

A Clinical Study of p53 Protein Expression and Proliferative Activity of Primary Non-small Cell Lung Cancers

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/2297/8458

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

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

家 接 健 一

原発性非小細胞肺癌193症例において p53 蛋白の発現をモノクローナル抗体 (DO-7) を用いて検出し, また腫瘍の増殖能を反映する増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) を同様にモノクローナル抗体 (PC10) を用いて標識率を算出し, 臨床的背景因子との相関について検討した. p53 蛋白発現陽性は193例中97例 (50%) に認められた. PCNA 標識率は193例中, 176例で測定可能であり, 全体で $38.4 \pm 24.7\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であった. p53 蛋白発現陽性例では, PCNA 標識率が $47.1 \pm 25.2\%$ と陰性例の $29.3 \pm 20.7\%$ に比べ有意に高かった ($p < 0.005$). p53 蛋白発現陽性率は, 男性 (54.4%), N1~3 症例 (63.2%), M1 例 (69.6%) で, それぞれ女性 (37.0%), N0 (43.2%), M0 (47.7%) に比較し有意に高かった ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). 病期別では, p53 蛋白発現陽性率が I 期 41.0%, II 期 52.6%, III A 期 53.5%, III B 期 87.5%, IV 期 69.6% であり, ほぼ病期の進行とともに発現率が高くなった. また, T 因子別では, p53 蛋白発現陽性率が T1: 43.8%, T2: 50.5%, T3: 48.0%, T4: 91.0% であり, ほぼ T 因子の進行とともに陽性率が高くなった. PCNA 標識率は, 扁平上皮癌で $43.4 \pm 26.1\%$ と腺癌 $33.0 \pm 22.0\%$ に比べ有意に高かった ($p < 0.05$). 病期別では, PCNA 標識率が I 期 $32.7 \pm 20.1\%$, II 期 $49.8 \pm 32.2\%$, III A 期 $36.1 \pm 23.6\%$, III B 期 $53.9 \pm 21.3\%$, IV 期 $53.6 \pm 29.4\%$ であり, ほぼ病期の進行とともに標識率が高くなった. N 因子では, PCNA 標識率が N0: $34.6 \pm 22.7\%$ に対し N1~3: $45.2 \pm 26.8\%$ と有意に高かった ($p < 0.05$). M 因子では, PCNA 標識率が M0: $36.4 \pm 23.5\%$ に対し M1: $53.6 \pm 29.4\%$ と有意に高かった ($p < 0.001$). もっとも治療予後良好な I 期 92例についての検討では, p53 蛋白発現陽性例の PCNA 標識率は $38.7 \pm 23.0\%$ と陰性例の標識率 $28.4 \pm 16.9\%$ に比べ有意に高かった ($p < 0.05$). さらに, I 期症例のうち腺癌では, PCNA 標識率は p53 蛋白発現陽性例 ($43.9 \pm 21.3\%$) が陰性例 ($26.5 \pm 14.2\%$) より有意に高かった ($p < 0.01$). また, I 期症例において, 術前の癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 値の高い症例 ($> 5 \text{ ng/ml}$) は PCNA 標識率が $38.1 \pm 9.2\%$ であり CEA 値が正常の症例 ($\leq 5 \text{ ng/ml}$) の $26.7 \pm 18.7\%$ に比べ有意に高かった ($p < 0.05$). 次に転移リンパ節20例の検討では, 19例で原発巣と転移巣の p53 蛋白発現の有無が一致した. PCNA 標識率は, 原発巣が $38.4 \pm 23.8\%$ に対し転移巣では $54.0 \pm 25.7\%$ であり, 有意に高かった ($p < 0.05$). 生存率との相関をみると, p53 蛋白発現陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であり ($p < 0.01$), 組織型別では腺癌において p53 蛋白発現陽性例が有意に予後不良であった ($p < 0.05$). また, PCNA 標識率40%未満を低値群, PCNA 標識率40%以上を高値群とした場合の生存率の検討では, PCNA 標識率高値群は, 低値群に比べ有意に予後不良であった ($p < 0.05$). これを組織型別にみると, 扁平上皮癌において PCNA 標識率高値群が低値群に比べ有意に予後不良であった ($p < 0.005$). I 期においても PCNA 標識率高値群が低値群に比べ有意に予後不良であり ($p < 0.05$), さらに核 DNA 量を測定し核 DNA 二倍体群および DNA 異数倍体群をそれぞれ PCNA 標識率低値群, 高値群に細分した結果, DNA 異数倍体群において PCNA 標識率高値群が低値群より予後不良の傾向を認めた ($p = 0.08$). 以上の結果から, 原発性非小細胞肺癌の p53 蛋白発現陽性例は腫瘍増殖能が高く, また, p53 蛋白発現陽性例, PCNA 標識率高値群の予後は不良であり予後因子となりうると考えられた.

Key words non-small cell lung cancer, immunohistochemical staining, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, prognostic factor

肺癌は比較的小径であっても発見時には, すでにリンパ節あるいは遠隔臓器への転移を認める場合が多い. また, たとえ手術所見, 病理組織学的所見から根治切除されたと考えられる I 期肺癌であっても, 不良な予後を呈する場合が少なくない. これは, 臨床で用いられる病期分類が必ずしも予後と相関しない場合があることを意味している. 病期を決定する因子である癌

の大きさ, リンパ節転移の有無, 遠隔転移の有無のみでは説明できない予後因子が他にあるものと推測され, その一つとして遺伝子変異, 腫瘍増殖能や転移能などの細胞生物学的特性が重要な意義を有しているものと考えられる. 著者は, 肺癌の分子生物学レベルでの特性と臨床経過との相関を解明できないかと考え本研究を行った.

平成5年5月12日受付, 平成5年7月1日受理

Abbreviations: BrdU, bromodeoxyuridine; CEA, carcinoembryonic antigen; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; LI, labeling index; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; 3 生率, 3 年生存率; 5 生率, 5 年生存率; 10 生率, 10 年生存率

癌関連遺伝子は癌遺伝子と癌抑制遺伝子に大別され、なかでも p53 遺伝子は癌抑制遺伝子の一つとして近年注目されている。p53 遺伝子はもとより、DNA 型腫瘍ウイルスである SV40 の T 抗原 (large T antigen) と結合するリン酸蛋白質 p53 をコードする遺伝子として分離され¹²⁾、1989年頃から癌抑制遺伝子として認識されるようになり³⁾多くの研究がなされてきた。その結果、ヒト腫瘍においても最も高頻度に異常が認められる遺伝子であることが分かってきた^{4)~10)}。また肺癌においては、フローサイトメトリーを用いた研究で p53 遺伝子異常による p53 蛋白発現例は腫瘍増殖能が高いと報告され¹¹⁾、そのことが高い転移能や予後不良化に関与する可能性があると思われ。さらに胃癌¹²⁾、乳癌¹³⁾等で p53 蛋白発現例の予後は不良であったとの報告がなされているが、肺癌についてこのような検討がなされた報告は極めて少ない。本研究は、原発性非小細胞肺癌の p53 蛋白発現陽性率および腫瘍増殖能の指標である増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の標識率をモノクローナル抗体を用いて評価し、さらに転移リンパ節についても染色を行い、病理組織学的意義、さらには予後因子となりうるかを検討した。

対象および方法

I. 対象

1978年1月から1989年12月までに金沢大学医学部第一外科学教室で外科的治療を行った原発性非小細胞肺癌症例のうち193例を対象とした。男性147例、女性46例であり、平均年齢は63.4歳であった。肺癌取扱い規約¹⁴⁾による病期分類の内訳は、I期100例、II期19例、III期51例(III A 期43例、III B 期8例)、IV期23例であり、組織型別では腺癌98例、扁平上皮癌95例であった。

II. パラフィン包埋ブロックの選択

切除標本は、金沢大学医学部附属病院中央検査部病理部においてパラフィン包埋され保存されているものを使用した。パラフィン包埋ブロックは、腫瘍が大きい症例では腫瘍辺縁部を選択した。また、癌転移陽性と診断されたリンパ節のパラフィン包埋ブロックは、III A 期症例20例の縦隔内リンパ節を選択した。

III. 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、および転移陽性リンパ節を3 μ mの厚さに薄切し、0.02% ポリ-L-リジンでスライドに付着させ、100%キシレンで5分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%、90%、70%、45%のエチルアルコールにて各5分間脱水し、その後20分間室温にて0.3% 過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを阻害した。次に、10%ウサギ正常血清(ニチレイ、東京)を用いてブロッキングを行ない、リン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)にて洗浄し、抗 p53 蛋白抗体(DO-7)(Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK)を蒸留水で50倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。続いて、PBSにて5分間、3回洗浄後、ビオチン標識ウサギ抗マウス IgG+IgA+IgM (H+L)(ニチレイ)を用いて室温にて30分間反応させ、PBSで5分間、3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ)で室温にて30分間反応させた。PBSで5分間、3回洗浄後、四塩酸 3, 3'-ジアミノベンジン(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)(協和メデックス、東京)で室温にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約3分

間の反応で発色させ、メチルグリーン液(Merck, Darmstadt, Germany)にて核染色を行った。最後に、100%キシレンにより、5分間、3回の透徹を行った。

