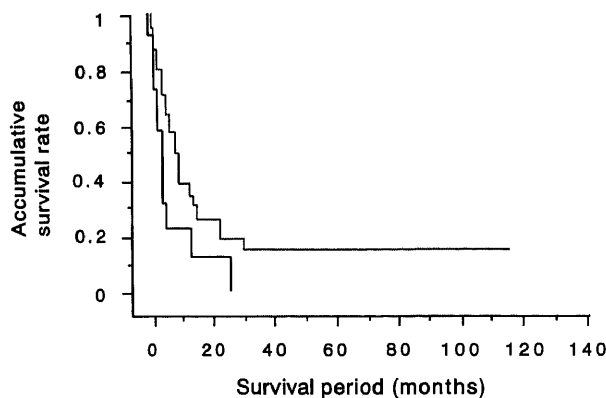


Fig. 4. Survival curve in patients with PCs according to the normal (gray line) and abnormal (black line) *p16* gene (by Kaplan-Meier method). In PCs with *p16* genetic alteration, the survival period was significantly shorter than that with intact *p16* gene ($p = 0.028$).

有意差こそ認めなかったが、*p16* 蛋白に異常を認めた群では認めなかった群に比し、腫瘍径が大きい傾向がみられた。次に、*p16* 遺伝子の異常の有無で占拠部位、組織型、臨床病期を比較しても有意差は認められなかったが、*p16* 遺伝子に異常を認めた群では認めなかった群に比し、腫瘍径が有意に大きく ($P = 0.049$)、手術後6ヶ月以内に死亡したものが有意に多かった ($P = 0.022$) (表5)。また、Kaplan-Meier 法では、*p16* 蛋白の異常の有無では、生存期間に有意差は認められなかったが ($p = 0.89$)、*p16* 遺伝子に異常を認めた群では認めなかった群に比して生存期間は有意に短かった ($p = 0.028$) (図4)。

考 察

細胞周期において、S 期 (複製期) あるいは M 期 (分裂期) に入る前である G₁ 期あるいは G₂ 期では、DNA の完全性をチェックする機構が働いており、その中でも特に G₁ 期は重要な働きをされると考えられている。nRB (retinoblastoma protein) は S

期の開始に必要な転写因子である E2F (E2 promotor factor) と直接結合し、その働きをブロックすることにより、細胞周期を G₁ 期に止める働きをもっている⁴⁴⁾。pRB は G₀ 期や G₁ 初期にはリン酸化されておらず E2F に結合する活性をもっているが、G₁ 中期から後期にかけて CDK によりリン酸化を受けると、活性を失い E2F と結合することができなくなり、細胞周期が S 期へと進行する¹⁴⁾¹⁵⁾。哺乳動物細胞の場合、現在までに9つの CDK タンパクが報告されている。そのうち pRB のリン酸化に関与しているのは CDK4、CDK6 および CDK2 で、まず、G₁ 中期に CDK4 および CDK6 がサイクリン D と結合して活性化され、さらに G₁ 後期に CDK2 がサイクリン E と結合して活性化され、これらの CDK により、pRB が完全にリン酸化される¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに、CDK は CDKI によりその活性が負に調節されている¹⁶⁾¹⁷⁾。哺乳動物からは現在までに7種類の CDKI が同定されており、*p15*、*p16*、*p18*、*p19* のファミリー [INK4 (inhibitor of CDK4) ファミリー] と *p21*、*p27*、*p57* のファミリー [CIP (CDK interacting protein)/KIP (kinase inhibitory protein) ファミリー] に分けられる。このうち、癌細胞において高頻度に異常が認められているものに *p16* がある。上記の RB を中心とした増殖調節機構は RB 経路と呼ばれており、この経路に異常が生じると、G₁/S 期における細胞周期の調節が効かなくなり、細胞周期が G₁ 期に止まることなく常に細胞増殖を続けるようになり、最終的に癌細胞に変貌するといわれている。

