

## 胃癌における悪性腫瘍の家族内集積と p53蛋白 発現との関連に関する検討

防衛医科大学校第1外科

辻本 広紀 市倉 隆 玉熊 正悦

胃癌における悪性腫瘍の家族内集積と p53蛋白発現との関連を免疫組織学的に検討した。1989年～1993年までに当科で切除され、悪性腫瘍の家族歴を確認しえた初発胃癌342例を対象とした。第1度近親者に発端者以外に2人以上の悪性腫瘍罹患者を認めるものは22例(6.4%)で、家族に発生した悪性腫瘍は胃癌が圧倒的に多かった。家族に胃癌罹患者を2人以上持つ10例をA群、胃癌罹患者1人以下の12例をB群とし、第1度近親者に悪性腫瘍の家族歴を全く認めない対照群と比較すると、臨床病理学的因子に各群間の差はなかった。胃癌組織のパラフィン包埋切片を用い、p53蛋白、PCNAについて免疫組織化学染色を行うと、PCNA標識率では3群間に差はみられなかったが、p53蛋白陽性例はA群で80%、B群で75%と対照群の38%に比べ有意に高頻度であった( $p < 0.01$ )。胃癌組織のp53蛋白の検索は、家族における悪性腫瘍、とくに胃癌のハイリスク群を選別する上で意義あるものと考えられた。

**Key words:** gastric cancer, familial clustering of malignant neoplasms, p53 protein expression

### はじめに

胃癌発生のリスクファクターとして、胃癌の家族歴が挙げられているが<sup>1)~4)</sup>、胃癌症例における悪性腫瘍の家族内集積に関する詳細な検討はほとんどみられない。近年の遺伝子研究の進歩にともない、悪性腫瘍の家族内発生と遺伝子異常との深い関連が報告されている<sup>5)6)</sup>。Thorらは癌高発家系として報告されたLi-Fraumeni症候群患者の乳癌組織におけるp53蛋白陽性頻度が高いことを報告している<sup>7)</sup>。そこで我々は胃癌患者を発端者とする悪性腫瘍の家族内集積例につき、胃癌組織におけるp53蛋白の発現を免疫組織化学染色を用いて検討し、あわせてPCNA標識率を指標とした腫瘍増殖能との関連について検討した。

### 対象と方法

1989年1月より1993年12月までに当科において切除術が施行された初発胃癌453例中、悪性腫瘍の家族歴を確認しえた342例を対象とした。悪性腫瘍の家族内集積の定義を、Lynchが提唱したhereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)の概念に準じ<sup>8)</sup>、第1度近親者に発端者以外に2人以上の悪性腫瘍罹患者を認

めるものとする、対象症例中に悪性腫瘍の家族内集積を認めたものは22例(6.4%)であった。この22例中、悪性腫瘍罹患家族の2人以上が胃癌罹患者であった10例をA群、悪性腫瘍罹患家族のうち胃癌罹患者が1人以下であった12例をB群とした。第1度近親者に悪性腫瘍罹患者を全く認めない239例を対照群とし、これら3群間の臨床病理学的所見を比較した。次にA群10例、B群12例に、対照群のうちホルマリン固定時間および切除標本の保存期間が悪性腫瘍家族内集積例と一致する87例を加えた109例を対象として、p53蛋白およびproliferating cell nuclear antigen (以下、PCNA)を免疫組織化学染色し、各群間の特徴を比較検討した。

悪性腫瘍の家族歴に関しては、入院時に主治医が本人、家族より聴取し、不明な点は外来受診時あるいは電話により確認した。臨床病理学的所見は第12版胃癌取扱規程<sup>9)</sup>に基づき、統計学的解析にはStudent's T-testおよび $\chi^2$  testを用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

免疫組織化学染色：免疫組織化学染色にはStreptoavidin biotin complex (SAB) method (ニチレイヒストファインSAB-PO (M) キット)を用い、検体としては24時間の10%ホルマリン固定後パラフィン包埋された腫瘍組織標本を用いた。5 $\mu$ mの切片を作成

し、キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンの後、3% $H_2O_2$ 、正常ウサギ血清にて内因性 peroxidase 活性を阻害し、次に1次抗体として抗 p53 蛋白モノクローナル抗体 (PAb1801: Oncogene Science, Mineola, NY)、および抗 PCNA モノクローナル抗体 (PC10: Dakopatts, Denmark) をそれぞれ用い、37°C で2時間インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄の後、2次抗体として抗マウス免疫グロブリン抗体にて15分間インキュベートし、洗浄後、酵素抗体で5分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用い、対比染色には2%メチルグリーンを使用した。

p53 蛋白の染色性は、400倍視野にて鏡検し、核が特異的に染色された腫瘍細胞の割合が5%以上の場合を陽性と判定した。PCNA についてはその発現が最も高い領域において400倍視野で腫瘍細胞500個以上を検鏡し、核が特異的に濃染されている腫瘍細胞の割合を百分率で表し、PCNA 標識率とした。