IV. p53 蛋白発現の検出

免疫染色を行ったスライドガラスを顕微鏡にて全視野を観察し、p53 蛋白発現の有無を判定した。p53 蛋白発現陽性と判断した核は、ほぼ均一に褐色に染色され、染色の濃淡の違いを認めたと、定性的に判定し、観察した癌組織の核が一部分でも染色されていた場合をp53 蛋白発現陽性例と判定した。

V. PCNA 免疫組織染色法

パラフィン包埋された癌組織、および転移陽性リンパ節を3 μ mの厚さに薄切し、0.02% ポリ-L-リジンでスライドに付着させ、100%キシレンで5分間、3回の脱パラフィンを行った後、100%、90%、70%、45%のエチルアルコールにて各5分間脱水し、その後20分間室温にて0.3% 過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを阻害した。次に、10%ウサギ正常血清(ニチレイ)を用いてブロッキングを行い、PBSにて洗浄し、抗 PCNA マウス IgG 抗体(PC10)(Dako, Glostrup, Denmark)を蒸留水で20倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。PBSにて5分間、3回洗浄後、ビオチン標識ウサギ抗マウス IgG+IgA+IgM (H+L)(ニチレイ)を用いて室温にて30分間反応させ PBSで5分間、3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ)で室温にて30分間反応させた。PBSで5分間、3回洗浄後、DAB で室温にて、顕微鏡で発色状態を確認しながら約3分間の反応で発色させ、メチルグリーン液(Merck)にて核染色を行った。最後に、100%キシレンにより、5分間、3回の透徹を行った。

VI. PCNA 標識率の算出

PCNA 免疫組織染色陽性の核を定性的に判定した。核は均一あるいは小斑点状に染色された。PCNA 標識率(PCNA labeling index, PCNA-LI)は、顕微鏡下に腫瘍辺縁部の任意の視野を選び、癌細胞約1000個に対する陽性核数の割合(%)を算出した。また、陽性率5%未満の場合は染色不良と判定し、検討から除外した。

VII. フローサイトメトリーによる核 DNA 量の測定

癌組織を包埋したパラフィンブロックを50 μ mの厚さに8~10枚切り、キシレンにて1時間、2回の脱パラフィンを行った後、100%、96%、70%、50%のエチルアルコールにて各30分、脱水を行った。次に蒸留水で2時間の再水和後、0.25% トリプシン(Sigma, St. Louis, U.S.A)を含むクエン酸緩衝液(3mM クエン酸三ナトリウム(和光)、0.1% ノニデット P-40(Sigma)、1.5mM スペルミン四塩酸塩(Sigma)、0.5mM トリスアミノメタン(Sigma)、pH 7.60) 3mlにて一晩、37℃の温度下にて保温した。次に40 μ mのナイロンメッシュで濾過、遠心を行い、上清除去後、遊離細胞を作成した。次に、細胞浮遊液 200 μ l に対し溶液 A(トリプシン(Difko, Detroit, U.S.A.) 15mg、クエン酸緩衝液 500ml) 1.5ml を加え、10分間水冷した後、溶液 B(トリプシンインヒビター(Sigma) 250mg、リボヌクレアーゼ A(Sigma) 50mg、クエン酸緩衝液 500ml) 1.5ml を加え、10分間水冷した。さらに、溶液 C(ヨウ化プロビジウム 208mg、スペルミン四塩酸塩 580mg、クエン酸緩衝液 500ml) 1.5ml を加え、10分間水冷し、核 DNA の染色を行った。核 DNA 量は、フローサイトメトリー FACS-CAN (Becton-Dickinson, New Jersey, U.S.A.)を用いて、約20,000個の細胞を測定し、DNA ヒストグ

ラムに表示した。その際、腫瘍内介在正常細胞(リンパ球)や腫瘍周辺正常細胞を内部標準とし、その正常細胞群の示したチャンネル数(channel number)で腫瘍細胞の示したチャンネル数を除した値をDNA指標とした。DNAヒストグラムにて G_0G_1 ピークが単一の場合(DNA指標=1.00)をDNA二倍体(DNA diploid pattern)、 G_0G_1 ピークが複数存在する場合(DNA指標 \neq 1.00)をDNA異数倍体(DNA aneuploid pattern)と判定した。また、4倍体領域(DNA指標=2.00前後)は、正常細胞群の G_2M 期の細胞を混入すると考えられるが、全体の12%以上の細胞を認める場合、DNA異数倍体のピークが存在すると判断した。なお、測定精度の指標として G_0G_1 ピークの変動係数が10%以上の症例は測定不能と判断し対象外とした。

Ⅷ. 統計学的処理

えられた数値はすべて平均値±標準偏差(standard deviation, SD)で示した。平均値の有意差検定には、2群間ではMann-Whitney U検定を用い、3群間以上では、Kruskal-Wallis検定を用いた。また、肺癌原発巣とリンパ節転移巣のPCNA標識率の平均値の差の検定には、Wilcoxonの符号付順位和検定を用いた。離散量に対しては、 χ^2 検定を用いた。生存率の検討は治癒切除¹⁾の行われた167例のみについて行い、相対的非治癒切除(I期3例)、絶対的非治癒切除(IV期23例)は検討から除外した。生存率の算出はKaplan-Meier法を用い、その有意差検定は一般化Wilcoxon法によった。いずれも、p値が5%未満を有意差ありとした。

成 績

Ⅰ. p53 蛋白に対する免疫組織染色

1. 正常肺組織

癌細胞を観察するにあたり、周囲の正常肺胞組織、気管支も同時に観察を行ったが、すべて核染色はされずp53蛋白発現陰性であった(図1, A)。

2. 肺癌組織

扁平上皮癌のp53免疫染色陽性例を示す(図2)。同一腫瘍内でも陽性核と陰性核が混在しており、陽性核のなかでも染色の濃淡の違いが見られた。また、陽性核が腫瘍全体に散在する 경우가多数であったが、腫瘍の辺縁に局在している部位もあった(図2, A)。

Ⅱ. PCNA に対する免疫組織染色

193例の対象のうち、17例(8.8%)は染色不良と判定し対象から除外し、176例について検討した。また、PCNA標識率40%未満をPCNA低値群、PCNA標識率40%以上をPCNA高値群とした。

1. 正常肺組織

癌細胞を観察するにあたり、周囲の正常肺胞組織、気管支も同時に観察を行ったが、すべてPCNA標識率は5%未満であった(図1, B)。

2. 肺癌組織

高分化型腺癌(図3, A)、未分化型扁平上皮癌(図3, B)の染色例を示す。PCNA陽性核は、扁平上皮癌、腺癌ともに腫瘍内に一様に散在し、規則性は認めなかった。また、個々の癌細胞を観察すると核全体が染色されるものや、核内に顆粒状に染色されるものがあり、いずれも陽性と判断した。

Ⅲ. DNA ヒストグラムによる核 DNA 量の分類

DNA二倍体(DNA: diptoid pattern)、およびDNA異数倍体

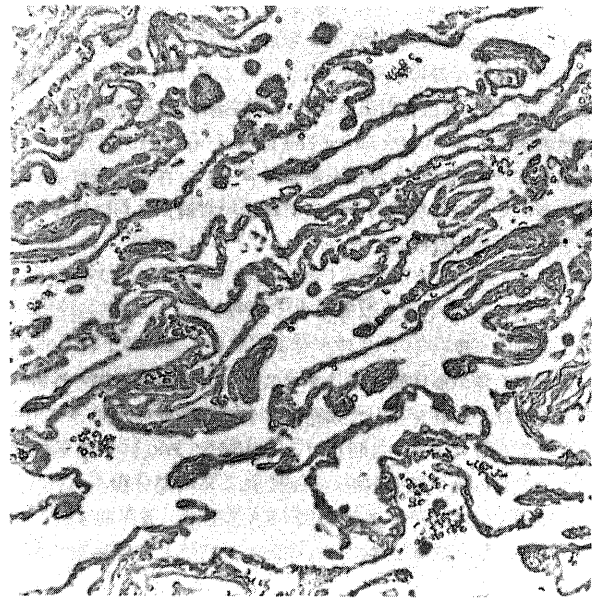
(DNA aneuploid pattern)例のDNAヒストグラムを示す(図4)。193例の対象のうち176例が測定可能であり、58例をDNA二倍体、118例をDNA異数倍体と判定した。

Ⅳ. p53 蛋白免疫組織染色性と PCNA 標識率の相関(図5)

p53陰性例のPCNA標識率が $29.3 \pm 20.7\%$ であるのに対しp53陽性例は $47.1 \pm 25.2\%$ と有意にPCNA標識率が高かった($p < 0.005$)。

Ⅴ. 各臨床背景因子別にみた p53 蛋白発現率の解析(表1)

