



Title	INVERSELY CORRELATED EXPRESSION OF p16 AND Rb PROTEIN IN NON-SMALL CELL LUNG CANCERS : AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY
Author(s)	阪口, 全宏
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44696
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 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	坂口全宏
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18864 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 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	INVERSELY CORRELATED EXPRESSION OF p16 AND Rb PROTEIN IN NON-SMALL CELL LUNG CANCERS : AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY (非小細胞肺癌における p16 および pRb 発現の免疫組織学的検討)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉 (副査) 教授 川瀬 一郎 教授 戸田 達史

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞増殖は、細胞周期が G1 期から S 期へ移行することによって進行する。Cyclin D-Cyclin Dependent Kinase (CDK) 複合体は、癌抑制遺伝子産物である pRb (Retinoblastoma protein) をリン酸化することにより、細胞周期を G1 期から S 期に進行させ、pRb の脱リン酸化は、細胞周期を G1 期に停止させる。CDK4 の特異的阻害活性を有する p16 をコードする CDKN2 は、その機能から癌抑制遺伝子と考えられているが、その遺伝子異常や、p16 の蛋白発現異常が pRb のリン酸化制御の破綻をきたし、無秩序な細胞増殖の原因として種々の悪性腫瘍で報告されている。しかし、切除標本と培養細胞系の研究結果の間で発現異常や遺伝子異常の頻度に離隔がみられ、その原因として、切除標本では正常細胞の混入や細胞系では継代中の獲得形質の可能性が指摘されている。したがって、p16、Cyclin-CDK と pRb が細胞周期調節と悪性腫瘍の発生に一連の経路を形成し、関与することを解明するためには、in situ の評価が重要であるが、p16 の肺癌組織における免疫組織染色による検討の報告はなかった。

本研究では、非小細胞肺癌切除例における、1) p16 と pRb の蛋白発現を免疫組織染色により評価し、2) 両者の発現結果を対比し、Rb 経路を形成する p16 と pRb が、非小細胞肺癌の発生に関与しているか、3) p16 をコードする CDKN2 遺伝子異常の頻度を検索し、その異常が蛋白発現に関しているのかを検討することを目的とする。

〔方法〕

術前未治療の原発性非小細胞肺癌切除例 61 例を対象とした。病理組織型は、腺癌 41 例、扁平上皮癌 16 例、大細胞癌 3 例、腺扁平上皮癌 1 例で、病理病期は、I 期 39 例、II 期 4 例、III 期 16 例、IV 期 2 例であった。

- 1) p16 と pRb の発現は、ホルマリン固定、パラフィン包埋された手術標本を用い、免疫組織染色を行った。
- 2) CDKN2 遺伝子異常は、免疫組織染色を行った 61 例中 29 例で凍結組織標本が利用可能で、これに凍結組織のみが利用可能であった 8 例を加えた 37 例から DNA を抽出し、PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformational Polymorphism) 法を用いて、CDKN2 遺伝子の exon2 での異常を検索し、異常の認められた症例に関しては、直接塩基配列を決定した。

〔成績〕

- 1) p16 および pRb の発現異常は、30 例 (49.2%) と 23 例 (37.7%) で、p16 陽性 pRb 陰性が 21 例、p16 陰性 pRb

陽性が 28 例で、両蛋白の発現には有意な逆相関 ($p < 0.0001$) が認められた。

- 2) *CDKN2* 遺伝子は、37 例全例で exon2 領域の PCR による増幅が可能で、遺伝子欠質は存在しないと考えられた。13 例で、p16 免疫染色陰性で、13 例中 1 例のみで遺伝子異常が認められた。

〔総括〕

- 1) 非小細胞肺癌 61 例の切除組織において、p16 および pRb の蛋白発現異常と、*CDKN2* 遺伝子 exon2 領域の塩基配列異常を調べ、これらの異常と非小細胞肺癌との関連を検討した。
- 2) p16 および pRb の発現異常の頻度は、49.2%と 37.7%で、p16 と pRb の少なくとも一方に発現異常を認めたのは、83.6%と高頻度であった。
- 3) *CDKN2* 遺伝子 exon2 領域の DNA 解析では、p16 染色陰性の 1 例のみに塩基配列異常が検出された。
- 4) 以上より、非小細胞肺癌において、一連の経路を形成する p16 と pRb のいずれかの発現異常による経路不活化がその発生に関与していることが示唆された。また、p16 の発現異常の原因は、*CDKN2* 遺伝子の欠失と変異の関与は少なく、むしろプロモーター領域のメチル化など、他の不活化機構に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

p16 は、細胞周期の制御に働く *Retinoblastoma Protein* (pRb) をリン酸化する CDK4 の阻害因子であり、癌の抑制遺伝子産物として報告されている。この p16 は、それをコードする *CDKN2* 遺伝子とともに種々の癌で異常が報告され、癌の発生との関連が示唆されているが、癌切除標本における p16 の発現はこれまで検討されていない。

そこで、p16 の免疫組織染色法を新たに開発し、pRb と共に肺癌組織における両者の発現を解析した。対象は 61 例の非小細胞肺癌手術切除標本とした。

その結果、p16 と pRb は、それぞれ 30 例 (49%)、23 例 (38%) で染色上発現が陰性であり、また、少なくとも一方が陰性であった症例は 51 例 (84%) であった。一方、*CDKN2* の遺伝子変異は 1 例にのみ認められた。以上より、p16 が陰性の頻度は、非小細胞肺癌の約半数にみられたが、この p16 の不活化には *CDKN2* 遺伝子の欠失や変異の関与は少ないと考えられた。

本研究では、細胞株など実験系で示されていた p16 あるいは pRb の不活化による RB 経路の異常を非小細胞肺癌切除標本で p16 免疫組織染色法を用いて明らかにしたもので、学位に値すると思われる。