



Title	Analysis of cell-cycle regulatory proteins (RB, p53, p21/Cip1/Wafl, cyclin E, Cdk2) in human breast cancer
Author(s)	若杉, 英二郎
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40960
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	若 杉 英 二 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 4 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 11 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Analysis of cell-cycle regulatory proteins (RB, p53, p21/Cip1/Waf1, cyclin E, Cdk2) in human breast cancer [乳癌における細胞周期調節関連蛋白 (RB, p53, p21/Cip1/Waf1, cyclin E, Cdk2) の発現についての検討]
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 秋 山 徹 教 授 青 笹 克 之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 1) 乳癌において同じ病期の患者に同様に治癒切除が行われたとしても術後早期再発してくるもの、晩期再発するものなどその予後は必ずしも一定でない。このような多様な経過をたどる乳癌の生物学的特徴を明らかにすることは治療の選択において有用であると考えられる。本研究では乳癌の生物学的特徴を細胞周期調節関連蛋白の観点から検討した。1) Rb 蛋白 (pRB) は、細胞周期の negative regulator として知られ、その異常は癌の発生・進展に関与することが知られている。pRB の機能は細胞周期を制御する cyclin/Cdk をはじめとしたプロテインキナーゼによるリン酸化により制御されると考えられている。すなわち、通常の細胞周期では pRB は G1 期には低リン酸化型、S 期以降は高リン酸化型として存在し、低リン酸化型が活性型で高リン酸化型が不活化型であると考えられている。本研究では乳癌における pRB の発現を免疫組織学的に調べ、次にその機能を検討するため Western blotting を行いそのリン酸化状態を調べた。さらにその調節蛋白である cyclin E, Cdk2, Cdk2 インヒビターである p21/Cip1/Waf1 (p21) の発現を免疫組織学的に調べた。

2) p21 は in vitro で wild-type p53 によって発現誘導される系が明らかとなっている。そこで、乳癌組織における p21, p53 の関係を免疫組織学的に検討するとともに、これらが予後因子として有用であるかどうか検討した。

【方法と成績】 方法：1) 原発性乳癌70例のリン酸緩衝ホルマリン固定標本を用いて、抗 pRB 抗体 (PharMingen 社) を 1 次抗体とする ABC 法で免疫組織染色を行った。そして、免疫染色で pRB 発現が認められたもののうち30例に対し、そのリン酸化状態を調べるため抗 pRB 抗体を用いた Western blotting を行うとともに、抗 Cdk2 抗体 (UBI 社)、抗 Cyclin E 抗体 (Oncogene Science 社)、抗 p21 抗体 (Oncogene Science 社) を 1 次抗体とする ABC 法により免疫組織染色を行いこれら蛋白の発現を調べ、pRB のリン酸化との関連について検討した。なお、判定は顕微鏡下で(癌部、正常部いずれにおいても)全体の10%以上に染色性が認められるものを陽性、10%未満を陰性とした。

2) 原発性乳癌104例のリン酸緩衝ホルマリン固定標本を用いて、p21 抗体、抗 p53 抗体 (Novocastra 社) を 1 次抗体とする ABC 法により免疫組織染色を行い両蛋白の発現を比較検討した。さらに、両蛋白の発現と臨床病理因子および術後無病期間 (DFI) との関係それぞれ χ^2 検定、Kaplan-Meier 法により解析した。さらに、Cox の多変量解析

により再発予後因子の解析を行った。

成績：1) 抗 pRB 抗体を用いた免疫組織染色の結果、pRB 陽性症例は70例中52例 (74%) であった。一方、正常乳腺では乳管上皮細胞の一部にわずかな陽性細胞がみられたにすぎなかった。この乳癌52例中30例について、そのリン酸化状態を調べたところ、25例 (83%) が低リン酸化型、5例が高リン酸化型であった。

これら30例において、cyclin E/Cdk2 は癌組織と離れた正常乳腺組織ではほとんど発現がみられなかったのに対し (陰性)、癌部では30例全例で病期に関係なく発現が認められた (陽性)。

一方、Cdk2インヒビターである p21は30例中19例 (63%) で陽性だった。pRB のリン酸化状態と p21の関係をみると、p21は低リン酸化型 pRB を示した25例中18例 (76%) で陽性であったのに対し、高リン酸化型 5 例中 4 例で陰性であった。臨床予後因子との検討では、低リン酸化型 pRB 群ではリンパ節転移が有意に少なかった ($p < 0.05$)。

2) 乳癌104例における p21, p53の発現を調べた結果、p21は51例 (49%) で、p53は33例 (32%) で陽性であった。両蛋白の発現パターンを調べたところ、76例 (73%) が相反した発現パターンを示した。すなわち、47例が p21(+)/p53(-)、29例が p21(-)/p53(+) であった。p21陽性症例は、リンパ節転移陰性で組織学的悪性度が低く、かつ ER 陽性の症例で有意に多くみられた ($p < 0.05$)。一方、p53陽性症例は組織学的悪性度の高い、ER 陰性の症例で有意に多くみられたが ($p < 0.05$)、リンパ節転移との関連はみられなかった。

p53, p21の発現と再発症例との検討では、再発は18例にみられそのうち16例で p21が陰性であった。術後無病期間 (DFI) との関係について検討したところ、p53と DFI の間には有意な関連は認められなかったが、p21陽性症例では陰性症例に比べ DFI は長く、両者の間に統計学的有意差がみられた ($p < 0.001$)。また、Cox 解析から p21および組織学的悪性度が再発予後因子として有用であることがわかった。

【総括】 cyclin E/Cdk2 は乳癌の初期段階から関与していることが示されたが、これらの機能は主に p21により制御されていることが推察された。すなわち、p21陽性症例では cyclin E/Cdk2 の機能抑制により pRB のリン酸化が抑制 (細胞周期が制御) されているが、p21陰性症例では逆に Cdk2 による pRB のリン酸化促進がおり細胞周期制御機能の破綻・細胞増殖の充進がおこるものと推察された。臨床病理並びに治療成績との比較検討から、p21は術後早期再発およびリンパ節転移を含む生物学的悪性度を示す一指標として有用であることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、乳癌の生物学的特徴を細胞周期調節蛋白の観点から検討する目的で、G1-S 期移行調節に重要な役割を果す RB 蛋白 (pRB) の機能を Western blotting 法で調べるとともに、pRB の調節蛋白である p21を中心とした細胞周期調節蛋白の発現を免疫組織染色法により調べ、これらの関係について検討したものである。

乳癌において、pRB のリン酸化を促進する Cyclin E, Cdk2は全例で高発現していたが、pRB は低リン酸化型 (活性型) で存在する症例が多かった。この点に関して、p21が発現している症例では低リン酸化型 pRB がほとんどであったのに対し、高リン酸化型 pRB を示した症例のほとんどで p21が陰性であった。また、p21と p53の発現を比較したところ、両者は相反した染色パターン (p21陽性の症例では p53陰性) を示すものが多かった。一方、臨床病理因子との検討で、p21はリンパ節転移陰性、ER 陽性で組織学的悪性度の低い症例で有意に多く発現していた。さらに、p21陽性群は陰性群に比べ術後無再発期間が長く、両群間に有意差が認められた。

この研究によって、p21の発現している症例は pRB および p53との細胞周期抑制系が保たれており、p21の発現は生物学的悪性度および術後無再発期間を予測する重要な因子であることが示され、本研究は学位に値するものと考えられる。