

2, 3型進行胃癌に対する p53異常蛋白発現の臨床的意義と予後

県立がんセンター新潟病院外科

梨本 篤 佐々木壽英 田中 乙雄
筒井 光広 土屋 嘉昭 牧野 春彦

他病死を除いた2, 3型進行胃癌106例を対象に, p53蛋白の異常発現を免疫染色法(ABC法)にて解析し, 臨床病理学的諸因子と対比しながら予後因子になりうるか否かを検討した。なお, p53陽性細胞が10%以上を陽性, 10%未満を陰性と判定した。成績: ① p53蛋白の陽性率は47.2%であった。② p53陽性例の遠隔成績(5生率40.0%)は, p53陰性例(5生率60.7%)より明らかに不良であった。③ 単因子解析ではリンパ節郭清度, 占居部位, T因子, N因子, P因子, H因子, t因子, n因子, ly, v, 根治度, p53が予後因子であった。④ Coxの比例ハザードモデルによる多変量解析では, 根治度>>リンパ節転移(n)>占居部位の順に予後に影響を与えていた。結語: 免疫組織染色による検討にて, p53は独立した予後因子にはなりえないが, 予後不良な2, 3型進行胃癌症例の予測が可能であり, 拡大リンパ節郭清などの拡大手術や intensive chemotherapy の適応を決定する上で参考となりうる。

Key words: p53, prognostic factors, gastric cancer, immunohistochemistry

はじめに

癌抑制遺伝子は, 細胞の増殖・分化に関連した遺伝子であり, 突然変異や対立遺伝子の欠失により正常な機能が欠落することによって癌化に関与していると考えられている。癌抑制遺伝子の1つである p53遺伝子は, 染色体の短腕(17p)に存在する。また, p53遺伝子の産物である p53蛋白発現は核内に局在し, 細胞周期の負の制御, DNAの複製・転写の調節などに関与しているとされている¹⁾。その野生型 p53蛋白は細胞周期がG1期からS期への回転を抑制するため, 細胞増殖を抑制し, アポトーシスを促進するが²⁾, 変異型 p53蛋白はアポトーシスを促進する能力を失い, 癌化誘導能があるとされている。早期胃癌の遠隔成績は良好であり, 進行胃癌でも4型の遠隔成績は特に不良である。進行胃癌の中で2, 3型は最も遭遇する機会が多い。p53蛋白発現がこれらの予後因子になりえるならば, 化学療法効果自体が controversial な状況下ではあるが, intensive chemotherapy の適応を決定する上での参考になると思われる。

そこで今回は進行胃癌の中でも最も頻度が高く, 腫瘍細胞が豊富で密なため検索がしやすい2, 3型進行胃癌を対象とした。p53蛋白異常発現の有無をホルマ

リン固定切除標本を用いて解析し, 臨床病理学的諸因子と対比しながら2, 3型進行胃癌の予後因子になりえるか否かを検討した。

対象と方法

1. 対象

1988年1月からの2年間に県立がんセンター新潟病院外科で連続して切除された2, 3型進行胃癌122例のうち, 他病死を除く106例を対象にした。術後の観察期間は中央値7.6年(6.4年~8.6年)であり, 全例術後5年経過例である。男女比は70対36で, 平均年齢は62.7歳(27~88歳)であった。術式は胃全摘41例, 胃亜全摘65例で, リンパ節郭清度はD0 1, 12例, D2 58例, D3 36例であった。手術的進行度はStage Ib 12例, Stage II 8例, Stage IIIa 17例, Stage IIIb 23例, Stage IVa 8例, Stage IVb 38例であり, 総合的根治度は根治度A 27例, 根治度B 57例, 根治度C 22例であった。