p16 遺伝子は3個のエクソンからなり、4個のアンキリンリピート配列を有する¹⁹⁾。その蛋白質の分子量は約 16 kDa であり、156個のアミノ酸からなる。今まで、*p16* の悪性腫瘍における遺伝子異常に関しては数多くの報告がみられるが^{21)~27)}、神経膠腫²²⁾や鼻咽頭癌²³⁾のようにホモ接合性欠失が多い腫瘍や食道癌²¹⁾や胆道癌²⁴⁾のように変異が多い腫瘍があり、*p16* の遺伝子異常の頻度やタイプには臓器あるいは組織特異性がみられるという説もある⁴⁵⁾⁴⁶⁾。肺癌における *p16* 遺伝子の異常の頻度に関しては、1994年、Caldas ら²⁸⁾が肺癌由来細胞株や異種移植片において欠失と変異がそれぞれ41%と38%にみられると

報告した。その後も細胞株や異種移植片では高率に *p16* の異常がみられると報告されたが¹⁾²⁹⁾³⁰⁾、臨床材料においては、遺伝子異常の頻度はそれほど高くはなく、Bartsch ら³¹⁾、Huang ら³²⁾は欠失と変異を合わせてもそれぞれ37% (12/32) (変異: 34% (11/32), 欠失: 3% (1/32)) および 27% (8/30) (変異: 17% (5/30), 欠失: 10% (3/30)) と報告している。今回の検討では、エクソン2 (5' fragment) では全例で PCR バンドが得られたが、エクソン2 (5' fragment) と同じ PCR の条件ではエクソン1とエクソン2 (3' fragment) では当初 PCR バンドが得られた症例は約半数に過ぎなかった。これに関しては、アデニンとチミンが2本の水素結合で塩基対を作るのに対してグアニンとシトシンは3本の水素結合で塩基対を作るため、グアニンとシトシンを含有する割合が高い *p16* は PCR 反応においてより変性しにくく¹⁸⁾、さらにエクソン1とエクソン2 (3' fragment) では塩基対がそれぞれ 204 bp と 206 bp とエクソン2 (5' fragment) に比べると長いために PCR バンドが得られにくいものと考えられた。そこで、エクソン1で上記の PCR の条件でバンドが得られなかった場合とエクソン2 (3' fragment) については、グアニンとシトシンを含有する割合が高くても比較的 PCR バンドが得られやすい 2×GC 緩衝液 I, Takara LA Taq™を用いて PCR 反応を行ったところ、エクソン1では2例を除く全例、エクソン2 (3' fragment) では全例において PCR バンドが得られた。エクソン1にて PCR バンドが得られなかった症例に関しては、同部位のみ欠失していた可能性もあるが、*p16* がグアニンとシトシンを含有する割合が高いために 2×GC 緩衝液 I, Takara LA Taq™を用いても PCR バンドが得られにくかった可能性が高いと思われる。今回の研究では、明らかなホモ接合性欠失は検出されなかったと判断した。さらに、本研究では、DNA は可視光顕微鏡下のマイクロダイセクション法により癌組織のみを抽出したが、手技上、非癌性組織の混入を完全に防ぐことは困難であったと考えられる。したがって、症例によっては、膵癌組織は *p16* のホモ接合性欠失であっても、混入した正常膵組織からの DNA により PCR バンドが得られた可能性もあるものと思われた。

変異に関しては、膵癌60例中のべ10例、9症例において変異バンドがみられ、その内訳は、エクソン1が2例、エクソン2が7例とエクソン2でより高頻度であり、過去の報告²¹⁾²⁵⁾³¹⁾³²⁾と同様の傾向がみられた。Bartsch ら³¹⁾は変異陽性であった11例中5例にナンセンス突然変異、5例に下流でストップコドンとなるフレームシフト突然変異がみられ、ストップコドンとなる変異の頻度が高いと報告しているが、Huang ら³²⁾は、変異のみられた5例中3例はミスセンス突然変異であり、ストップコドンとなる変異はフレームシフト突然変異1例のみであった報告している。今回の研究では、変異のみられたべ10例のうち、7例がミスセンス突然変異で、ストップコドンとなる変異は下流でストップコドンとなるフレームシフト突然変異の1例のみであり、Huang ら³²⁾の報告と同様の傾向を示した (表2, 3)。*p16* のエクソン3における塩基配列の長さは12 bp と非常に短く³⁸⁾、また過去の報告ではエクソン2が *p16* 変異の好発部位であり²¹⁾²⁵⁾³¹⁾³²⁾、エクソン3の変異を検討した報告では変異を認めたものはなかったことより²³⁾²⁶⁾³¹⁾³⁵⁾、エクソン3に変異が出現する可能性は極めて稀であると予想されたため、エクソン3に関する解析は行わなかった。

