



Title	DISRUPTION OF THE RB PATHWAY AND CELL-PROLIFERATIVE ACTIVITY IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCERS
Author(s)	田中, 壽一
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41691
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	田 中 壽 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	DISRUPTION OF THE RB PATHWAY AND CELL-PROLIFERATIVE ACTIVITY IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCERS. (非小細胞肺癌に於ける RB 経路の異常と細胞増殖活性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松田 噴
	(副査) 教 授 門田 守人 教 授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

細胞増殖は細胞周期がG1期からS期に移行することにより開始する。pRB (retinoblastoma protein) はリン酸化により細胞周期をG1期からS期へ移行させ、脱リン酸化によりG1期に停止させる。p16とcyclinD1を介したpRBの脱リン酸化あるいはリン酸化を制御する経路（RB経路）はG1/S移行期を調節する重要な経路であり、種々の癌でこの経路の異常が報告されている。

非小細胞肺癌では50%にp16発現の陰性化が認められるが、p16をコードするCDKN2遺伝子の変異、欠失は10%以下と少なく、CDKN2遺伝子のプロモーター領域のメチル化がp16発現の陰性化に関与していると考えられている。また、pRBの異常は30-40%、cyclinD1の異常は40-50%と報告されているが、p16、cyclinD1及びpRBを総合的に検討し、RB経路としての異常がどの程度、非小細胞肺癌に関与しているかを明らかにした報告はない。

本研究では、1) 非小細胞肺癌組織に於てp16、pRB及びcyclinD1の発現異常を調べ、RB経路としての異常がどれくらいの頻度で非小細胞肺癌に関与しているか、2) p16に関しては非小細胞肺癌切除組織におけるp16発現陰性化にCDKN2遺伝子のメチル化が関与しているか、3) RB経路の異常が非小細胞肺癌における細胞増殖活性に関与しているか、を検討することを目的とする。

【方法】

術前未治療の非小細胞肺癌切除症例101例を対象とした。病理組織型は腺癌66例、扁平上皮癌30例及び大細胞癌5例で、病理病期はI 66例、II 3例、III 30例、IV 2例であった。

- 1) p16、pRB及びcyclinD1の発現はホルマリン固定-パラフィン包埋された切除標本を免疫組織染色し検索した。
- 2) CDKN2遺伝子の変異は凍結組織標本から抽出したDNAを用いてCDKN2遺伝子のexon1からexon3をPCR-SSCP法を用いて塩基配列の異常を検索した。CDKN2遺伝子のプロモーター領域のメチル化はSouthern Hybridizationを行い検索した。
- 3) 細胞増殖活性は細胞増殖の活発な細胞に出現するKi67蛋白の免疫組織染色を行い、癌細胞中のKi67陽性細胞の割合をKi67-index(%)で表し検討した。

【成績】

- 1) p16, pRB 及び cyclinD 1 の発現異常は47例 (46.5%), 42例 (41.6%) 及び45例 (44.5%) に認められた。また、p16, pRB の両者が発現しているもの17例或いは両者が発現していないもの5例に比し、p16, pRB の何れか一方に異常を認めたものは79例 (78.9%) と有意に多かった。cyclinD 1 の発現は p16及び pRB の発現と明らかな関係は認めなかった。RB 経路としては p16, pRB 及び cyclinD 1 の少なくとも 1 つ以上の発現異常が91例 (90%) と高頻度に認められた。
- 2) DNA を検索し得た45例において、CDKN 2 遺伝子の変異は 1 例に exon 2 の塩基配列異常を認め、また CDKN 2 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は12例 (27%) に認められた。この45例の内、p16の発現陰性化は18例 (40%) で、p16陰性例の 9 例 (50%) にメチル化が認められ、CDKN 2 遺伝子のメチル化と p16の陰性化に有意な関係が認められた。 $(P = 0.0061)$ 。
- 3) Ki67-index (%) は、p16と pRB 発現の有無による明らかな差ではなく、また p16, pRB 共に正常発現している群と何れか一方が異常を示す群の比較においても差はなかった。一方、cyclinD 1 陽性群の Ki67-index : 29.5±21.9 は cyclinD 1 陰性群 : 17.0±21.4 と比較して有意に高値を示した。 $(P = 0.008)$ 。更に p16, pRB の両方が正常或いは異常である場合、cyclinD 1 の発現の有無による Ki67-index に差はないが、p16, pRB の何れか一方が異常の場合、即ち pRB 陽性／p16陰性例では cyclinD 1 陽性群 : 31.3±22.3, cyclinD 1 陰性群 : 15.7±20.1 ($P = 0.04$)、又 pRB 陰性／p16陽性例では、cyclinD 1 陽性群 : 32.6±21.7, cyclinD 1 陰性群 : 22.0±24.3 ($P = 0.06$) と cyclin D 1 陽性例は Ki67-index が高い傾向を示した。