2. p53蛋白免疫組織染色

免疫組織学的検索はマウス抗ヒト抗p53蛋白モノクローナル抗体DO-1(IMMUNOTECH社製)を用いた。まずホルマリン固定されたパラフィン包埋薄切標本の脱パラフィン操作を行い, トリプシン処理を37°Cで10~20分行った。次に, 10mMクエン酸緩衝液(pH 6)にいれ, 5分マイクロウェーブオープンにかけ3~4回繰り返して加熱処理し, p53蛋白の抗原の賦活を行った。DO-1を用いて avidin-biotin-peroxidase

complex 法(ABC 法)にて免疫組織化学染色し, DAB にて発色して検鏡した(Fig. 1). 1次抗体 DO-1は100倍希釈液を用いて1時間反応させた. 核が明瞭に染まった割合が50%以上を(++), 10以上50%未満を(+), 10%未満を(+), 陰性を(-)として, (++) 以上,

すなわち, p53陽性細胞が10%以上を陽性, 10%未満を陰性と判定した.

統計学的な有意差検定は χ^2 検定, Student t 検定を用い, 生存曲線は Kaplan-Meier 法, その生存率解析は log-rank test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した. なお, 記載形式は胃癌取り扱い規約12版⁹⁾に準じた.

成績

1. p53蛋白陽性率
p53陰性群は(-)が43例, (+)が13例であり, p53陽性群は(++)が28例, (++)が22例で計50例(p53陽性率47.2%)であった(Table 1).
2. p53陰性例と p53陽性例の臨床病理学的な特徴

Fig. 1 Immunohistochemical staining for the p53 protein using monoclonal antibody DO-1 ($\times 400$). (a) A well differentiated tubular adenocarcinoma with high p53 immunoreactivity in the majority of cancer cell nuclei. (b) A well differentiated tubular adenocarcinoma with low p53 immunoreactivity in the only a few tumor cell nuclei

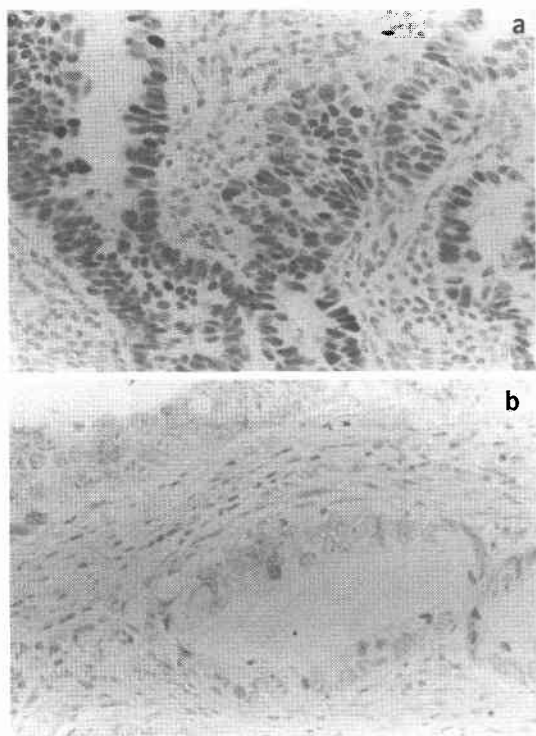


Table 1 Grade of p53 immunoreactivity of positive tumor cell nuclei in 106 specimens of gastric adenocarcinoma

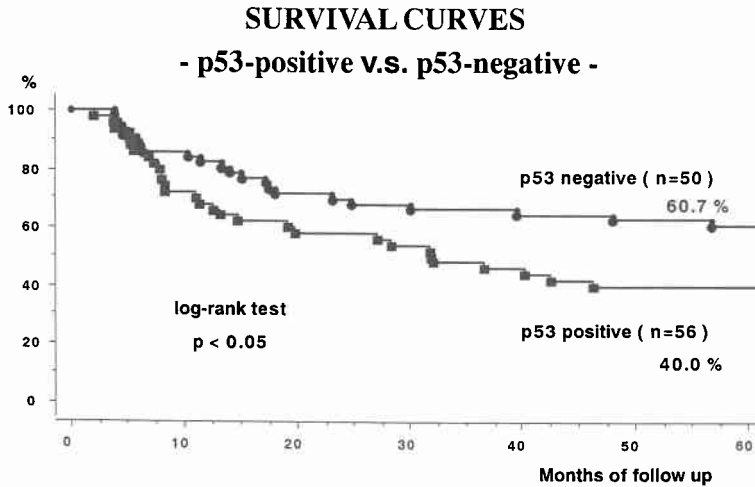
	negative		positive	
	(-)	(+)	(++)	(+++)
No. of specimens	43	13	28	22
(%)	(52.8%)		(47.2%)	