癌抑制遺伝子の不活化のメカニズムの1つとしてプロモーター

領域のメチル化が注目されている。これは、プロモーター領域に存在するシトシン (C)-グアニン (G) となっている二塩基配列 (CpG) 中のシトシンにメチル基が付着することにより、DNA から mRNA への転写が阻害されるものであり⁴⁷⁾、これにより、癌抑制遺伝子が不活化され、癌化に結び付くと考えられている⁴⁸⁾。メチル化に関しては、*p16*^{33)34)39)43)49)~55)}以外にも *p15*, *VHL*, *E-カドヘリン*⁴⁹⁾, *H-カドヘリン*⁵⁰⁾, *MLH1*, *MLH2*⁵⁷⁾, エストロゲン受容体⁵⁸⁾など多くの癌抑制遺伝子でも報告されている。今回、*p16* 遺伝子のメチル化に関しては、制限酵素を用いた手法⁴⁰⁾にて検討を行ったが、メチル化の頻度は検討した35例中免疫染色弱陽性の2例 (6%) に過ぎなかった。メチル化特異的 PCR (methylation specific PCR, MSP) を用いたメチル化の検討では、1,000個の正常細胞中に1個のメチル化を有する細胞が存在した場合でも検出可能といわれており⁴⁹⁾、制限酵素を用いた手法に比べて感度は著しく高いものと考えられる。実際、Sugimoto ら³³⁾は、24例の膵癌において制限酵素を用いた手法においてメチル化の存在を検討し、メチル化は1例も認められなかったとしているが、Ueki ら³⁴⁾は膵癌におけるメチル化の頻度を MSP により検討し、14%でメチル化がみられたと報告している。今回、MSP による検討はできなかったが、膵癌におけるメチル化の頻度は MSP を用いれば、今回の検討より高率になった可能性があるものと思われる。

以前、教室の胡は中国上海第2軍医学で得られた膵癌組織を用い、膵癌における *p16* 免疫染色の検討を行い、62例中36例 (58%) が陽性、26例 (42%) が陰性と報告した⁴²⁾。今回の検討では、陽性、陰性の判定基準は同様に設定したが、陽性の中でも核の染色強度が内部コントロールの核と同程度のものを強陽性、内部コントロールの核より弱い場合を弱陽性と判定したところ、*p16* 免疫染色の成績は、膵癌60例中22例 (37%) で強陽性、24例 (40%) で弱陽性、14例 (23%) で陰性であった。ここで、*p16* 蛋白発現と *p16* 遺伝子異常との成績の比較をすると、発現消失群では14例中3例 (21%)、減弱群では24例中4例 (17%)、正常群では22例中2例 (9%) に遺伝子の変異がみられた。また、メチル化に関しては検討し得た35例中免疫染色弱陽性の2例 (6%) において *p16* のメチル化がみられた。蛋白発現が低下している免疫染色陰性および弱陽性例を *p16* 蛋白異常群、蛋白発現が保たれている免疫染色強陽性例を *p16* 蛋白正常群として、遺伝子異常との関係を見ると、*p16* 蛋白異常群38例中遺伝子異常が9例 (24%)、*p16* 蛋白正常群22例中遺伝子異常が2例 (9%) であり、*p16* 蛋白異常群において遺伝子異常の頻度が高い傾向がみられた。

