

食道扁平上皮癌早期病変の p53 遺伝子変異に関する研究

坪 井 清 孝

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野

(指導: 青柳 豊教授)

Study of the p53 mutations in Early Stage of Esophageal Squamous Carcinoma

Kiyotaka Tsuboi

Division of Gastroenterology and hepatology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)

要 旨

食道扁平上皮癌は異形成 (dysplasia) と呼ばれる異型扁平上皮を前癌病変とし、それが上皮内癌 (carcinoma *in situ*: CIS) を経て浸潤癌に進行すると考えられている。Dysplasia は軽度 (low-grade dysplasia: LGD) と高度 (high-grade dysplasia: HGD) に大別されるが、そのいずれが、食道扁平上皮の発癌早期段階かは明かではない。このことを明らかにするため、本研究では、食道扁平上皮癌で高頻度にみられる p53 遺伝子異常に着目し、扁平上皮癌とそれに併存する上皮内腫瘍 (LGD, HGD, CIS) の p53 遺伝子変異および同蛋白過剰発現を検討した。内視鏡的摘除ホルマリン固定食道扁平上皮癌 10 例 (粘膜固有層浸潤癌: M 癌 4 例, 粘膜下層浸潤癌: SM 癌 6 例) を対象とし、LGD, HGD, CIS, M 癌部, S M 癌部別に p53 免疫染色を評価し、それぞれの領域からマイクロダイセクションにより DNA を抽出し、p53 遺伝子のエクソン 5～8 を PCR で増幅し、シーケンス解析により同遺伝子変異を検索した。p53 遺伝子変異は LGD の 83.3 %, HGD の 50.0 %, CIS の 71.4 %, 浸潤癌部の 50.0～75.0 % に認められた。LGD と HGD では、1 例を除き、同一病変内に併存する CIS および浸潤癌部と変異コドンが共通するか、もしくは両者とも wild-type であった。これらのことから、p53 遺伝子変異の観点からみた限りは、LGD および HGD は同一病変内の CIS や浸潤癌部と組織発生的連続性があることが推定された。同一病変内の CIS と浸潤癌部では遺伝子変異は単一の変異コドンに生じていたが、LGD と HGD では変異コドンに多様性 (複数の変異コドンが存在) がみられた。LGD と HGD は異なる p53 遺伝子変異を持つ複数の細胞集団から構成され、それらがクローン選択を経て均一な p53 遺伝子変異パターンを持つ CIS となり、粘膜固有層へ浸潤すると考えられた。本研究結果から、LGD の段階で既に CIS や浸潤癌と共通する p53 遺伝子変異を来した細胞集団が含まれていることが推定され、LGD を食道扁平上皮の発癌早期段階とし位置づけることが可能であり、LGD に対しては積極的な臨床対応が必要と考えられた。

キーワード: 食道癌, 扁平上皮癌, 上皮内腫瘍, p53, 遺伝子変異, 免疫染色

Reprint requests to: Kiyotaka Tsuboi
Division of Gastroenterology and hepatology
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野
坪井 清孝

緒 言

食道癌は、組織学的に扁平上皮癌と腺癌とに大別される¹⁾。前者は食道粘膜を覆う固有組織である扁平上皮を発生母地とし、後者は逆流性食道炎などで傷害を受けた食道扁平上皮粘膜の再生過程で発生する²⁾ 円柱上皮(パレット上皮もしくはパレット食道³⁾)を発生母地とする。日本人食道癌の90%以上は扁平上皮癌であり⁴⁾、同癌は日本人全癌死亡の3.6%を占め、男性では肺癌、胃癌、結腸癌、肝臓癌、膵癌に次いで6番目に罹患率が高い悪性腫瘍である⁵⁾。食道扁平上皮癌は、消化管癌の中では予後不良疾患で、5年生存率は20~45%と報告されており⁶⁾⁷⁾、その治療成績向上のために早期発見と治療とが必要となる。食道扁平上皮癌は、従来より異形成(dysplasia)と呼ばれる異型扁平上皮を前癌病変とし、それが上皮内癌(carcinoma in situ: CIS)を経て浸潤癌へ進行すると考えられてきたが¹⁾⁸⁾、ヨード染色⁹⁾や近年の狭帯域内視鏡システム(narrow band imaging: NBI)¹⁰⁾をはじめとする内視鏡技術の進歩により、こうした前癌病変または発癌早期病変の発見が可能となってきた。しかしそれに伴い、発癌早期のどの段階の病変から治療対象とすべきかが新たな問題として提起されるようになってきた。dysplasiaは軽度と高度(low-grade dysplasia: LGDとhigh-grade dysplasia: HGD)とに大別され、後者はCISと同質とみなされ治療対象とされるが¹¹⁾¹²⁾、前者の臨床的取扱いについては一定のコンセンサスは得られていない¹¹⁾¹²⁾。