### 結 果

A 群および B 群、すなわち悪性腫瘍家族内集積例における罹患家族をみると、父および母の両方が何らかの悪性腫瘍に罹患していたものが8例と最も多くみられ、これに次いで父と同胞の組み合わせが6例、同胞のみの組み合わせが4例と多くみられた。A 群は B 群と比較し同胞を含む組み合わせが多い傾向にあった(80% vs. 25%)。悪性腫瘍家族内集積例の家族に発生した悪性腫瘍の内訳をみると、胃癌が29例と圧倒的に多くみられた。これに次いで大腸癌、肺癌が各4例、肝癌3例、食道・咽頭癌、膀胱癌が各2例、皮膚癌、膀胱癌、乳癌、口腔癌、骨肉腫、臓器不明が各1例であった (Table 1)。悪性腫瘍罹患家族において、消化管の癌腫が占める頻度は70%であった。

臨床病理学的特徴: A 群, B 群, 対照群の3群の間で各臨床病理学的所見を比較すると、A 群および B 群では対照群に比較して分化型組織型の症例がやや多い傾向にあったものの、有意な差ではなかった。その他腹膜播種、肝転移、リンパ節転移、深達度、最大腫瘍径、脈管侵襲などにも差はみられなかった (Table 2)。

免疫組織化学染色: p53 蛋白, PCNA 両者とも核のみが染色され、細胞質、間質は染色されなかった。

p53 蛋白は免疫染色を行った109例中50例 (45.9%) に陽性であった。A 群では10例中8例 (80.0%)、B 群では12例中9例 (75.0%) に p53 蛋白陽性であり、対照群の陽性例が87例中33例 (37.9%) であったのに比べ

**Table 1** Malignant neoplasms found in the first degree relatives of patients who underwent resections for gastric cancer

Malignant neoplasms	No. of cases
Gastric cancer	29
Colorectal cancer	4
Lung cancer	4
Liver cancer	3
Esophageal and pharyngeal cancer	2
Pancreatic cancer	2
Others	6

**Table 2** Clinicopathologic features

	Group A (n=10)	Group B (n=12)	Control (n=239)
Sex			
male: female	6:4	10:2	155:84
Age	66.3±6.2	61.5±8.0	59.1±12.7
Location of tumor			
C	1 (10)	2 (17)	31 (13)
M	5 (50)	8 (67)	124 (52)
A	4 (40)	2 (17)	84 (35)
Histologic classification			
differentiated	7 (70)	7 (58)	118 (49)
undifferentiated	3 (30)	5 (42)	121 (51)
Depth of invasion			
t1	5 (50)	3 (25)	107 (45)
t2	4 (40)	2 (17)	66 (28)
t3,4	1 (10)	7 (58)	66 (28)
Lymph node metastasis			
n0	6 (60)	4 (33)	121 (51)
n1	2 (20)	3 (25)	65 (27)
n2,3	2 (20)	5 (42)	53 (22)
Liver metastasis			
negative	10 (100)	12 (100)	231 (97)
positive	0 (0)	0 (0)	8 (3)
Peritoneal metastasis			
negative	10 (100)	10 (83)	222 (93)
positive	0 (0)	2 (17)	17 (7)
Stage			
I	6 (60)	3 (25)	128 (54)
II	2 (20)	1 (8)	27 (11)
III	2 (20)	3 (25)	46 (19)
IV	0 (0)	5 (42)	38 (16)

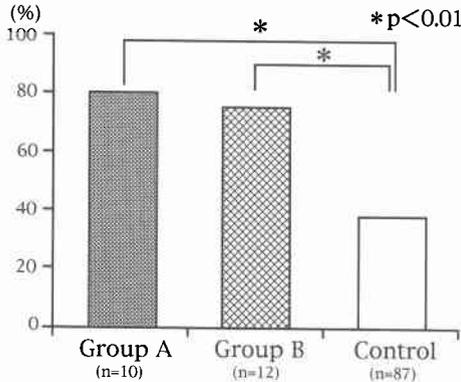
( )%

Group A: Patients who had two or more first degree relatives with gastric cancer Group B: Patients who had one or no first degree relatives with gastric cancer Control: Patients who had no first degree relatives with any malignant neoplasms