以上、今回の臨床材料の検討において、遺伝子異常はホモ接合性欠失、変異、メチル化を合わせても60例中11例 (18%) に過ぎず、過去の報告³¹⁾³²⁾と同様低率であった。また、免疫染色で異常が認められた38例中、遺伝子異常が確認されたものは10例 (26%) に過ぎなかったが、残る28例では、正常膵組織の混入のために検出できなかった可能性のあるホモ接合性欠失、MSP にてのみ検出されるメチル化の存在、エクソン3やプライマー設定部位での変異、などの可能性が想定される。また、免疫染色強陽性例でも22例中2例 (9%) で遺伝子異常がみられた。その内訳はミスセンス突然変異が1例、サイレント突然変異が1例であった。Matsuda ら⁴³⁾は、肝癌において免疫染色とメチル化との相関を検討しており、免疫染色陽性の肝癌例においては1例もメチル化は認めなかったと報告している。今回の

検討より、*p16* 遺伝子異常は必ずしも蛋白発現の低下を伴わない可能性が示唆された。この理由として、遺伝子異常がみられる部分が腫瘍の一部であり全体としては蛋白産生の低下を来していない、今回の症例1と症例40のように変異がサイレント突然変異であり蛋白組成には変化を及ぼさない、遺伝子異常により変化する蛋白構造が免疫染色で用いる抗体により認識されるエピトープに影響していない、などの可能性があると思われる。

膵癌で *p16* 異常と臨床病理学的因子を対比して検討した報告はこれまでに無いが、神経芽細胞腫⁵⁹や肺腺癌⁶⁰における *p16* 蛋白と臨床病理学的因子と比較した報告によると、いずれも *p16* 蛋白発現が低下していた群で有意に臨床病期が進行しており、予後が不良であったとされている。今回の筆者の検討では、*p16* 蛋白の異常の有無で、腫瘍径、占拠部位、組織型、臨床病期、予後などの臨床病理学的因子と比較してもいずれにも有意差は認めなかったが、*p16* 蛋白に異常を認めた群は認めなかった群に比し、腫瘍径が大きい傾向がみられた。以前、教室の胡らは、*p16* 免疫染色において、高分化型膵癌に比べ、中分化型および低分化型膵癌では、免疫染色で蛋白発現が有意に低下しているとの報告を行った⁴²。今回の検討では組織型の差異により蛋白発現の有無に有意差はみられなかったが、その理由としては、胡らの報告は大部分が中国で得られた膵癌を対象としているのに対し、今回の検討では大部分は本邦で得られた膵癌を対象としており、対象とした症例が異なることや、免疫染色の判定において弱陽性を新たに設けたことなどが考えられる。一方、*p16* 遺伝子の異常の有無では占拠部位、組織型、臨床病期には有意差は認めなかったが、*p16* 遺伝子に異常を認めた群では認めなかった群に比し、腫瘍径が有意に大きく ($P=0.049$)、手術後6ヶ月以内に死亡したものが有意に多かった ($P=0.022$)。また、Kaplan-Meier 法でも、*p16* 遺伝子に異常を認めた群では認めなかった群に比して生存期間は有意に短かった ($p=0.028$)。以上の結果より、*p16* に異常がみられる膵癌は、生物学的悪性度が高く、*p16* は予後不良の予測マーカーとなりうることが示唆された。

膵癌で比較的頻度の高い遺伝子異常としては、*p16* 以外に *K-ras*、*p53*、*DPC4* などが知られている。膵癌組織においては、*K-ras* 癌遺伝子のコドン12の点突然変異は、75~100%と高頻度に異常が指摘されており¹¹⁻¹⁴、この変異は膵癌の前癌病変であるとされる膵管上皮の過形成においても検出されることから、*K-ras* の点突然変異は膵管上皮の発癌過程のごく早期に出現すると考えられている⁶¹。また、*p53* 癌抑制遺伝子においては、膵癌組織で40~76%の遺伝子変異が報告されている^{15,62}。*p53* 遺伝子に異常が生じるのは、膵癌の発癌過程の後期と推測されており^{62,63}、*p53* に異常のある膵癌では遺伝子異常のないものに比べて予後が不良であるとの報告もある⁶⁴。*p16* に関して、メラノーマ⁶⁵、肺癌⁶⁶、膵癌³³において原発巣と転移巣での *p16* 遺伝子の異常を比較した成績をみると、転移巣のほうが高頻度であったと報告されており、*p16* 遺伝子の異常は *p53* と同様、発癌過程の後期であることが推測される。一方、Wilentz ら⁶⁷は、*p16* 遺伝子の異常は膵癌の前癌病変においてもみられるとしているが、Moskaluk ら⁶⁸によると、*p16* 遺伝子の異常は全例 *K-ras* の変異を伴っており、*K-ras* の異常は *p16* 遺伝子の異常に先行して発生するとしている。また、Dassanayake ら⁶⁹は、*DPC4* の異常は全例 *p16* の異常を伴ってお