(-) : negative, (+) : less than 10%, (++) : more than 10% and less than 50%, (+++) : more than 50%

Table 2 Preoperative clinicopathological characteristics comparing p53 positive group and negative group

Variable	p53 positive (N=50)	p53 negative (N=56)	
LN dissection			
D0,1	7(14%)	5(9%)	NS
D2,3	43(86%)	51(91%)	
T			
2,3	37(74%)	44(79%)	NS
4	13(26%)	12(21%)	
P			
(-)	41(82%)	48(86%)	NS
(+)	9(18%)	8(14%)	
H			
(-)	43(86%)	52(93%)	NS
(+)	7(14%)	4(7%)	
N			
(-)	4(8%)	6(11%)	NS
(+)	46(92%)	50(89%)	
t			
2	18(36%)	21(38%)	NS
3,4	32(64%)	35(62%)	
n			
(-)	9(18%)	14(25%)	NS
(+)	41(82%)	42(75%)	
ly			
0,1	30(60%)	38(68%)	NS
2,3	20(40%)	18(32%)	
v			
(-)	30(60%)	31(55%)	NS
(+)	20(40%)	25(45%)	
stage			
I~III	25(20%)	33(59%)	NS
IV	25(50%)	23(41%)	
curability			
A, B, C	37(74%)	47(84%)	NS
	13(26%)	9(16%)	
location			
A, M, C	46(92%)	55(98%)	NS
AMC	4(8%)	1(2%)	

Fig. 2 Survival curves of type 2, 3 advanced gastric cancer patients after surgical resection according to the presence or absence of p53 protein overexpression



免疫組織染色の結果にて p53陰性群と陽性群にわけ、両群間の臨床病理学的な背景因子（性別、年齢、術式、占居部位、リンパ節郭清度、T 因子、P 因子、H 因子、N 因子、肉眼型、t 因子、n 因子、ly、v、進行度、根治度、組織型、腫瘍マーカーなど）について比較検討したが、どの因子にも有意差はみられなかった (Table 2)。

3. 遠隔成績

① 対象症例全体の遠隔成績

1 生率は75.5%，5 生率は50.9%であった。

② 肉眼型別遠隔成績

2 型胃癌では1 生率77.0%，5 生率55.7%であり、3 型胃癌では50%生存期間3.2年、1 生率73.3%，5 生率44.4%であった。3 型胃癌に比べ2 型胃癌の予後が若干良好であったが、両群間に有意差は見られなかった。

③ p53蛋白発現別遠隔成績

p53陰性群の遠隔成績は、1 生率82.1%，5 生率60.7%であり、p53陽性群では50%生存期間2.6年、1 生率68.0%，5 生率40.0%であった。p53陰性群の遠隔成績は p53陽性群に比べ明らかに良好であった (p < 0.05) (Fig. 2)。

4. 予後因子に対する単因子解析

種々の臨床病理学的な因子を単因子解析したところ、リンパ節郭清度、占居部位、T 因子、N 因子、P 因子、H 因子、t 因子、n 因子、ly、v、根治度、p53が予

後因子であるとの結果を得た。しかし、腫瘍マーカー (CEA, CA19-9, CA125)、年齢、性別、術式、他臓器合併切除、肉眼型、組織型と予後との相関は認められなかった。また、進行度は種々の因子を含んでいるため今回は検討項目から除外した (Table 3)。

5. 多変量解析

リンパ節郭清度、占居部位、P 因子、H 因子、t 因子、n 因子、v、根治度、p53の9 因子を選択し、Cox の比例ハザードモデルを用いて多変量解析を施行したところ、2, 3 型進行胃癌に対しては、根治度、n 因子、占居部位が独立した予後因子であることが確認された。しかし、p53は独立した予後因子としては認められなかった (Table 4)。