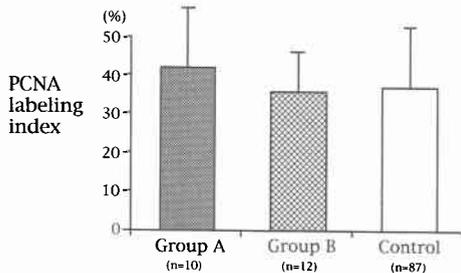
有意に高頻度であった (Fig. 1)。

PCNA 標識率 (%) の平均値 (Mean±SD) は A 群 41.8±15.0, B 群 35.0±14.5, 対照群 37.0±15.0 と、

**Fig. 1** Percentage of the patients with positive staining for the p53 protein



**Fig. 2** Immunohistochemical staining for the proliferating cell nuclear antigen (PCNA)



3群間に差はみられなかった (Fig. 2). p53蛋白の発現と PCNA 標識率との関係を見ると, p53蛋白陽性例の PCNA 標識率は  $40.2 \pm 14.8\%$ , p53蛋白陰性例では  $38.1 \pm 16.9\%$  と両者に有意な関連はみられなかった.

### 考 察

胃癌症例のうち, 悪性腫瘍家族内集積例では対照群と比較して, 臨床病理学的因子や PCNA 標識率には特徴がみられなかったが, 腫瘍組織の p53蛋白陽性の症例が有意に多かった. 著者らが検索した限り, 胃癌組織における p53蛋白発現と悪性腫瘍の家族内集積との関連についての報告はみられない. 今回使用した抗 p53蛋白モノクローナル抗体 PAb1801は野生型, 変異型 p53蛋白の両者を認識するが, 野生型 p53蛋白は変異型と比べて半減期がきわめて短いため, 陽性細胞の大部分は変異型 p53遺伝子産物の発現と考えられる<sup>10)11)</sup>. 事実, 免疫組織化学染色による p53蛋白の発現と p53遺伝子の点突然変異とは相関するとされている<sup>12)~15)</sup>. 胃癌組織における p53蛋白陽性症例の頻度は 40~60%と報告され<sup>15)~17)</sup>, また前原ら<sup>18)</sup>は胃癌腫瘍部

の遺伝子検索で p53遺伝子の存在する17番染色体短腕の40~60%に異常が認められたとしている. 今回の対象症例中, 免疫組織化学染色により胃癌組織の p53蛋白が陽性であったものは46%であり, これらの報告とほぼ一致する結果であった. p53遺伝子は p21蛋白の誘導, PCNA の mRNA の down regulation など, 細胞周期やアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた<sup>19)~21)</sup>. 悪性腫瘍においては, p53遺伝子が腫瘍の増殖, 進行に関与していると考えられ, 乳癌, 大腸癌, 膀胱癌, 頭頸部腫瘍などでは p53蛋白の発現と腫瘍の生物学的悪性度が関連するとされる<sup>22)~31)</sup>. 胃癌においても, p53蛋白の発現は腫瘍進行度と相関する, あるいは独立した予後因子となりうるなどの報告がみられる<sup>25)26)</sup>.

今回の検討では家族内に発生した悪性腫瘍は胃癌が圧倒的に多く, その他の悪性腫瘍はいずれも少数であった. すなわち悪性腫瘍家族内集積例での発癌要因は, それが環境因子であれ遺伝的要因であれ, 胃癌を発生させやすいものである. 一方, 家族の胃癌罹患者が2人以上の A 群と1人以下の B 群との間に p53蛋白陽性例の頻度の差がなかったことから, p53遺伝子異常は胃癌だけでなく他の悪性腫瘍とも何らかの関連を有するものと推測される. 乳癌, 卵巣癌, 肉腫などが多発する Li-Fraumeni 症候群<sup>5)32)33)</sup>における p53遺伝子の発癌への直接的な関与を, われわれの検討結果にそのまま当てはめることはできないであろう. 今回みられた腫瘍組織での p53遺伝子異常が悪性腫瘍の家族内発生の観点からいかなる意義を有するかを明らかにするためには, 今後非腫瘍部の背景胃粘膜や germline での遺伝子異常の検索が必要である. p53遺伝子異常が結果的に生じたものであったとしても, p53蛋白が陽性の胃癌症例では, 家族に対して悪性腫瘍とくに胃癌のハイリスク群としてスクリーニング検査を行うことにより, より早期に発見できる可能性があり, 胃癌組織における p53蛋白検索は意義あるものと考えられる.

### 文 献

- 1) Hoshino H, Hirayama T, Arimoto H et al: Gastric cancer risk factors: A case-control study based on medical records. *Jpn J Cancer Res* 76: 846-850, 1985
- 2) 野水 整, 土屋敦雄, 阿部力哉ほか: 家族性胃癌の検討. *日臨外医会誌* 48: 1597-1599, 1987
- 3) Hirayama T: Epidemiology of stomach cancer in Japan with special reference to the strat-