性別では、男性54.4%、女性37.0%と有意に男性に陽性例を



A

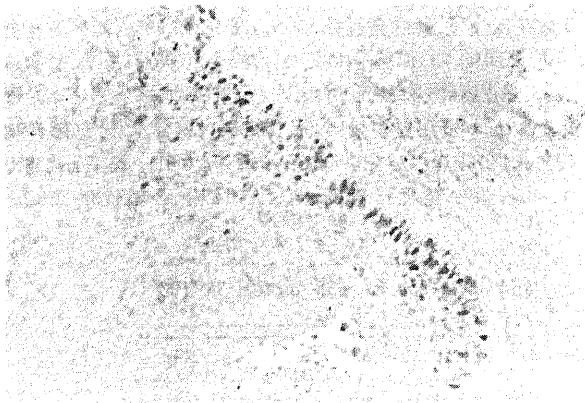


B

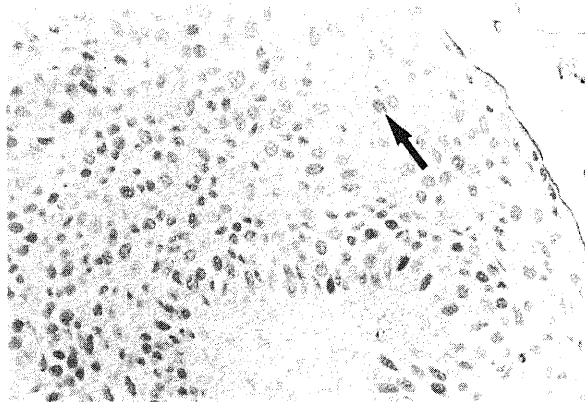
Fig. 1. Photomicrograph showing immunohistochemical staining of normal alveolar cells. A, stained by anti-p53 protein monoclonal antibody; B, stained by anti-PCNA monoclonal antibody. Normal alveolar cells were not stained by anti-p53 protein monoclonal antibody or anti-PCNA monoclonal antibody (A, B, $\times 200$).

多く認めた ($p < 0.05$). 組織別では、腺癌 43.9% に比べ扁平上皮癌では 56.8% と陽性例を多く認めたが有意差はなかった. また、分化度では、高分化型 46.4%, 中分化型 50.0%, 低分化型 60.0% と分化度が低くなるにつれ陽性率が高くなったが有意差はなかった. また、病期別では、Ⅰ期 41.0%, Ⅱ期 52.6%, ⅢA 期 53.5%, ⅢB 期 87.5%, Ⅳ期 69.6% と、ほぼ病期が進行

するにつれ陽性率が高くなった. さらに、T, N, M 因子別に検討すると、T 因子は T1: 43.8%, T2: 50.5%, T3: 48.0%, T4: 91.0% と、ほぼ T 因子が進行するにつれ陽性率が高くなった. N 因子は N0: 43.2%, N1~3: 63.2% であり、リンパ節転移陽性例の方が陽性率が高かった ($p < 0.01$). M 因子は M0: 47.7% , M1: 69.6% と M1 の方が陽性率が高かった

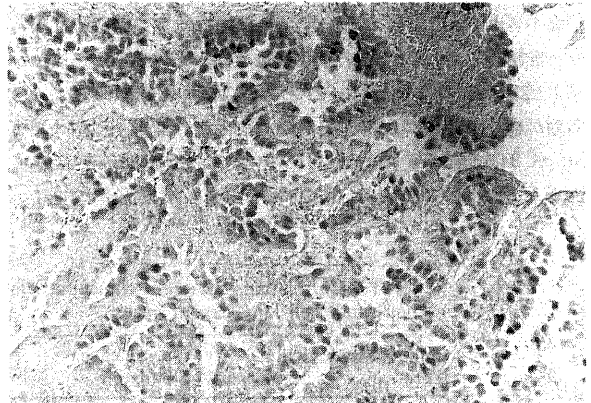


A

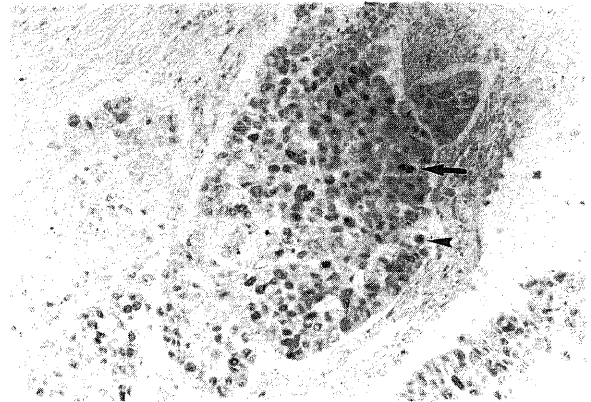


B

Fig. 2. Photomicrograph showing immunohistochemical staining of epidermoid carcinoma using anti-p53 protein monoclonal antibody. A, a case of carcinoma in which p53 protein positive nuclei were located peripherally. B, p53 protein positive nuclei were stained homogeneously (arrow) (A, $\times 80$; B, $\times 200$).



A



B

Fig. 3. Photomicrograph showing immunohistochemical staining of well differentiated adenocarcinoma (A) and poorly differentiated epidermoid carcinoma (B) using anti-PCNA monoclonal antibody. Variable positive staining patterns were observed, diffuse pattern (B, arrow) and granular pattern (B, arrowhead) (A, B, $\times 200$).

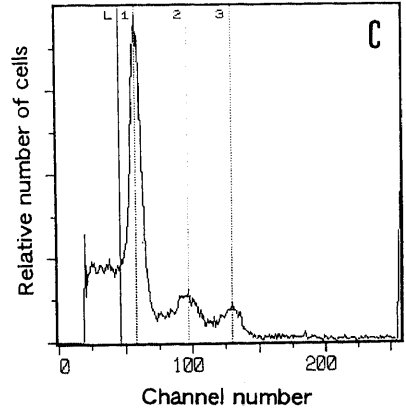
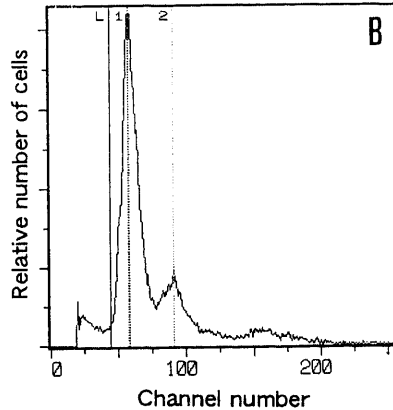
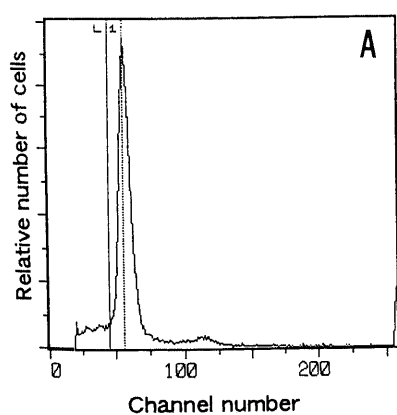


Fig. 4. Histograms showing two ploidy patterns. A, showing one diploid cell population (diploid pattern); B, showing one aneuploid cell population (aneuploid pattern); C, showing more than one aneuploid cell population (aneuploid pattern).

($p < 0.05$). 術前に RIA 法で測定された血中の癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 値別の検討 (132 例) では, 陽性率に有意差を認めず, また, 核 DNA 量別の検討 (176 例) でも陽性率に有意差を認めなかった.

VI. 各臨床背景因子別にみた PCNA 標識率の解析 (表 2)

性別, 年齢別 (60歳以下, 61歳以上) では, PCNA 標識率に有意差を認めなかった. 組織型別では, 扁平上皮癌が $43.4 \pm 26.1\%$ であり, 腺癌の $33.0 \pm 22.0\%$ より有意に PCNA 標識率が高かった ($p < 0.05$). 組織分化度の間には有意差を認めなかった. 病期別では, I 期 $32.7 \pm 20.1\%$, II 期 $49.8 \pm 32.2\%$, III A 期 $36.1 \pm 23.6\%$, III B 期 $53.9 \pm 21.3\%$, IV 期 $53.6 \pm 29.4\%$ と, ほぼ病期が進行するにつれ陽性率が高くなった. N 因子について, N0 が $34.6 \pm 22.7\%$ に対し N1~3 は $45.2 \pm 26.8\%$ と有意に PCNA 標識率が高かった ($p < 0.05$). また, M 因子について,

M0 が $36.4 \pm 23.5\%$ に対し M1 は $53.6 \pm 29.4\%$ であり, M1 の方が PCNA 標識率が高かった ($p < 0.001$). 術前 CEA 値別 (121例), 核 DNA 量別の検討 (160例) では, PCNA 標識率に有意差を認めなかった.