考 察

p53遺伝子の変異は癌腫において最も多くみられる遺伝子変異の1つであり、癌腫の発生、増殖に関与しているとされている。日常の病理組織検索に用いているパラフィン固定標本での p53免疫組織学的染色の結果は、迅速標本での免疫組織学的染色や遺伝子レベルの解析とよく相関する。このことは、p53蛋白の検討方法として、一般病院でも日常の病理組織学的検査で使用しているパラフィン固定標本での免疫組織学的染色が利用できることを意味し、胃癌に対する p53スクリーニングが容易になってきたことを意味する。p53蛋白遺伝子コードの変異が p53異常発現を引き起こし癌腫の予後不良の一因になっているとされている。

Table 3 Univariate analysis of the relationship between clinicopathological characteristics and survival in 106 patients with type 2,3 advanced gastric cancer.

Clinicopathological variable				p-value
LN dissection	D0,1	vs	D2,3	p<0.01
T	T2,3	vs	T4	p<0.01
P	(-)	vs	(+)	p<0.01
H	(-)	vs	(+)	p<0.01
N	(-)	vs	(+)	p<0.05
t	t2	vs	t3,4	p<0.01
n	(-)	vs	(+)	p<0.05
ly	0,1	vs	2,3	p<0.01
v	(-)	vs	(+)	p<0.01
stage	I~III	vs	IV	p<0.01
curability	A,B	vs	C	p<0.01
location	A,M,C	vs	AMC	p<0.05
p53	(-)	vs	(+)	p<0.05
age				NS
gender	male	vs	female	NS
ope. procedures	total	vs	subtotal	NS
combined resection of other organs	(-)	vs	(+)	NS
gross type	type 2	vs	type 3	NS
histology	diff	vs	undiff	NS
CEA	≥5.0	vs	<5.0	NS
CA19-9	≥40	vs	<40	NS
AFP	≥10	vs	<10	NS

Table 4 Multivariate analysis (Cox proportional hazards model, P to remove 0.05) of prognostic covariates of survival in 106 patients with type 2,3 advanced gastric cancer.

Variables	Coefficient	χ^2	p-value
Curability	1.97	19.51	9.88E-006
Nodal metastases	0.93	5.77	0.016
Tumor location	1.16	3.97	0.046
Liver metastases	0.84	3.02	0.082
Nodal dissection	0.45	1.03	0.309
Depth of invasion	0.26	0.46	0.498
p53	0.11	0.14	0.71
Peritoneal dissemination	0.15	0.11	0.735
Venous permeation	0.06	0.03	0.867

p53蛋白がすでに確立しているどのような予後因子と関連しているのか、また、p53蛋白が胃癌の予後因子に成りえるのか否かを中心に検討を加えた。

1. 臨床病理学的因子との関連

胃癌においては p53蛋白の異常発現がリンパ節転移

と密接に関連していたとの報告^{4)~6)}が多く、肝転移や遠隔転移とも関連しているため、早期再発死亡を予測する指標になり得ると指摘されている。しかし、一方でリンパ節転移との関係はなかったとの報告^{7)~10)}も少なくない。組織型では intestinal type に p53陽性率が高い⁶⁾⁷⁾⁹⁾とする一方で、diffuse type との間に差はなく組織型は関連がなかったとしており¹⁰⁾、われわれの結果でも組織型との関連はなかった。Takeji ら⁶⁾は、p53陽性群に DNA ploidy pattern では aneuploid が高率であり、腫瘍の増殖活性の指標である Ki-67の陽性細胞率も高率であることより、変異型 p53陽性胃癌は高度増殖活性を有しているとしている。深達度についても p53との関連については賛否両論に分かれている。Gabbert ら⁹⁾は静脈侵襲およびリンパ管侵襲と p53の関連が認められ、かつ静脈侵襲とリンパ管侵襲は胃癌に対し独立した予後因子であるとしている。われわれも p53陰性群と p53陽性群に分けて、性別、年齢、術式、占居部位、リンパ節郭清度、T 因子、P 因子、H 因子、N 因子、肉眼型、t 因子、n 因子、ly、v、進行度、根治度、組織型、腫瘍マーカーなどの臨床病理学的諸因子と p53との関係を検討したが、どの因子にも p53との関連性は認められなかった。