り、また、*p53* の異常は *p16* の異常の有無とは無関係であったと報告している。以上より、Wilentz ら⁶⁹は、膵癌の発癌過程においては、*K-ras* の異常に始まり、続いて *p16* の異常が生じ、最後に *p53* や *DPC4* の異常が起こるというモデルを提唱している。今回の検討では、*p16* の遺伝子異常がみられるものはみられないものに比べて有意に腫瘍径が大きく、また予後も不良であり、*p16* の遺伝子異常は膵癌の発癌過程において比較的後期に位置することを臨床病理学的に示唆するものであろう。

当教室では膵癌患者から内視鏡的に採取した純唾液を用いた *K-ras*、*p53* の遺伝子異常に関する検討を行い、臨床応用への有用性を報告してきた⁷⁻¹³。今後、純唾液を用いた *p16* 癌抑制遺伝子の変異やメチル化といった遺伝子異常の検討を行えば、検出感度が高いとはいえないが、膵癌の予後を予測するマーカーの1つとして利用可能であろう。

結 論

60例のヒト膵癌組織材料を用いて、免疫組織学的検討より *p16* 蛋白の発現を検討し、またマイクロダイセクション法により抽出した DNA を用いたホモ接合性欠失、変異、メチル化などの *p16* 遺伝子異常を検索した。さらに、これらの異常の有無と各種臨床病理学的因子とも比較し、以下の知見を得た。

1. ヒト膵癌60例の *p16* の異常は、蛋白発現レベルでは38例 (63%)、遺伝子レベルでは11例 (変異9例、メチル化2例) (18%) でみられた。
2. *p16* の変異がみられた9症例の内訳は、エクソン1が2例、エクソン2が7例とエクソン2でより高頻度であった。また、*p16* の変異がみられたのべ10例の内訳は、ミスセンス突然変異7例、サイレント突然変異2例、下流がストップコドンとなるフレームシフト突然変異1例であり、ナンセンス突然変異は認められなかった。
3. ホモ接合性欠失は認められず、メチル化は検索した35例中免疫染色弱陽性の2例にのみみられた。
4. 臨床病理学的因子との対比では、*p16* 蛋白異常の有無で比較しても、いずれの因子にも明らかな有意差は認めなかったが、*p16* 蛋白異常群では、正常群に比して、腫瘍径が大きい傾向がみられた。
5. 遺伝子レベルの異常の有無では、占拠部位、組織型、臨床病期には有意差は認められなかったが、*p16* 遺伝子異常群は正常群に比して、有意に腫瘍径が大きく、手術後6ヶ月以内に死亡したものが多かった。

以上より、*p16* 異常を有する膵癌は生物学的悪性度が高く、*p16* 異常は膵癌の予後不良の予測マーカーとなりうることが示唆された。

謝 辞

稿を終るに当たり、御指導と御検閲を賜りました恩師澤武紀雄教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、終始直接実験の御指導を賜りました渡邊弘之先生、山口泰志先生をはじめ、全ての教室員の皆様、研究推進員増田麻里殿に深く御礼を申し上げます。また、御助言、御協力をいただきました奈良県立医科大学がんセンター腫瘍病理堤雅弘先生、多数の膵癌症例を御提供くださいました芳珠記念病院検査部松原藤継先生、福井県済生会病院外科浅田康行先生、上海第二軍事医科大学胡育新先生、病理標本を御診断いただきました金沢大学がん研究所腫瘍外科源利成先生、金沢大学第一病理川島篤弘先生に心より感謝の意を表します。