VII. I 期肺癌における p53 蛋白発現率, および PCNA 標識率の解析 (表 3)

肺癌の中でもっとも予後良好な I 期肺癌 92 例について, p53 蛋白発現陽性率および PCNA 標識率の検討を行った. PCNA 標識率は p53 蛋白発現陰性例 ($28.4 \pm 16.9\%$) より陽性例 ($38.7 \pm 23.0\%$) の方が有意に高かった ($p < 0.05$). さらに, 腺癌と扁平上皮癌に分けて検討したところ, 腺癌において, PCNA 標識率は p53 蛋白発現陰性例 ($26.5 \pm 14.2\%$) に比べ陽性例 ($43.9 \pm 21.3\%$) の方が有意に高かった ($p < 0.01$). 扁平上皮癌では, p53 蛋白発現陰性例 ($30.4 \pm 19.3\%$) と陽性例 ($36.2 \pm$

Table 1. Correlation between clinicopathological factors and incidence of p53 protein in 193 non-small cell lung cancer cases

Clinicopathological factors	No. of cases tested	No. of cases (%)	Ratio of p53 protein-positive cases (%)	p value
Sex	193			
Male		147 (76.2)	54.4] $p < 0.05^*$
Female		46 (23.8)	37.0	
Age (y)	193			
≤ 60		61 (31.6)	54.1] NS*
≥ 61		132 (68.4)	48.5	
Histology	193			
Adenoca.		98 (47.7)	43.9] NS*
Epidermoid ca.		95 (52.3)	56.8	
Differentiation	193			
Well		63 (32.6)	46.4] NS*
Moderately		83 (43.0)	50.0	
Poorly		47 (24.4)	60.0	
Stage	193			
I		100 (51.8)	41.0] $p < 0.05^*$
II		19 (9.8)	52.6	
III A		43 (22.3)	53.5	
III B		8 (4.1)	87.5	
IV		23 (11.9)	69.6	
T factor	193			
T1		64 (33.2)	43.8] $p < 0.05^*$
T2		93 (48.2)	50.5	
T3		25 (13.0)	48.0	
T4		11 (5.7)	91.0	
N factor	193			
N0		125 (64.8)	43.2] $p < 0.01^*$
N1~3		68 (35.2)	63.2	
M factor	193			
M0		170 (88.1)	47.7] $p < 0.05^*$
M1		23 (11.9)	69.6	
CEA (ng/ml)	132			
≤ 5		106 (80.3)	54.7] NS*
> 5		26 (19.7)	46.2	
DNA ploidy pattern	176			
Diploid		58 (33.0)	55.2] NS*
Aneuploid		118 (67.0)	45.8	

p53 protein-positive ratio of all cases ($n=193$) is 50%. Preoperative values of serum CEA were measured in 132 cases. DNA ploidy patterns were able to be evaluated in 176 cases. *Chi-square test. NS, not significant; adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma.

23.7%) に PCNA 標識率の有意差を認めなかった。核 DNA 量別の検討 (91例) では、PCNA 標識率に有意差を認めなかった。また、I 期症例92例のうち術前 CEA 値を測定したのは64例であり、この64例の検討では、CEA 値が 5ng/ml より高い症例で PCNA 標識率が 38.1±9.2% であり、CEA 値が 5ng/ml 以下の症例の PCNA 標識率 26.7±18.7% に比べ有意に高かった (p<0.05)。

Ⅶ. 原発巣と転移リンパ節における p53 蛋白発現の解析 (表 4)

Ⅲ A 期症例のうち染色可能であった20例の原発巣および転移リンパ節の検討を行った。原発巣は 14/20 例 (70%) が p53 陽性例、転移巣では 13/20 例 (65%) が陽性であった。原発巣、

転移巣とも陰性例が 6 例 (30%)、両者とも陽性例が13例 (65%) であった。また、原発巣が陽性で転移巣が陰性であった症例を 1 例認めた。

Ⅸ. 原発巣と転移リンパ節における PCNA 標識率の解析 (図 6)

Ⅲ A 期症例のうち、20例の原発巣および転移リンパ節の PCNA 標識率を検討した。20症例中11例は、原発巣と比較し転移リンパ節の方が PCNA 標識率が高かった。また、ほぼ同様の標識率が 2 例、低下が 7 例であった。原発巣の PCNA 標識率は、38.4±23.8% に対し、転移リンパ節は 54.0±25.7% であり、有意に転移リンパ節の PCNA 標識率が高かった (p<0.05)。

Table 2. Correlation between clinicopathological factors and PCNA-LI in 176 non-small cell lung cancer cases

Clinicopathological factors	No. of cases tested	No. of cases (%)	PCNA-LI (%) ^a	p value
Sex	176			
Male		138 (78.4)	40.1±24.6] NS*
Female		38 (21.5)	32.3±24.3	
Age (y)	176			
≤60		53 (30.1)	35.2±25.7] NS*
≥61		123 (69.9)	39.8±24.3	
Histology	176			
Adenoca.		84 (47.7)	33.0±22.0] p<0.05*
Epidermoid ca.		92 (52.3)	43.4±26.1	
Differentiation	176			
Well		54 (30.7)	36.5±24.9	NS**
Moderately		78 (44.3)	40.7±24.5	
Poorly		44 (25.0)	42.8±26.3	
Stage	176			
I		92 (52.3)	32.7±20.1	p<0.005**
II		18 (10.2)	49.8±32.2	
ⅢA		39 (22.2)	36.1±23.6	
ⅢB		7 (4.0)	53.9±21.3	
IV		20 (11.4)	53.6±29.4	
T factor	176			
T1		56 (32.0)	33.9±22.9	NS**
T2		87 (49.7)	39.3±24.8	
T3		22 (12.6)	41.3±27.1	
T4		10 (5.7)	52.7±24.4	
N factor	176			
N0		113 (64.2)	34.6±22.7] p<0.05*
N1~3		63 (35.8)	45.2±26.8	
M factor	176			
M0		156 (88.6)	36.4±23.5] p<0.001*
M1		20 (11.4)	53.6±29.4	
CEA (ng/ml)	121			
≤5		96 (79.3)	34.1±24.0] NS*
>5		25 (20.7)	38.2±19.6	
DNA ploidy pattern	160			
Diploid		50 (31.3)	35.4±23.9] NS*
Aneuploid		110 (68.8)	39.2±24.3	

PCNA-LIs were able to be evaluated in 176 cases among 193 cases. PCNA-LI of all cases (n=176) is 38.4±24.7%. Preoperative values of serum CEA were measured in 121 cases among 176 cases. DNA ploidy pattern were able to be evaluated in 160 cases among 176 cases. a) Each number of PCNA-LI represents mean±SD. *Mann-Whitney U test. **Kruskal-Wallis test. NS, not significant; adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma; PCNA-LI, PCNA labeling index.

Table 3. Correlation between presence of p53 protein and PCNA-LI in 92 stage I non-small cell lung cancer cases

Parameter	No. of cases tested	Presence of p53 protein	No. of cases (%)	PCNA-LI (%) ^{a)}	p value
All	92	- ^{b)} + ^{c)}	54 (58.7) 38 (41.3)	28.4±16.9 38.7±23.0]	p<0.05*
Adenoca.	39	- +	27 (69.2) 12 (30.8)	26.5±14.2 43.9±21.3]	p<0.01*
Epidermoid ca.	53	- +	27 (50.9) 26 (49.1)	30.4±19.3 36.2±23.7]	NS*
DNA ploidy pattern	91				
Diploid pattern	28	- +	14 (50.0) 14 (50.0)	25.8±15.5 38.6±25.6]	NS*
Aneuploid pattern	68	- +	40 (62.5) 24 (37.5)	29.4±17.4 38.7±21.9]	NS*

a) Each number of PCNA-LI represents mean±SD. b) -, p53 protein-negative. c) +, p53 protein-positive. *Mann-Whitney U test. NS, not significant; adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma; PCNA-LI, PCNA labeling index.

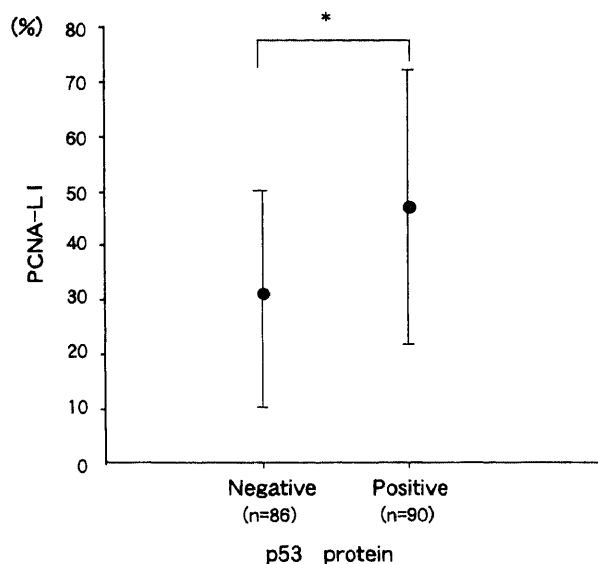


Fig. 5. Comparison of PCNA labeling index between p53 protein positive and negative cases. The expression of p53 protein and PCNA were detected in 176 patients with primary non-small cell lung cancer using monoclonal antibodies. PCNA labeling index (PCNA-LI) was determined as the percentage of PCNA positive cells in about 1,000 cancer cells. Values are expressed as mean±SD. * p<0.005, by Mann-Whitney U test.

X. p53 蛋白発現と生存率の解析

症例全体, I 期, II 期, III 期 (III A + III B 期), さらに各々を組織型別に分け p53 蛋白発現の有無により 3 年生存率 (3 生率), 5 年生存率 (5 生率), 10 年生存率 (10 生率) を算出した (表 5). 症例全体では, p53 蛋白発現陰性例の 3 生率 68%, 5 生率 54%, 10 生率 38% に対し, p53 蛋白発現陽性例の 3 生率 46%,

Table 4. Distribution of p53 protein status in primary tumors and in metastatic lymph nodes of stage III A (n=20)

Distribution of p53 protein status in		No. of cases
Primary tumor	Metastatic lymph node	
- ^{a)}	-	6
-	+ ^{b)}	0
+	-	1
+	+	13

a) -, p53 protein-negative. b) +, p53 protein-positive.