2. p53異常蛋白の発現率

免疫組織化学的染色法の進歩により、腫瘍マーカー、増殖因子や癌遺伝子なども容易に染色されるようになってきた。モノクローナル抗体 DO-1は野生型 p53蛋白にも変異型 p53蛋白にも反応するが、癌腫周囲の正常胃粘膜とは反応しなかった。野生型 p53蛋白は半減期が数十分と非常に短く、実際には半減期の長い変異型 p53蛋白が主に免疫組織染色される。p53遺伝子異常は免疫染色でも PCR 解析でも検索できる。Isobe ら¹¹⁾は免疫染色による p53の異常蛋白の発現は予後因子になりえたが、PCR 解析による p53遺伝子突然変異は予後因子にはなりえなかったとしている。しかし、p53の遺伝子変異と p53異常蛋白の発現は必ず一致するとは限らないものの、一致率は66.7%~84.6%と高率である^{11)~13)}。胃癌に対する p53遺伝子の免疫組織学的な検討では39.0%~57.5%の発現率であり^{4)~10)}、われわれの症例でも47.2%の p53免疫染色陽性率を得た。遺伝子レベルの解析では PCR-SSCP 法で26%¹²⁾、PCR-DGGE 法で37%¹¹⁾、17p の対立遺伝子の欠失解析で33.3%¹³⁾、に p53遺伝子の突然変異 (point mutation) を認めている。以上の結果をみる限り p53遺伝子異常の検索では、免疫組織学的検索のほうが遺伝子レベル

の解析よりもやや高率にでるようである。p53陽性率は肺癌54%¹⁴⁾, 43.0%¹⁵⁾, 大腸癌61.0%¹⁶⁾, 42.0%¹⁷⁾, 乳癌27%¹⁸⁾などであり他臓器の癌でも同様の機序が想定される。

3. 予後因子

腫瘍の占居部位については、胃上部の予後が不良であったとの報告はあるものの、占居部位は予後に関連がないとの報告⁶⁾⁹⁾のほうが多い。われわれは胃全体を占める胃癌の予後が、胃上部、中部、下部を占居部位とする腫瘍よりも予後不良であるとの結果を得た。進行度、リンパ節転移、遠隔転移などの因子は予後と密接な関連をもっているとする報告^{4)5)7)~10)}が多い。われわれも2, 3型進行胃癌に限定はしているものの、根治度、リンパ節転移、腫瘍の占居部位が予後因子であることを確認した。p53蛋白がこれらの予後因子と関連が深ければ、p53蛋白が予後に影響を及ぼすのは当然のこととして理解できる。しかし、Martinら⁹⁾やJoypaulら¹⁰⁾は多変量解析の結果にてリンパ節転移、進行度、遠隔転移の有無、などの予後因子とは全く独立した質の異なる予後因子であるとしている。しかし、Starzynskaら⁴⁾やVictorzonら⁷⁾はp53異常蛋白陽性群の予後は不良であるが、p53が独立した予後因子には成りえないとしている。われわれの解析でも同様に、単因子解析ではp53異常蛋白発現は予後不良因子となりえたが、多変量解析の結果では、p53は予後不良因子とは断定できず、独立した予後因子とはいえなかった。胃癌以外の癌腫(乳癌、肺癌、大腸癌、肝癌など)においてもp53蛋白の異常は確認されており、p53が予後不良因子であるとの報告¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾が多いものの、予後との関連性はなかったとの報告¹⁴⁾もあり、まだ controversialな状態である。

分子生物学の進歩により癌関連遺伝子の研究が飛躍的に進歩し、消化器癌の分野でも新しい癌遺伝子の研究が進められている。しかし、その臨床応用がなされ、十分に日常の診療に取り込まれているとはいえない。生検材料からp53異常蛋白発現を知ることができれば、2, 3型進行胃癌の中でも予後不良な症例を術前より予測することができ、十分なリンパ節郭清を初めとする拡大手術やintensive chemotherapyの適応を決定する上で参考になりえる。今後、一般施設でも臨床診断や治療の面で手軽に利用できるよう体制が整備されることを期待したい。