p53遺伝子は染色体17p13に存在する癌抑制遺伝子で、野生型p53蛋白は細胞周期やアポトーシスを制御し、DNA修復などゲノムの安定性維持に重要な役割を果たしている¹³⁾。その遺伝子変異は多くのヒト癌の発生に関与していると考えられており¹⁴⁾¹⁵⁾、食道扁平上皮癌でも40~80%^{16)~19)}にp53遺伝子変異が報告されている。変異型p53蛋白は野生型に比べ細胞内での分解時間が著しく遅延し核内に蓄積されるため²⁰⁾、免疫組織学的に蛋白過剰発現として同定することができる²¹⁾。食道扁平上皮癌では57~83%^{17)22)~26)}にp53

蛋白過剰発現があり、更にdysplasiaの55~92%^{22)~24)26)27)}にも同蛋白過剰発現がみられることから、p53遺伝子変異は食道扁平上皮癌の発癌早期段階で起きると想定され、同蛋白過剰発現は発癌早期段階の病変を診断するための有用な分子病理マーカーとして期待されている^{22)~24)26)27)}。しかし、これまでの研究では、p53遺伝子変異を伴う発癌早期段階がLGD、HGDのいずれの病変に相当するのか、またそれらが癌の直接の前段階なのかどうか、については必ずしも明確にはされていない。癌と同一のp53遺伝子変異がLGDの段階から生じているのであれば、LGDも積極的な治療対象とみなすべきであるが、分子病理学的研究成果が臨床的取扱い指針決定には反映されていないのが現状である。本研究はこれらのことを明らかにするため、食道扁平上皮癌と同一病変内に存在するdysplasiaをLGDとHGDとに分け、それらと癌におけるp53蛋白過剰発現、およびp53遺伝子変異について検討した。

材料と方法

1. 検討対象

内視鏡的摘除ホリマリン固定食道扁平上皮癌10例(粘膜固有層浸潤癌:M癌4例、粘膜下層浸潤癌:SM癌6例)を対象とした。M癌は異型扁平上皮が粘膜固有層に間質反応を伴い下方進展するもの、もしくは粘膜固有層に異型扁平上皮細胞巣が遊離するものとした(図1-A)。癌の進展範囲が粘膜筋板内にとどまるものもM癌とした。SM癌は異型扁平上皮の進展が粘膜筋板を通過したものとし、食道腺導管内進展が疑われるものは後述する免疫染色の評価および遺伝子検索からは除外した。非浸潤性腫瘍(以下、上皮内腫瘍)は、軽度異形成(low-grade dysplasia: LGD)、高度異形成(high-grade dysplasia: HGD)、上皮内癌(carcinoma in situ: CIS)に分類した¹⁾²⁸⁾。LGDは紡錘形~腫大卵円形・円形の濃染核を持つ異型細胞の高密度増生領域が扁平上皮の下方1/2までにどとまり、表層細胞分化(細胞の小型化、N/C比の低下、細胞密度の低下)がみられる