5 生率 35%, 10 生率 26% であり, p53 蛋白発現陽性例の方が有意に予後不良であった (p<0.01) (図 7, A). さらに, 症例を腺癌と扁平上皮癌に分けると, 腺癌では, p53 蛋白発現陰性例の 3 生率 69%, 5 生率 53%, 10 生率 39% に対し, p53 蛋白発現陽性例の 3 生率 39%, 5 生率 32%, 10 生率 17% と p53 蛋白発現陽性例の方が有意に予後不良であった (p<0.05) (図 7, B). また, I 期, II 期, III 期および, それらの組織型別では, p53 蛋白発現陰性例と陽性例の間に有意差は認めなかった.

XI. PCNA 標識率と生存率の解析

症例全体, I 期, II 期, III 期 (III A + III B 期), さらに各々を組織型別に分け PCNA 標識率の低値, 高値群において 3 生率, 5 生率, 10 生率を算出した (表 6). 症例全体では, PCNA 低値群の 3 生率 65%, 5 生率 57%, 10 生率 47% に対し, PCNA 高値群の 3 生率 45%, 5 生率 29%, 10 生率 20% であり PCNA 高値群の方が有意に予後不良であった (p<0.05) (図 8, A). さらに, 腺癌と扁平上皮癌に分けての検討では, 扁平上皮癌では, PCNA 低値群の 3 生率 74%, 5 生率 65%, 10 生率 49% に対し, PCNA 高値群の 3 生率 44%, 5 生率 29%, 10 生率 20% であり PCNA 高値群の方が有意に予後不良であった (p<0.005) (図

Table 5. Comparison of survival rates calculated by the Kaplan-Meier method between p53 protein-positive and negative cases

Stage	Histology	No. of cases examined	Presence of p53 protein	% Survival in years of			p-value*
				3	5	10	
I		97	- ^{a)}	77	63	54] NS
			+ ^{b)}	72	57	50	
	Adenoca.	44	-	83	68	68] NS
			+	67	53	28	
Epidermoid ca.	53	-	72	59	46] NS	
		+	76	62	62		
II		19	-	56	42	21] NS
			+	30	10	0	
	Adenoca.	8	-	50	0	-] NS
			+	0	-	-	
Epidermoid ca.	11	-	60	60	30] NS	
		+	50	17	0		
III		51	-	62	35	12] NS
			+	53	19	0	
	Adenoca.	28	-	50	36	12] NS
			+	33	17	-	
Epidermoid ca.	23	-	60	0	-] NS	
		+	67	19	0		
Total		167	-	68	54	38] p<0.01
			+	46	35	26	
	Adenoca.	80	-	69	53	39] p<0.05
			+	39	32	17	
Epidermoid ca.	87	-	66	56	40] NS	
		+	50	38	30		

For all cases are curatively resected lung cancers of stage I, II, III. a) -, p53 protein-negative. b) +, p53 protein-positive. *Generalized Wilcoxon test. NS, not significant; adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma.

Table 6. Comparison of survival rates calculated by the Kaplan-Meier method between low PCNA-LI (<40%) group and high PCNA-LI (≥40%) group

Stage	Histology	No. of cases examined	PCNA-LI	% Survival in years of			p-value*
				3	5	10	
I		89	L ^{a)}	78	72	64] p<0.05
			H ^{b)}	69	45	38	
	Adenoca.	37	L	80	80	80] NS
			H	77	45	30	
Epidermoid ca.	52	L	78	68	57] NS	
		H	65	45	40		
II		18	L	50	25	0] NS
			H	33	17	0	
	Adenoca.	8	L	40	0	-] NS
			H	0	-	-	
Epidermoid ca.	10	L	0	-	-] NS	
		H	44	22	0		
III		46	L	52	27	14] NS
			H	57	15	-	
	Adenoca.	24	L	35	22	22] NS
			H	14	14	-	
Epidermoid ca.	22	L	5	5	0] NS	
		H	15	15	0		
Total		153	L	65	57	47] p<0.05
			H	45	29	20	
	Adenoca.	69	L	59	50	50] NS
			H	48	30	30	
Epidermoid ca.	84	L	74	65	49] p<0.005	
		H	44	29	20		

For all cases are curatively resected lung cancers of stage I, II, III. a) L, low PCNA-LI (<40%). b) H, high PCNA-LI (≥40%). *Generalized Wilcoxon test. NS, not significant. Adenoca., adenocarcinoma; epidermoid ca., epidermoid carcinoma. PCNA-LI, PCNA labeling index.

8, B). I期の検討では, PCNA 低値群の3生率78%, 5生率72%, 10生率64%に対し, PCNA 高値群の3生率69%, 5生率45%, 10生率38%であり PCNA 高値群の方が有意に予後不良であった ($p < 0.05$) (図8, C). しかし, I期での腺癌, 扁平上皮癌についての検討では, 有意差は認めなかった. また, I期症例のうち DNA 二倍体を PCNA 低値群と PCNA 高値群, および DNA 異数倍体を PCNA 低値群と PCNA 高値群に分けて検討した場合, DNA 異数倍体で, PCNA 高値群の方が PCNA 低値群に比べ, 予後不良の傾向を認めた (図9) ($p = 0.08$). また, II期, III期の PCNA 標識率による予後の検討では, PCNA 低値群と PCNA 高値群に有意差は認めず, さらにII期, III期を組織型別に分けた場合にも PCNA 低値群と PCNA 高値群間に予後の有意差は認めなかった.

考 察

正常細胞から癌細胞へ転化する過程には, 癌関連遺伝子の変異を伴い, 生じた癌細胞には種々の遺伝子変異が蓄積されている. 癌関連遺伝子は, 癌遺伝子と癌抑制遺伝子に分類されている. 前者には, ras 遺伝子群, myc, erb B 等があり, 後者には p53 遺伝子, 網膜芽細胞腫 (Rb) 遺伝子, DCC (deletion in colorectal carcinomas) 遺伝子等があるが, 他に多くの癌関連遺伝子が現在発見されている. なかでも, p53 遺伝子の異常は現在知られている癌関連遺伝子のなかでは最も高頻度に認められ, 食道癌では36%⁴⁾, 大腸癌では46%³⁾, 乳癌では15~30%⁶⁾⁷⁾にみられたと報告されている. p53 遺伝子は, もともと1979年

に初めて DNA 型腫瘍ウイルスである SV40 の T 抗原と結合するリン酸蛋白質 p53 をコードする遺伝子として分離され¹²⁾, 1989年には大腸癌において同定された第17染色体短腕 (17p) の欠失領域に p53 遺伝子が存在することが報告された³⁾. すべての細胞は DNA 合成を行って分裂し, G₁期 (分裂後静止期) → S 期 (合成期) → G₂期 (分裂前静止期) → M 期 (分裂期) → G₁期, または G₀期の周期で増殖するが, p53 遺伝子は細胞の DNA が放射線や紫外線などで傷害を受けたときに p53 蛋白質を誘導し, 細胞を一時的に G₁期に止めることで DNA 複製を停滞させ, DNA 修復酵素が働いて傷害を修復するとされている³⁾. p53 遺伝子には, 野生型 (正常型) と変異型が知られているが, p53 遺伝子に突然変異が生じると, 誘導される p53 蛋白質の半減期は20分から6~7時間となり, さらに p53 蛋白質は熱ショック蛋白質 (hsp 70) と複合体を形成するため¹⁶⁾¹⁷⁾, 変異型 p53 蛋白質の濃度が高くなるとされる. 本研究では, 市販されている人 p53 蛋白質に対するモノクローナル抗体 (DO-7) を使用し免疫組織染色を行ったが, 本抗体は野生型, 変異型両者に反応するため, 純粋に p53 蛋白質の変異型を測定したものではないが, 実際に腫瘍抽出から固定までに数時間を要していることを考え合わせると, ほぼ変異型の p53 蛋白質を測定出来たものと予想する. したがって, p53 蛋白質が発現されている癌細胞では, 正常細胞の増殖抑制が停止し癌化にいたった状態といえる. 今回の研究では, 非小細胞肺癌において p53 蛋白質発現と腫瘍増殖能の

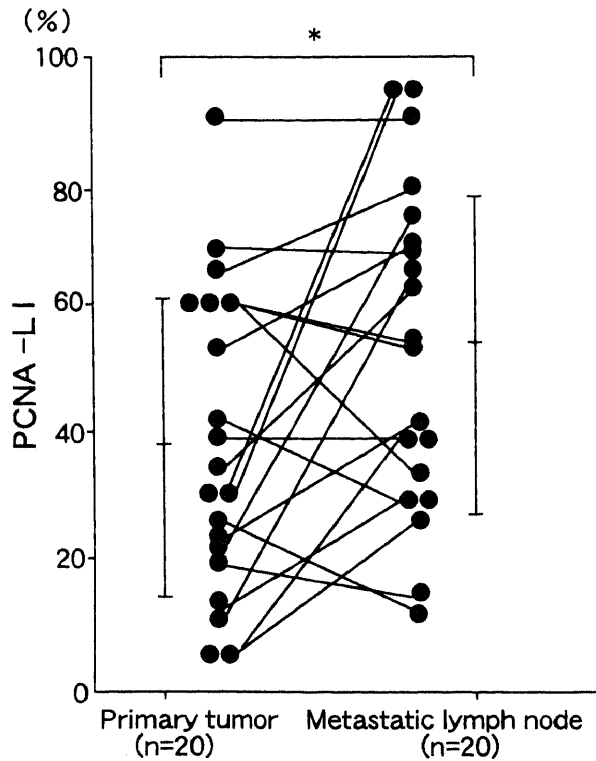


Fig. 6. Comparison of PCNA labeling index between primary tumors and metastatic lymph nodes. PCNA-LIs of primary tumors and mediastinal metastatic lymph nodes were determined in 20 patients of stage IIIA. Values are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$, by Wilcoxon signed-ranks test. PCNA-LI, PCNA labeling index.