本稿の内容の一部は第59回日本癌学会(1999年、広島)と第96回日本癌

化器病学会総会 (2000年, 新潟) において発表した。

文 献

- 1) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57: 1731-1734, 1997
- 2) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* genes. *Cell* 53: 549-554, 1988
- 3) Smit VTHBM, Boot AJM, Smits AMM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. *KRAS* codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 16: 7773-7782, 1988
- 4) Tada M, Omata M, Ohta M. Clinical application of *ras* gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 100: 233-238, 1991
- 5) Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show *p53* gene mutations. *Am J Pathol* 142: 1534-1543, 1993
- 6) Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN. *K-ras* and *p53* gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 54: 1556-1560, 1994
- 7) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, Satomura Y, Yamakawa O, Motoo Y, Okai T, Takahashi H, Wakabayashi T. Identification of *K-ras* oncogene mutations in the pure pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* 84: 961-965, 1993
- 8) Watanabe H, Sawabu N, Songür Y, Yamaguchi Y, Yamakawa O, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Wakabayashi T. Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* 12: 18-24, 1996
- 9) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T, Tsuji Y, Sawabu N. Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay: a simple method for the determination of the types of point mutations. *Jpn J Cancer Res* 87: 466-474, 1996
- 10) Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, Hu Y-X, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T, Sawabu N. Quantitative determination of *K-ras* mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* 17: 341-347, 1998
- 11) Watanabe H, Ha A, Hu Y-X, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Motoo Y, Okai T, Toya D, Tanaka N, Sawabu N. *K-ras* mutations in duodenal aspirate without secretin stimulation for screening of pancreatic and biliary tract carcinoma. *Cancer* 86: 1441-1448, 1999
- 12) Okai T, Watanabe H, Yamaguchi Y, Mouri I, Motoo Y, Sawabu N. EUS and *K-ras* analysis of pure pancreatic juice collected via a duodenoscope after secretin stimulation for diagnosis of pancreatic mass lesion: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 50: 797-803, 1999
- 13) Yamaguchi Y, Watanabe H, Songür Y, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Detection of mutations of *p53* tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with *K-ras* mutation. *Clin Cancer Res* 5: 1147-1153, 1999
- 14) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996
- 15) Kitagawa M, Higashi H, Jung H-K, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S, Taya Y. The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J* 15: 7060-7069, 1996
- 16) Hannon GJ, Beach D. *p15^{INK4B}* is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261, 1994
- 17) Hirai H, Roussel MF, Kato J, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel *INK4* proteins, *p19* and *p18*, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases *CDK4* and *CDK6*. *Mol Cell Biol* 15: 2672-2681, 1995
- 18) 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
- 19) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS III, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994
- 20) 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
- 21) 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
- 22) Giani C, Finocchiaro G. Mutation rate of the *CDKN2* gene in malignant gliomas. *Cancer Res* 54: 6338-6339, 1994
- 23) Lo K-W, Huang DP, Lau K-M. *p16* gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 55: 2039-2043, 1995
- 24) Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, Hanai S, Suzuki H, Hori M, Fukao K, Miwa M, Uchida K. Mutations of *p16^{ink4}/CDKN2* and *p15^{ink4B}/MTS2* genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 55: 2756-2760, 1995
- 25) Xiao S, Li D, Corson JM, Vijg J, Fletcher JA. Codeletion of *p15* and *p16* genes in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 55: 2968-2971, 1995
- 26) Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Kimura T, Harada Y, Sugimura T, Terada M. Mutation frequency of the *p16/CDKN2* gene in primary cancers in the upper digestive tract. *Cancer Res* 55: 3421-3423, 1995
- 27) Monzon J, Liu L, Brill H, Goldstein AM, Tucker MA, From L, McLaughlin J, Hogg D, Lassam NJ. *CDKN2A* mutations in multiple primary melanomas. *N Engl J Med* 338: 879-887, 1998
- 28) 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. *Nature Genet*