【総括】

- 1) 非小細胞肺癌101例の切除組織に於いて p16, pRB 及び cyclinD 1 の発現異常を調べ、RB 経路の異常と非小細胞肺癌との関連を検討した。
- 2) p16, pRB 及び cyclinD 1 の発現異常の頻度は46.5%, 41.6%及び44.5%であった。p16と pRB の何れか一方に異常発現を認めたものは78.9%であった。また p16, pRB 及び cyclinD 1 の少なくとも 1 つの発現異常による RB 経路の不活性化が90%の症例に認められた。
- 3) p16発現異常の50%に CDKN 2 遺伝子のメチル化が認められた。
- 4) Ki67-index で示される細胞増殖活性は cyclinD 1 異常発現例で高値を示し、その中でも p16, pRB の何れかの発現異常例に特に高い傾向を認めた。
- 5) 以上から、非小細胞肺癌においてG 1 / S 移行期を調節する p16, pRB 及び cyclinD 1 からみたRB経路は高頻度に異常が認められ、また cyclinD 1 発現異常例は細胞増殖活性の指標である Ki67-index 高値を示したことから、RB 経路の異常は非小細胞肺癌の発生及び増殖に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

肺癌の中で外科的治療の対象となる非小細胞肺癌においてその生物学的悪性度を把握することは集学的治療を行う上で重要である。特に癌の発生や増殖に関わる細胞周期を調節する蛋白の遺伝子レベルでの解析が肝要である。非小細胞肺癌では、細胞周期を調節している pRB (retinoblastoma protein), p16及び cyclinD 1 の発現異常がこれまでにそれぞれ単独で報告されているが、これらの蛋白から構成されているRB経路の異常やこれらの発現異常と細胞増殖との関連は明らかではない。本研究では RB 経路の異常が非小細胞肺癌の発生や増殖にいかに関与しているかを明らかにする目的で、pRB, p16及び cyclinD 1 を同時に調べ、RB 経路としての異常の頻度を検索し、各蛋白の発現の有無と細胞増殖活性の指標である Ki67-index (%) を比較し検討した。p16に関してはその発現と CDKN 2 遺伝子のメチル化との関連について検討した。

術前未治療の非小細胞肺癌101例の切除組織を対象とした分析結果から、pRB, p16及び cyclinD 1 の発現異常は各々 42例 (41.6%), 46例 (45.5%) 及び45例 (44.5%) に認め、少なくとも 1 つ以上の発現異常によるRB経路の異常は

91例（90%）において認めた。また、CDKN 2 遺伝子のメチル化は p16陰性例の50%に認め、CDKN 2 遺伝子のメチル化と肺癌組織に於ける免疫組織学的な p16発現陰性化に有意な関係を認めた。更に、RB 経路の異常と細胞増殖活性との関連では p16 と pRB 発現の有無による Ki67-index に差は認めなかったが、cyclinD 1 発現陽性群は陰性群に比し Ki67-index が有意に高値を示した。

これらの結果は、非小細胞肺癌組織に於いて細胞周期を調節している RB 経路は高頻度に異常が認められ、また cyclinD 1 の発現異常が細胞増殖活性に関与していることを示し、RB 経路の異常が非小細胞肺癌の発生や増殖に重要な役割をしていることを唆唆するもので、学位に値すると考えられる。