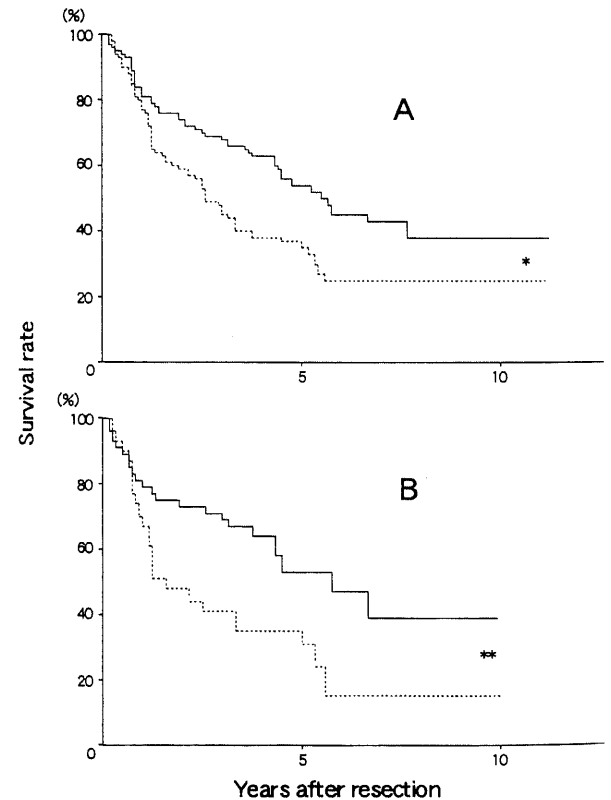


Fig. 7. Survival curves of patients with non-small cell lung cancer divided into p53 protein negative and positive groups. A, total cases; B, total cases of adenocarcinoma. For all cases are curatively resected lung cancers of stage I, II, III: —, p53 protein negative cases; ·····, p53 protein positive cases. * $p < 0.01$, by generalized Wilcoxon test. ** $p < 0.05$, by generalized Wilcoxon test.

関係、臨床背景因子との関連および予後との関連について検討を行った。

一方、腫瘍増殖能の評価は、PCNA に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行い、その標識率を算出すること

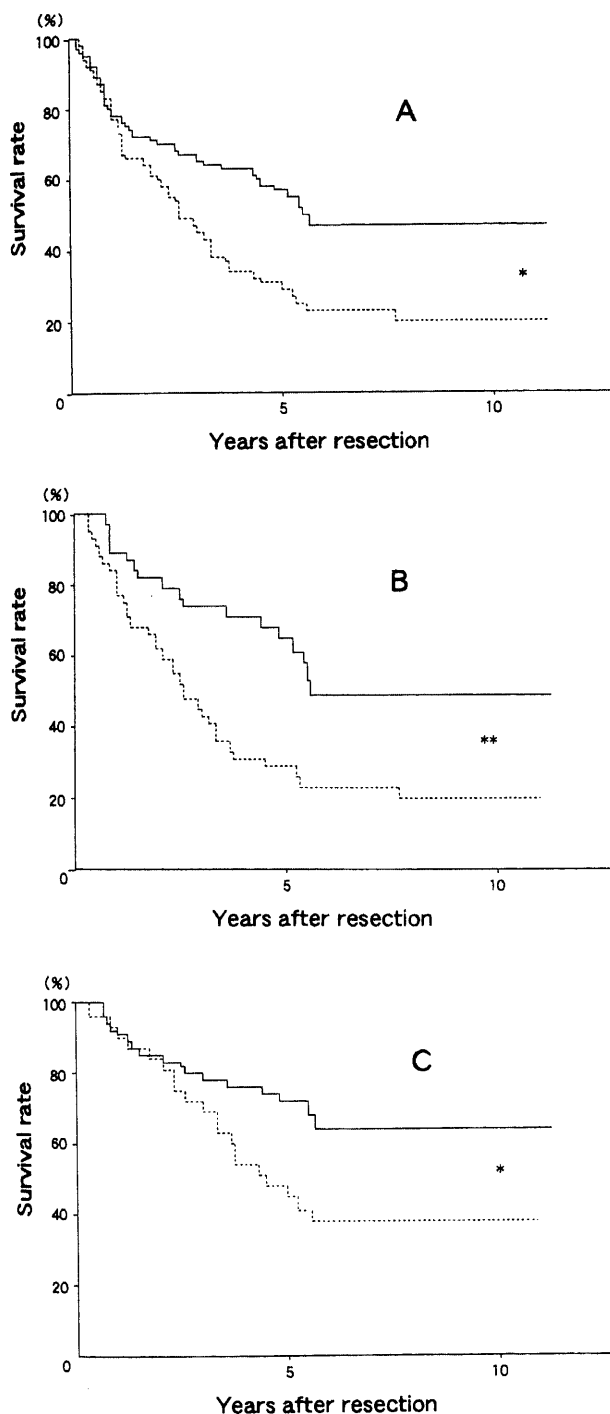


Fig. 8. Survival curves of patients with non-small cell lung cancer divided into low PCNA-LI (<40%) and high PCNA-LI groups (≥40%). A, total cases; B, total cases of epidermoid carcinoma; C, stage I. For all cases are curatively resected lung cancers of stage I, II, III. —, low PCNA-LI groups; ·····, high PCNA-LI groups. * p<0.05, by generalized Wilcoxon test. ** p<0.005, by generalized Wilcoxon test.

で腫瘍増殖能の指標とした。近年、腫瘍増殖能は治療方針や予後を予測する上で重要な因子と考えられ始め、多くの報告がなされている。今回測定した PCNA も種々の癌組織において、その腫瘍増殖能の指標として近年研究がなされている。また、PCNA の他にも腫瘍増殖能を評価するものとしてブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) や Ki-67 等が頻用されており、BrdU はチミジンの類似体であり、S 期細胞の DNA へチミジンの代わりに選択的に取り込まれ、モノクローナル抗体の使用により S 期細胞の標識が可能となる¹⁸⁾¹⁹⁾。しかし、摘出した組織に BrdU を取り込ませる際の浸透性に問題があり、組織の生物活性などにより影響されると考えられている。また、その測定には、摘出直後の新鮮腫瘍組織を要し、本研究のように固定標本での測定には適さない。Ki-67 は、ホジキン病における Reed-Sternberg 巨細胞に反応する抗体を作成しようとする試みの中で見いだされたマウスモノクローナル抗体であり、G₁, S, G₂, M 期のすべての細胞の核に反応するが G₀期細胞の核とは反応を欠く²⁰⁾。しかし、Ki-67 は新鮮凍結切片を染色対象とする場合には有利であるが、パラフィン包埋された組織の染色は不可能とされていた²¹⁾。したがって、著者はパラフィン包埋の状態でも染色可能とされる PCNA を腫瘍増殖能の指標として選び本研究を行った。

PCNA は、1978年、Miyachi ら²²⁾が蛍光抗体法より、70例の全身性エリテマトーデス患者のうち3例に、増殖性細胞の核のみと特異的に反応する血中自己抗核抗体を発見し、この抗体に対応する抗原が“増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)”と呼ばれるようになった。また、細胞周期依存性非ヒストン核内蛋白サイクリンと同一物質であることが明らかにされ²³⁾、DNA ポリメラーゼδの補助蛋白質であることも報告されている²⁴⁾²⁵⁾。PCNA は、蛍光抗体法で観察すると細胞周期の G₁期から S 期に入る時期に出現し、S 期の進行に従い核内局在が変化する。つまり、S 期初期には核は顆粒状に染色され、S 期の進行に従い強く染色され、S 期末期には核全体に小斑点として染色され、G₂期から M 期には、極弱く染色される²⁶⁾。したがって、PCNA は、細胞周期の主に増殖期に標識さ

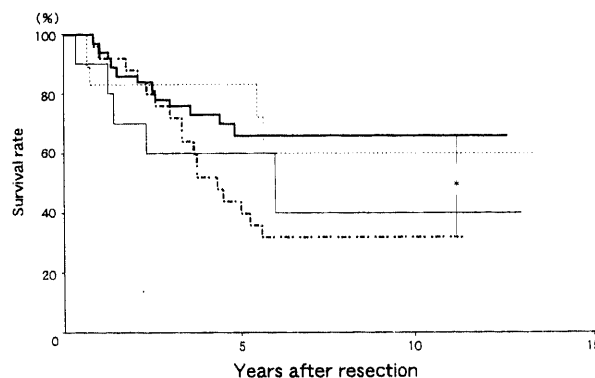


Fig. 9. Survival curves of patients with non-small cell lung cancer divided into DNA ploidy patterns and PCNA-LI groups. For all cases are curatively resected lung cancers of stage I. —, cases with diploid pattern and low PCNA-LI (<40%). ·····, cases with diploid pattern and high PCNA-LI (≥40%). —, cases with aneuploid pattern and low PCNA-LI (<40%). ·····, cases with aneuploid pattern and high PCNA-LI (≥40%). * p=0.08, by generalized Wilcoxon test.