- egy for the primary prevention. *Jpn J Clin* 14 : 159-168, 1984
- 4) Tajima K, Tominaga S: Dietary habits and gastrointestinal cancers: A comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn J Cancer Res* 76 : 705-716, 1985
  - 5) Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K et al: Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348 : 747-749, 1990
  - 6) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253 : 665-669, 1991
  - 7) Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM et al: Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 84 : 845-855, 1992
  - 8) Lynch HT, Kimberling W, Albano WA et al: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 56 : 934-938, 1985
  - 9) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第12版. 金原出版, 東京, 1994
  - 10) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH et al: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8 : 531-539, 1988
  - 11) Scott EK, Kenneth WK, Suzanne JB et al: Mutant p53 proteins bind DNA abnormally *in vitro*. *Oncogene* 6 : 131-136, 1991
  - 12) Bartek J, Iggo R, Gannon J et al: Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5 : 893-899, 1990
  - 13) Iggo R, Gatter K, Bartek J et al: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 : 675-679, 1990
  - 14) Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD et al: Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 5006-5010, 1991
  - 15) 片岡正文, 岡林孝弘, 中島 明ほか: 大腸癌, 胃癌, 肺癌症例における癌抑制遺伝子 p53 の免疫組織学的検討および SSCP 法による点突然変異検出とその比較. *日消外会誌* 27 : 71-77, 1994
  - 16) 今野弘之, 丸山敬二, 丸尾祐司ほか: 多発胃癌の臨床病理学的特徴と p53 蛋白発現との関連. *日消外会誌* 28 : 2120-2124, 1995
  - 17) 田原栄一: 分子生物学から臨床への提言—消化器癌を中心として—. *日消外会誌* 27 : 735-742, 1994
  - 18) 前原喜彦, 大岩久夫, 劉 啓ほか: 胃癌における予後規定因子としての癌関連遺伝子異常—c-erbB-2 と p53 遺伝子について—. *日消外会誌* 26 : 2508-2511, 1993
  - 19) Jean M: Suppresses cell growth. *Science* 262 : 1644-1645, 1993
  - 20) Mercer WE, Shields MT, Lin D et al: 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
  - 21) 宮本美知子: 癌遺伝子と癌抑制遺伝子—p53—. *医のあゆみ* 171 : 380-382, 1994
  - 22) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER et al: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249 : 912-915, 1990
  - 23) Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H et al: Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 82 : 835-840, 1991
  - 24) Ostrowski JL, Sawan A, Henry L et al: p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: An immunohistochemical study. *J Pathol* 164 : 75-81, 1991
  - 25) Starzynska T, Bromley M, Ghosh A et al: Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 66 : 558-562, 1992
  - 26) Martin HM, Filipe MI, Morris RW et al: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50 : 859-862, 1992
  - 27) Lipponen PK: Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 53 : 365-370, 1993
  - 28) Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A et al: Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst* 84 : 883-887, 1992
  - 29) Frank JL, Bur ME, Garb JL et al: p53 tumor suppressor oncogene expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Cancer* 73 : 181-186, 1994
  - 30) Shin DM, Kim J, Ro JY et al: Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54 : 321-326, 1994

- 31) Frankel RH, Bayona W, Koslow M et al: p53 mutations in human malignant gliomas: Comparison of loss of heterozygosity with mutation frequency. *Cancer Res* 52 : 1427—1433, 1992
- 32) Malkin D, Li FP, Strong LC et al: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250 : 1233—1238, 1990
- 33) Li FP, Fraumeni JF: Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71 : 747—752, 1969

### Correlation between Familial Clustering of Malignant Neoplasms and Expression of the p53 Protein in Gastric Cancer

Hironori Tsujimoto, Takashi Ichikura and Shoetsu Tamakuma  
First Department of Surgery, National Defense Medical College

The purpose of this study was to determine the correlation between familial clustering of malignant neoplasms and expression of the p53 protein in gastric cancer. We made a survey of the family history of malignant neoplasms in 342 patients who underwent resections for gastric cancer from 1989 to 1993. Twenty-two patients had two or more first degree relatives with malignant neoplasms. They were divided into two groups: Group A consisting of 10 patients with two or more first degree relatives with gastric cancer, and Group B consisting of 12 patients with one or no first degree relative with gastric cancer. Two hundred and thirty-nine patients who had no relatives with any malignant neoplasms were used as the control group. There were no significant differences in the clinicopathologic features among the three groups. Formalin-fixed paraffin-embedded specimens of the tumor were stained immunohistochemically for the p53 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Staining for the p53 protein was positive in 80% of the patients in Group A, 75% in Group B and 38% in the control group. There were statistically significant differences between Group A and the control group and between Group B and the control group ( $p < 0.01$ ). We could not find any difference in the PCNA labeling index among the three groups. In conclusion, immunohistochemical staining for the p53 protein of the tumor tissue in patients with gastric cancer may be useful for detecting the risk for malignant neoplasms in their families.

**Reprint requests:** Hironori Tsujimoto First Department of Surgery, National Defense Medical College  
3-2 Namaki, Tokorozawa, 359 JAPAN

---