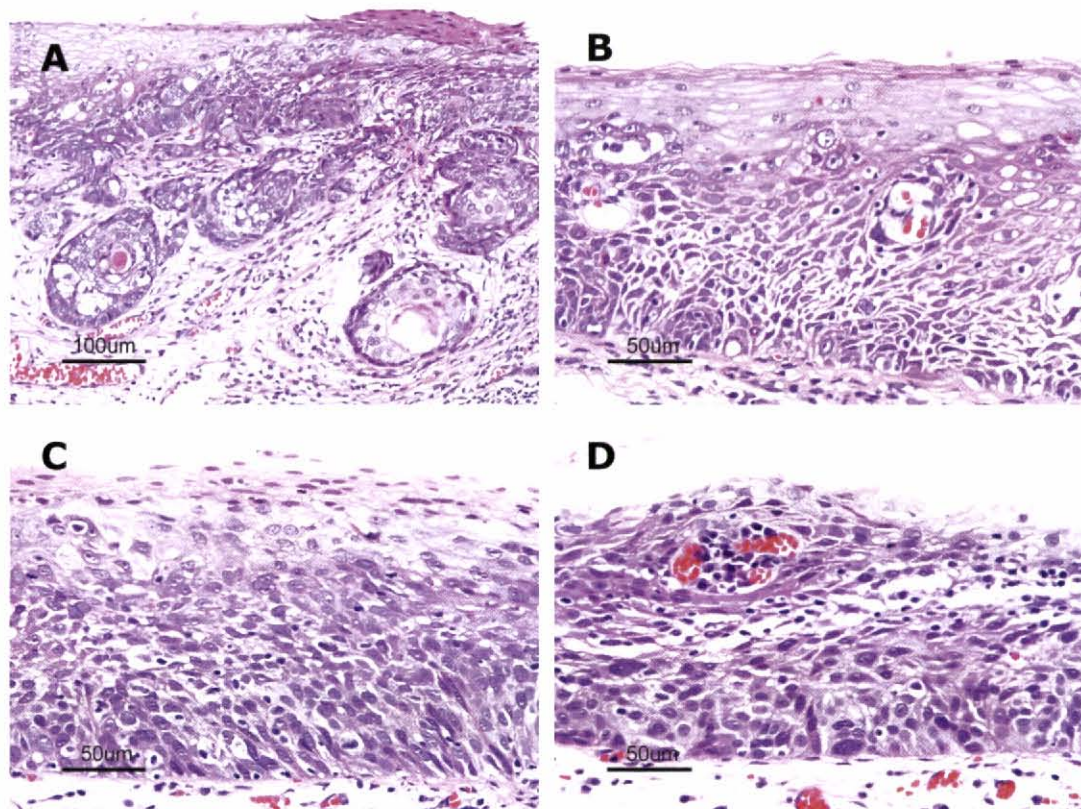


図1 食道扁平上皮性腫瘍の分類

- A：粘膜固有層浸潤癌。大型の卵円形核を持つ異型扁平上皮が間質反応を伴い粘膜固有層に下方進展している。
- B：軽度異形成（low-grade dysplasia, LGD）。異型細胞の高密度増殖巣が上皮の下方 1/2 までにとどまる。
- C：高度異形成（high-grade dysplasia, HGD）。異型細胞の高密度増殖巣が上皮の下方 1/2 以上を占めるが、最表層では細胞分化がある。
- D：上皮内癌（carcinoma *in situ*, CIS）。異型細胞が上皮全層を占める。

もの（図1-B）、HGDは同異型細胞が扁平上皮の下方 1/2 以上を占めるが、最表層では細胞分化がみられるもの（図1-C）、CISは同異型細胞が扁平上皮全層を占めるもの（図1-D）、とした。2000年改訂のWHO分類¹⁾では、上皮内腫瘍を低異型度上皮内腫瘍（low-grade intraepithelial neoplasia）と高異型度上皮内腫瘍（high-grade intraepithelial neoplasia）に2分し、CISは後者に含めるとしているが、本検討ではp53遺伝子異常が生じる発癌早期段階の詳細な検討を目的とした