稿を終えるにあたり、ご多忙中、パラフィン固定標本のp53蛋白免疫組織染色および検鏡を快く引き受けていた

だいた当院研究部病理科の本間慶一先生に深謝致します。

文 献

- 1) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER et al: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249: 912-915, 1990
- 2) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T et al: p53 independent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967, 1993
- 3) 胃癌研究会: 胃癌取扱い規約. 改訂12版. 金原出版, 東京, 1993
- 4) 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
- 5) Martin HM, Filipe MI, Morris RW et al: p53 expression and prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 50: 859-862, 1992
- 6) Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S et al: Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 67: 589-593, 1993
- 7) Victorzon M, Nordling S, Haglund C et al: Expression of protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 32: 215-220, 1996
- 8) Songun I, van de Velde CJH, Hermans J et al: Expression of oncoprotein and the amount of eosinophilic and lymphocytic infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer. *Br J Cancer* 74: 1783-1788, 1996
- 9) Gabbert HE, Muller W, Schneiders A et al: The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 76: 720-726, 1995
- 10) Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL et al: The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 69: 943-946, 1994
- 11) Isobe T, Hiyama K, Yoshida Y et al: Prognostic significance of p53 and ras gene abnormalities in lung adenocarcinoma patients with stage I disease after curative resection. *Jpn J Cancer Res* 85: 1240-1246, 1994
- 12) Umekita Y, Kobayashi K, Sahiki T et al: Nuclear accumulation of p53 protein correlates with mutation in the p53 gene on archival paraffin embedded tissue of human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 85: 825-830, 1994
- 13) Seruca R, David L, Holm R et al: p53 mutation in gastric carcinomas. *Br J Cancer* 65:

- 708—710, 1992
- 14) McLaren R, Kuzu I, Dunnill M et al: The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* **66**: 735—738, 1992
- 15) Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL et al: Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* **52**: 4828—4831, 1992
- 16) Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S et al: Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* **70**: 2778—2784, 1992
- 17) Scott N, Sagar P, Stewart J et al: p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* **63**: 317—319, 1991
- 18) Davidoff AM, Herndon JE, Kerns BJM et al: Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* **110**: 259—264, 1991

Significance of Abnormal Expression of p53 Protein as a Prognostic Factor in Patients with Type 2, 3 Advanced Gastric Cancer

Atsushi Nashimoto, Juei Sasaki, Otsuo Tanaka, Mitsuhiro Tsutsui,
Yoshiaki Tsuchiya and Haruhiko Makino
Division of Surgery, Niigata Cancer Center Hospital

The prognostic value of overexpression of p53 protein was evaluated in 106 consecutive patients with type 2, 3 gastric cancer. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues of gastric adenocarcinomas were stained with anti-p53 protein monoclonal antibody DO-1 and immunohistochemical study was carried out by the avidin-biotin complex method. Results: A high level of immunoreactivity (more than 10% of the cell nuclei staining positively) was shown in 50 patients (47.2%), suggesting the presence of a mutated form of p53. No correlation between p53 overexpression and clinicopathological factors was found. In univariate analysis, p53 immunoreactivity correlated significantly with survival ($p < 0.05$). The 5-year survival rate in the p53 high level group was 40.0% compared with 60.7% in the p53 low level group. In multivariate analyses, curability, lymph nodal metastases and tumor location emerged as independent prognostic factors, whereas p53 immunoreactivity did not ($p = 0.71$). In conclusion, p53 overexpression is not an independent prognostic factor in patients with type 2, 3 gastric cancer. But the analysis of p53 overexpression will be useful for the selection of high-risk patients and for indication for postoperative intensive therapy.

Reprint requests: Atsushi Nashimoto Division of Surgery, Niigata Cancer Center Hospital
2-15-3 Kawagishicho, Niigata, 951-8133 JAPAN