れるが、S 期のみの特異性は少ない。本研究では、弱く標識された核も陽性核と判断したため、G₀ 期以外、つまり G₁, S, G₂, M 期の細胞周期にある核数を算出したものと考えられる。また、実際の免疫組織染色を行うにあたり、腫瘍断面が1枚のプレパラートにおさまる症例もあったが、数枚に及ぶ症例もあり、可能な限り腫瘍の最大断面の辺縁部が観察できるパラフィン包埋ブロックを選択した。顕微鏡による視野選択にあたっては、可能な限り腫瘍の辺縁かつ癌細胞が視野の50%以上を占める場所を選択した。

ところで、野生型 p53 蛋白発現は、腫瘍増殖の抑制、PCNA 蛋白産生抑制の方向に作用するとされ²⁷⁾、逆に変異型 p53 蛋白発現例では S 期の核が多く腫瘍増殖能が高いと報告されている¹¹⁾。つまり、p53 遺伝子に変異が生じると増殖抑制状態から腫瘍増殖への方向転換作用が起こると考えられる。本研究でも p53 蛋白発現例で PCNA 標識率が有意に高くなっており、p53 蛋白発現例では腫瘍増殖能が高くなっている状態であることが示唆された。次に、p53 蛋白発現率および PCNA 標識率をそれぞれ臨床病理学的に細分し解析をおこなったが、組織型では腺癌より扁平上皮癌の方が PCNA 標識率が高く、増殖能が高いといえる。また、病期別の検討では、p53 蛋白発現率、PCNA 標識率とも病期進行にともない、ほぼ高くなったが、これを T 因子、N 因子、M 因子別に分けて検討すると、T 因子ではその進行とともに p53 蛋白発現率は高くなった。また、リンパ節転移陽性例、肺内転移を含めた遠隔転移陽性例では有意差をもって p53 蛋白発現率および PCNA 標識率が高かった。これらの結果から、臨床的には転移を認めない症例でも癌組織に p53 蛋白発現を認める場合、あるいは PCNA 標識率が高い場合は、リンパ節転移、遠隔転移が潜在している確率が高く、予後不良となる可能性がある。

転移リンパ節について、p53 蛋白発現および PCNA 標識率を原発巣と比較すると、p53 蛋白発現は、20例中19例で原発巣と転移リンパ節巣で同様な発現が認められた。したがって、癌組織内でも p53 蛋白発現の見られる細胞が転移しやすいと予想される。また、PCNA 標識率については原発巣より転移巣の方が有意に高く、リンパ節転移陽性例では PCNA 標識率が高いことと考えると、増殖能の高い癌組織は転移しやすく、転移する癌細胞は増殖能の高い部分であること、あるいは転移後に細胞増殖が盛んになることが示唆される。

I 期肺癌に限って PCNA 標識率を検討したところ、腫瘍マーカーである CEA の値が高い症例 (CEA>5ng/ml) では、CEA 正常値例に比べ有意に標識率が高かった。CEA は、Gold と Freedman²⁸⁾ によって消化器癌の抽出液から発見された糖蛋白であり、消化器癌に限らず肺癌においても術前の補助診断、治療効果の判定や再発の予知など臨床に利用されているが、肺癌においては術前 CEA 値が高い症例では予後不良であり^{29,30)}、かつ I, II 期の腺癌、扁平上皮癌では再発例が多いと報告されている³⁰⁾。このことは、今回の成績と良く一致している。

近年、各種臓器の癌で p53 蛋白発現の検索がなされているが、胃癌¹²⁾、乳癌¹³⁾ 等においては p53 蛋白発現例の予後は不良との報告がなされている。今回の研究でも、p53 蛋白発現陽性例は陰性例に比べ予後不良であることを明らかにした。これを組織型別に検討すると腺癌で p53 蛋白発現陽性例の方が有意に予後不良であった。腺癌は、組織亜型、腫瘍径などに関係なく、腫瘍増殖速度、遠隔転移は様々でありその臨床病態は複雑

とされているが、本研究で p53 蛋白発現例の予後が不良であったことは、腺癌の悪性度を示す一つの重要な因子となりうると思われる。また、PCNA 標識率低値群と高値群に分けた場合の生存率の検討では、PCNA 標識率高値群が低値群に比べ予後不良であり、組織型別には扁平上皮癌で PCNA 標識率高値群が予後不良であった。また、病期別の検討では、I 期で PCNA 標識率高値群は低値群に比べ有意に予後不良であった。したがって、PCNA 標識率が高値である症例は予後不良であり、特に予後良好とされる I 期症例で予後の差が生じたのは臨床経過を予測するうえで意義があると考えられた。

教室の林³¹⁾ は、フローサイトメトリーを用いて非小細胞肺癌の核 DNA 量の研究を行い、I 期症例では DNA 二倍体と比較し、DNA 異数倍体の方が、予後不良であったと報告している。しかし、DNA 異数倍体の中でも予後良好なものと、予後不良であるものがみられており、本研究では、これに PCNA 標識率を組み合わせるにより、より明確な予後因子となりうるかを検討した。DNA 二倍体のうち PCNA 標識率低値群と高値群に予後の差は見られなかった。しかし、DNA 異数倍体では、有意差には至らないが (p=0.08)、PCNA 標識率高値群が低値群に比べて予後不良の傾向を認めた。したがって、予後不良とされる DNA 異数倍体腫瘍の中で、腫瘍増殖能の高い癌組織はとくに予後不良と考えられる。

なお、本研究では、過去に切除され予後が明らかにされている症例の肺癌組織がパラフィン包埋の状態でも保存され、p53 蛋白発現および腫瘍増殖能が、現時点でも測定可能であることを明らかにし、かつ長期予後との相関を現時点で解析できた点が特記されるべきである。肺癌患者の予後は、さまざまな生物学的、病理学的ならびに臨床的背景因子によって左右されるものであり、単一のパラメーターをもって論じるのは困難であるが、本研究で検索した p53 蛋白発現例、PCNA 標識率高値例であることが予後不良因子の一つとなりうると思われた。今後、これらの結果をふまえた新たな細胞生物学的指標が癌患者の予後推定や治療方針を左右する重要な因子となってゆくものと期待される。

結 論

原発性非小細胞肺癌193例、転移リンパ節20例を対象にモノクローナル抗体を用いて p53 蛋白発現率と PCNA 標識率を測定し、以下の結論を得た。

1. p53 蛋白発現陽性例は、193例中97例 (50%) に認められた。
2. p53 蛋白発現陽性例では、PCNA 標識率が 47.1±25.2% と陰性例の 29.3±20.7% に比べ有意に高かった。
3. p53 蛋白発現陽性率は、男性、リンパ節転移陽性例、遠隔転移陽性例に有意に高く、ほぼ病期、T 因子の進行とともに高くなった。
4. PCNA 標識率は、扁平上皮癌、リンパ節転移陽性例、遠隔転移陽性例に有意に高く、ほぼ病期の進行とともに高くなった。
5. I 期92例の検討では、p53 蛋白発現陽性例に PCNA 標識率が有意に高く、さらに組織型別に分けると、腺癌において p53 蛋白発現陽性例に PCNA 標識率が有意に高かった。また、術前に測定した CEA 値が高い症例では、PCNA 標識率が有意に高かった。
6. リンパ節転移巣20例の検討では、p53 蛋白発現は1例を

除き、原発巣と同じであり、PCNA 標識率は、原発巣に比べ転移巣の方が有意に高かった。

7. 生存率の検討では、p53 蛋白発現陽性例が有意に予後不良であり、組織型別では、腺癌において p53 蛋白発現陽性例が有意に予後不良であった。また、PCNA 標識率40%未満を低値群、40%以上を高値群とした場合、高値群で有意に予後不良であった。組織型別では、扁平上皮癌において高値群が有意に予後不良であった。病期別にみると、I 期では高値群が有意に予後不良であり、核 DNA 量を組み合わせた場合、DNA 異数倍体において高値群が予後不良の傾向を認めた。

以上、原発性非小細胞肺癌において p53 蛋白発現例では、腫瘍増殖能が高く、p53 蛋白発現陽性および PCNA 標識率高値群は予後不良因子となりうることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際し御協力を頂きました、肺グループの諸先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は第33回日本肺癌学会総会(1992,名古屋)、第93回日本外科学会総会(1993,仙台)において発表した。