ため、CISは独立した病変として扱った。癌の発生部位、および組織型と肉眼型の分類は、食道癌取扱規約²⁹⁾に従った。内視鏡摘除以前に放射線または化学療法が施行されていたものは対象から除外した。対象例は全例階段全剖パラフィン包埋ブロックを作製し、HE染色と免疫染色用3µm切片および遺伝子検索性10µm切片3枚、の連続切片を作製した。HE染色標本で病変の組織学的検索を行い、組織診断領域別のマッピングを作成した（図2）。

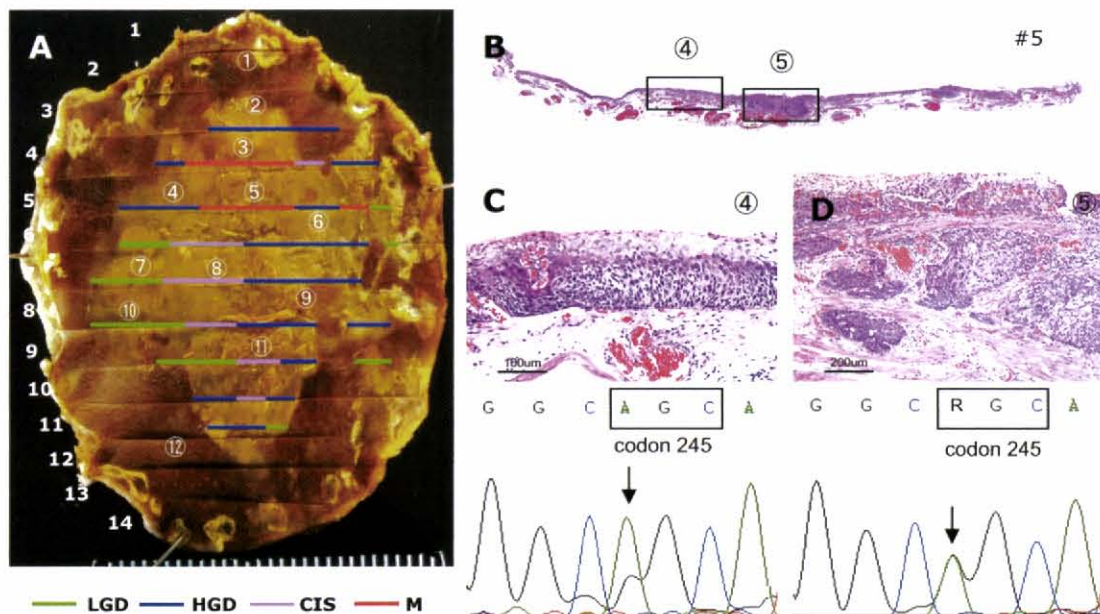


図2 病変の組織診断別のマッピングとDNAマイクロダイセクション(症例No.2)

- A: この症例は同一病変内に LGD (low-grade dysplasia), HGD (high-grade dysplasia), CIS (上皮内癌), M (粘膜固有層浸潤癌) が存在していた。正常扁平上皮も含め①～⑭までの12領域からマイクロダイセクションを行った。
- B: 標本番号5のHE染色ルーペ像。四角部分がマイクロダイセクションを行った領域。図の④⑤は図Aの④⑤に対応する。
- C: Bのよの拡大像。HGD。エクソン7のコドン245にGGC→AGCの点突然変異がある(矢印)。
- D: Bの⑤の拡大像。粘膜固有層浸潤癌。エクソン7のコドン245に、④と同様のGGC→AGCの点突然変異がある(矢印)。wild-typeのGGCも検出されているため、シーケンス解析画像上ではRGCと表示されている。

2. p53 免疫染色

p53 蛋白に対するモノクローナル抗体 (PAb1801, Oncogene Science, Manhasset, NY) を用い、SAB法 (streptavidin-peroxidase complex method) で免疫染色を行った。Microwave 処理により抗原賦活化を行った。免疫染色の評価は組織診断領域別に行い、①陰性: 陽性細胞なし、②散在性: 陽性細胞が少数散在性に出現、③限局性: 陽性細胞が限局性または巣状に出現、④びまん性: 陽性細胞がびまん性に出現、に分類し、③と④を p53 蛋白過剰発現とした³⁰⁾。陰性コントロールは、内視鏡的摘除材料内に含まれる正常扁平上皮とした。