8: 27-32, 1994

- 29) Naumann M, Savitskaia N, Eilert C, Schramm A, Kalthoff H, Schmiegel W. Frequent codeletion of *p16/MTS1* and *p15/MTS2* and genetic alterations in *p16/MTS1* in pancreatic tumors. *Gastroenterology* 110: 1215-1224, 1996
- 30) Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57: 3126-3130, 1997
- 31) Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, Kisker O, Wells SA, Jr., Goodfellow PJ. Frequent mutations of *CDKN2* in primary pancreatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 14: 189-195, 1995
- 32) Huang L, Goodrow TL, Zhang S-Y, Klein-Szanto AJP, Chang H, Ruggeri BA. Deletion and mutation analyses of the *p16/MTS-1* tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res* 56: 1137-1141, 1996
- 33) Sugimoto Y, Morita R, Hikiji K, Imura G, Ogata Y, Yasuda D, Kono A, Iguchi H. Alteration of *CDKN2A* gene in pancreatic cancers: Is it a late event in the progression of pancreatic cancer? *Int J Oncol* 13: 669-676, 1998
- 34) Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa J-PJ, Hruban RH, Goggins M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 60: 1835-1839, 2000
- 35) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 118-126, 1985
- 36) Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr., Tucker MA, Dracopoli NC. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet* 8: 15-21, 1994
- 37) Okajima E, Fukuda T, Okita S, Tsutsumi M, Hirao Y, Okajima E, Konishi Y. Infrequent somatic alteration of p16/MST1 in human primary superficial bladder cancers. *Cancer Lett* 203: 227-231, 1996
- 38) 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 USA* 86: 2766-2770, 1989
- 39) Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the *p16/CDKN2* tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55: 4531-4535, 1995
- 40) Chaubert P, Guillou L, Kurt A-M, Bertholet M-M, Metthez G, Leisinger H-J, Bosman F, Shaw P. Frequent *p16^{INK4} (MST1)* gene inactivation in testicular germ cell tumors. *Am J Pathol* 151: 859-865, 1997
- 41) 膵癌取扱い規約検討委員会. 膵癌取扱い規約, 第4版, 日本膵臓学会編, 金原出版, 東京, 1993
- 42) Hu Y-X, Watanabe H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Ha A, Okai T, Sawabu N. Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 3: 1473-1477, 1997
- 43) Matsuda Y, Ichida T, Matsuzawa J, Sugimura K, Asakura H. *p16^{INK4}* is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 116: 394-400, 1999
- 44) Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258: 424-429, 1992
- 45) Pollock PM, Pearson JV, Hayward NK. Compilation of somatic mutations of the *CDKN2* gene in human cancers: non-random distribution of base substitutions. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 77-88, 1996
- 46) Sharpless NE, DePinho RA. The *INK4A/ARF* locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9: 22-30, 1999
- 47) Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213, 1986
- 48) Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* 21: 163-167, 1999
- 49) Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826, 1996
- 50) 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. *Nature Med* 1: 686-692, 1995
- 51) Maesawa C, Tamura G, Nishizuka S, Ogasawara S, Ishida K, Terashima M, Sakata K, Sato N, Saito K, Satodate R. Inactivation of the *CDKN2* gene by homozygous deletion and *de Novo* methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 3875-3878, 1996
- 52) Herman JG, Civin CI, Issa J-PJ, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57: 837-841, 1997
- 53) Muscarella P, Melvin WS, Fisher WE, Foor J, Ellison EC, Herman JG, Schirmer WJ, Hitchcock CL, DeYoung BR, Weghorst CM. Genetic alterations in gastrinomas and nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors: an analysis of *p16/MTS1* tumor suppressor gene inactivation. *Cancer Res* 58: 237-240, 1998
- 54) Zhang S-J, Endo S, Ichikawa T, Washiyama K, Kumanishi T. Frequent deletion and 5' CpG island methylation of the *p16* gene in primary malignant lymphoma of the brain. *Cancer Res* 58: 1231-1237, 1998
- 55) Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of *K-ras* mutations with *p16* methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 116: 1063-1071, 1999
- 56) Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A. The *H-cadherin (CDH13)* gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 103: 96-101, 1998
- 57) Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa J-PJ, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF,

- Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6870-6875, 1998
- 58) Lapidus RG, Nass SJ, Butash KA, Parl FF, Weitzman SA, Graff JG, Herman JG, Davidson NE. Mapping of ER gene CpG island methylation by methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 58: 2515-2519, 1998
- 59) Takita J, Hayashi Y, Nakajima T, Adachi J, Tanaka T, Yamaguchi N, Ogawa Y, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J. The *p16* (*CDKN2A*) gene is involved in the growth of neuroblastoma cells and its expression is associated with prognosis of neuroblastoma patients. *Oncogene* 17: 3137-3143, 1998
- 60) Kawabuchi B, Moriyama S, Hironaka M, Fujii T, Koike M, Moriyama H, Nishimura Y, Mizuno S, Fukayama M. *p16* inactivation in small-sized lung adenocarcinoma: its association with poor prognosis. *Int J Cancer* 84: 49-53, 1999
- 61) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent *c-Ki-ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 53: 953-956, 1993
- 62) DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, Cameron JL, Offerhaus GJA. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 101: 684-688, 1994
- 63) Hameed M, Marrero AM, Conlon KC, Brennan MF, Klimstra DS. Expression of p53 nucleophosphoprotein in *in situ* pancreatic ductal adenocarcinoma: an immunohistochemical analysis of 100 cases. *Lab Invest* 70: 132A, 1994
- 64) Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Yaegashi S, Konishi Y, Sekiya T. Association of p53 gene mutations with short survival in pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 86: 174-181, 1995
- 65) Reed JA, Loganzo F, Jr., Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, Albino AP. 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
- 66) Okamoto A, Hussain SP, Hagiwara K, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ, Serrano M, Hannon GJ, Shiseki M, Zariwala M, Xiong Y, Beach DH, Yokota J, Harris CC. 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
- 67) Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJA, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Inactivation of the *p16* (*INK4A*) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res* 58: 4740-4744, 1998
- 68) Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. *p16* and *K-ras* mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 57: 2140-2143, 1997
- 69) Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of *Dpc4* in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that *DPC4* inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60: 2002-2006, 2000

Abnormalities of the *p16* Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Carcinoma ; Comparison with Clinicopathological Parameters Koushiro Ohtsubo, Department of Internal Medicine and Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 921-8044 – J. Juzen Med Soc., **110**, 52 – 64 (2001)

Key words *p16*, pancreatic carcinoma, immunohistochemical staining, mutation, hypermethylation

Abstract

Abnormalities of the tumor suppressor gene *p16* have been reported in a variety of human tumors, but in pancreatic carcinoma (PC) such reports are rare except for cancer cell lines, and moreover, the clinicopathological significance of this remains unknown. Therefore, we compared abnormalities of *p16* alterations with clinicopathological parameters in order to elucidate their significance. We investigated the expression of p16 in 60 PC by immunohistochemistry using a monoclonal antibody against p16 protein: clone G175-405. Nuclear staining of more than 5% of PC cells was regarded as immunoreactive positive. Of these, if the intensity of immunostaining was as strong as that of the internal control, the immunostaining was determined as strongly positive, and if the intensity of immunostaining was weaker than that of the internal control, the immunostaining was determined as weakly positive. In addition, DNA extracted from the microdissected PC tissues was analyzed for genetic alterations of the *p16* gene using polymerase chain reaction, single strand conformation polymorphism, DNA sequencing, and hypermethylation using restriction enzyme. In the immunohistochemical study, expression of the p16 protein was strongly positive in 22 (37%) cases of PC, weakly positive in 24 (40%), and negative in 14 (23%). In contrast, *p16* mutations were recognized in 9 (15%) of 60 cases of PC. The incidence of *p16* mutations was 2 (9%) of 22 cases of PC with strongly positive staining, 4 (17%) of 24 with weakly positive, and 3 (21%) of 14 with negative. Hypermethylation of *p16* was detected in the 2 PC cases with weakly positive staining, although there were no PC cases with homozygous deletion. Compared with the clinicopathological parameters, there was no significant correlation between the expression of p16 protein and any clinicopathological parameter. However in the cases of PC with decreased expression of p16 protein, there was a tendency that the tumor size of PC was larger than that of PC with normal expression of p16 protein. In contrast, in the cases of PC with *p16* genetic alterations, the tumor size of PC was significantly larger and the survival period was significantly shorter than those of PC with intact *p16* gene ($p < 0.05$), although there was no correlation between *p16* genetic alterations and tumor location, histological grade or clinical stage. These findings suggest that *p16* alterations can play an important role in the aggressiveness of PC.