文 献

- 1) Lane, D. P. & Crawford, L. V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278, 261-263 (1979).
- 2) Linzer, D. I. H. & 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).
- 3) Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R. W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51, 6304-6311 (1991).
- 4) Hollstein, M. C., Metcalf, R. A., Welsh, J. A., Montesano, R. & Harris, C. C.: Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9958-9961 (1990).
- 5) Purdie, C. A., O'Grady, J., Piris, J., Wyllie, A. H. & Bird, C. C.: p53 expression in colorectal tumors. *Am. J. Pathol.*, 138, 807-813 (1991).
- 6) Cattoretti, G., Rilke, F., Andreola, S., D'Amato, L. & Delia, D.: p53 expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 41, 178-183 (1988).
- 7) Davidoff, A. M., Herndon II, J. E., Glover, N. S., Kerns, B. M., Pence, J. C., Iglehart, J. D. & Marks, J. R.: Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery*, 2, 259-264 (1991).
- 8) Chiba, I., Takahashi, Y., Nau, M. M., D'Amico, D., Curiel, D. T., Mitsudomi, T., Buchhagen, D. L., Carbone, D., Piantadosi, S., Koga, H., Reissman, P. T., Salmon, D. J., Holmes, E. C. & Minna, J. D.: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 5, 1603-1610 (1990).
- 9) Wright, C., Mellon, K., Johnson, P., Lane, D. P., Harris, A. L., Horne, C. H. W. & Neal, D. E.: Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br. J. Cancer*, 63, 967-970 (1991).
- 10) Stretch, J. R., Gatter, K. C., Ralfkiaer, E., Lane, D. P. & Harris, A. L.: Expression of mutant in melanoma. *Cancer Res.*, 51, 5976-5979 (1991).
- 11) Mørkve, O. & Laerum, O. D.: Flow cytometric measurement of p53 protein expression and DNA content in paraffin-embedded tissue from bronchial carcinomas. *Cytometry*, 12, 438-444 (1991).
- 12) Martin, H. M., Filipe, M. I., Morris, R. W., Lane, D. P. & Silvestre, F.: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 50, 859-862 (1992).
- 13) 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 Rs.*, 82, 835-840 (1991).
- 14) 日本肺癌学会編: 臨床・病理, 肺癌取扱い規約. 改訂第3版, 15-21 頁, 金原出版, 東京, 1987.
- 15) 日本肺癌学会編: 臨床・病理, 肺癌取扱い規約. 改訂第3版, 67-75 頁, 金原出版, 東京, 1987.
- 16) Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M. & Levine, A. J.: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsp 70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 531-539 (1988).
- 17) Hins, P. W., Finlay, C. A., Frey, A. B. & Levine, A. J.: Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2863-2869 (1987).
- 18) Gratzner, H. G. & Leif, R. C.: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*, 1, 385-389 (1981).
- 19) Gratzner, H. G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218, 474-475 (1982).
- 20) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. & Stein, H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, 133, 1710-1715 (1984).
- 21) Franklin W. A., McDonald, G. B., Stein, H. O., Gatter, K. C., Jewell, D. P., Clarke, L. C. & Mason, D. Y.: Immunohistologic demonstration of abnormal colonic crypt cell kinetics in ulcerative colitis. *Hum. Pathol.*, 16, 1129-1132 (1985).
- 22) Miyachi, K., Fritzler, M. J. & Tan, E. M.: Autoantibody to a nuclear in proliferating cells. *J. Immunol.*, 121, 2228-2234 (1978).
- 23) Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, Jr. B. R. & Garrels, J. I.: Identity of the proliferating cell nuclear

antigen and cyclin. *Nature*, 309, 374-376 (1984).

24) Bravo, R., Frank, R., Blundell P. A. & MacDonald, B. H.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature*, 326, 515-517 (1987).

25) Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. & Stillman, B.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature*, 326, 517-520 (1987).

26) Celis, J. E. & Celis, A.: Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3262-3266 (1985).

27) Mercer, W. E., Shields, M. T., Lin, D., Appella, E. & Ullrich, S. J.: Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1958-1962 (1991).

28) Gold, P. & Freedman, S. O.: Demonstration of tumorspecific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, 121, 439-462 (1965).

29) Concannon, J. P., Dalbow, M. H., Hodgson, S. E., Headings, J. J., Markopoulos, E., Mitchell, J., Cushing, W. J. & Liebler, G. A.: Prognostic value of preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) plasma levels in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer*, 42, 1477-1483 (1978).

30) 竹尾貞徳, 原 信之, 大田満夫: 肺癌患者における術前 CEA 値陽性例の臨床的意義—特に長期観察例における術前術後における経時的測定の意義—. *日胸外会誌*, 40, 1089-1094 (1992).

31) 林 義信: 原発性非小細胞肺癌切除例における核 DNA 量に関する基礎的ならびに臨床的研究. *十全医会誌*, 100, 47-67 (1991).

A Clinical Study of p53 Protein Expression and Proliferative Activity of Primary Non-small Cell Lung Cancers
Kenichi Ietsugu, Department of Surgery (I) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 492—505 (1993)

Key words non-small cell lung cancer, immunohistochemical staining, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, prognostic factor

Abstract

The expression of p53 protein was investigated in 193 patients with primary non-small cell lung cancer using a monoclonal antibody against p53 protein (DO-7). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which is an indicator of tumor proliferative activity, was also detected using a monoclonal antibody against PCNA (PC10). Their correlation with clinical factors was investigated. p53 protein was positive in 97 of the 193 patients (50%). Specimens from 176 patients were stained by PC10; the PCNA labeling index (PCNA-LI) for the entire study group was $38.4 \pm 24.7\%$ (mean \pm SD). In p53 protein positive patients, the PCNA-LI was $47.1 \pm 25.2\%$; in p53 negative patients, it was $29.3 \pm 20.7\%$. The difference in PCNA-LI between the two groups was significant ($p < 0.005$). p53 protein was positive in 54.4% of the males, 63.2% of N1-3 cases, and 69.6% of M1 cases. The rate of positive p53 protein in these groups was significantly higher than that in females (37.0%), patients with N0 tumors (43.2%), and patients with M0 tumors (47.7%) ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, respectively). The rate of positive p53 protein in Stage I disease was 41.0%, 52.6% in Stage II, 53.5% in Stage III A, 87.5% in Stage III B, and 69.6% in Stage IV disease. The rate of positivity became higher as the stage of the disease progressed. p53 protein was positive in 43.8% in patients with T1, 50.5% in those with T2, 48.0% in those with T3, and 91.0% in those with T4. As the tumors became larger, the rate of positivity also became higher. PCNA-LI was $43.4 \pm 26.1\%$ in epidermoid carcinoma, which was significantly higher than that in adenocarcinoma ($p < 0.05$). PCNA-LI was $32.7 \pm 20.1\%$ in Stage I disease, $49.8 \pm 32.2\%$ in Stage II disease, $36.1 \pm 23.6\%$ in Stage III A disease, $53.9 \pm 21.3\%$ in Stage III B disease, and $53.6 \pm 29.4\%$ in Stage IV disease. PCNA-LI became higher as the cancer progressed. PCNA-LI in patients having N1-3 tumors was significantly higher ($45.2 \pm 26.8\%$) than that in patients with N0 tumors ($34.6 \pm 22.7\%$) ($p < 0.05$). PCNA-LI in patients with M1 tumors was $53.6 \pm 29.4\%$, which was significantly higher than that in patients with M0 tumors ($36.4 \pm 23.5\%$) ($p < 0.001$). Evaluation of 92 patients with Stage I disease, who were considered to have the most favorable prognosis, revealed that PCNA-LI was $38.7 \pm 23.0\%$ in p53 protein positive patients. This was significantly higher than the PCNA-LI in patients with negative p53 protein ($28.4 \pm 16.9\%$) ($p < 0.05$). Even in Stage I adenocarcinoma, PCNA-LI was significantly higher in p53 protein positive patients ($43.9 \pm 21.3\%$) than in p53 protein negative patients ($26.5 \pm 14.2\%$) ($p < 0.01$). Among patients with Stage I disease, those with elevated preoperative values of serum CEA ($> 5\text{ng/ml}$) had a significantly higher PCNA-LI ($38.1 \pm 9.2\%$) than patients having normal serum CEA values ($< 5\text{ng/ml}$) (PCNA-LI: $26.7 \pm 18.7\%$) ($p < 0.05$). When p53 protein was present in the primary cancer, it was also present at the site of metastasis in 19 out of 20 patients with lymph node metastasis. PCNA-LI was $54.0 \pm 25.7\%$ in the metastatic foci which was significantly higher than that in the primary cancer ($38.4 \pm 23.8\%$) ($p < 0.05$). The survival rate was

significantly higher in p53 protein negative patients than in p53 protein positive patients ($p < 0.01$). The prognosis was more unfavorable for p53 protein positive patients with adenocarcinoma than for patients with the same cancer, but negative for p53 protein ($p < 0.05$). Patients with low PCNA-LI ($< 40\%$) had significantly higher survival rates than those with high PCNA-LI ($\geq 40\%$) ($p < 0.05$). This tendency was particularly marked in epidermoid carcinoma ($p < 0.005$), and was also seen in Stage I disease of all histological types ($p < 0.05$). In addition, the DNA content was evaluated, and patients were classified into diploid and aneuploid cases. It was found that patients with aneuploid DNA and high PCNA-LI had a poorer prognosis than those with low PCNA-LI ($p = 0.08$). These findings showed that p53 protein positive primary non-small cell lung cancers are highly proliferative. Moreover, patients who were p53 positive and those with high PCNA-LI had a poor prognosis. It is concluded that these two indicators are useful as prognostic factors for primary non-small cell lung cancers.