3. p53 遺伝子変異の検索

パラフィン包埋 10 μm 切片 3 枚を用い、組織診断領域別に実体顕微鏡観察下マニュアル操作でマイクロダイセクションを行った (図2)³¹⁾³²⁾。腫瘍内の遺伝子変異多様性 (heterogeneity)^{31)–33)} を考慮し、同一病変の同一組織診断領域から2箇所以上のサンプリングを行った。陰性コントロールは、病変から離れた正常扁平上皮 (2箇所) とした。DNA抽出は、DNA isolator PS kit (和光純薬工業) を用いて行った³²⁾。p53 変異の多くはDNA結合ドメインであるエクソン5～8に生じる³⁴⁾ とされているため、本研究でもこれら4つのエクソンを、AmpliAq Gold (Applied

表 1 対象食道扁平上皮癌の内訳

症例 No.	年齢	性別	発生部位	組織型	肉眼型	最大径 (mm)	深達度	上皮内腫瘍の有無		
								LGD	HGD	CIS
1	69	M	Ut	mod	IIC	18	M	+	+	+
2	70	M	Lt	mod	IIC	37	M	+	+	+
3	73	M	Lt	well	IIC+IIa	30	SM	+	+	+
4	71	M	Mt	mod	IIC	30	SM		+	+
5	69	M	Mt	well	IIB	10	M	+		
6	42	M	Mt	mod	IIC+IIa	32	SM	+		
7	70	M	Mt	mod	IIC	10	M		+	+
8	61	M	Mt	well	IIC	29	SM	+	+	+
9	60	F	Lt	well	IIB+IIC	37	SM		+	+
10	83	M	Ut	mod	IIC	25	SM		+	

M: 男性、F: 女性、Ut: 胸部上部食道、Mt: 胸部中部食道、Lt: 胸部下部食道

M: 粘膜固有層浸潤癌、SM: 粘膜下層浸潤癌

LGD: low-grade dysplasia、HGD: high-grade dysplasia、CIS: carcinoma *in situ*

well: 高分化扁平上皮癌、mod: 中分化扁平上皮癌

Biosystem) を用いて PCR により増幅した³²⁾。PCR 産物を ExoSAP-KIT (USB Corporation) により精製し、これを template として ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によって蛍光標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンス解析を行った。いずれのサンプルも、sense, antisense の配列を決定することで p53 遺伝子の変異を確定した。

統計検定には χ^2 乗検定、Fisher の直接確率計算法を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 対象病変の組織診断と臨床病理学的事項

対象例 10 症例の年齢は 66.8 ± 10.7 歳で、性別では男性が 9/10 例であり、発生部位は全例が胸部食道（上部 2 例、中部 5 例、下部 3 例）であった（表 1）。癌組織型は全例分化型（高分化および中分化）扁平上皮癌であり、肉眼型は全例が表面型で、上皮内腫瘍も含めた病変の大きさは 25.8 ± 10.0 mm であった。10 症例全例が上皮内腫瘍を併存しており、LGD、HGD、CIS を併存したものが

4 例（症例 1, 2, 3, 8）、HGD と CIS を併存したものが 3 例（症例 4, 7, 9）、LGD のみのものが 2 例（症例 5, 6）、HGD のみのものが 1 例（症例 10）であった。

2. 扁平上皮内腫瘍部と浸潤癌部の p53 蛋白過剰発現および p53 遺伝子変異

対象 10 症例の組織診断領域別の p53 免疫染色および p53 遺伝子変異の検索結果を表 2 に示す。p53 免疫染色は、正常扁平上皮は全て陰性であった。7/10 例（70.0 %）の上皮内腫瘍と同浸潤癌部で蛋白過剰発現がみられ（限局性またはびまん性に染色陽性）、3/10 例（30.0 %）では両者ともに染色陰性であった。免疫染色パターンと組織診断との間には有意差はなかったが、LGD では陽性細胞は扁平上皮傍基底層に沿って限局し、細胞分化がみられる傍基底層中層から表層にかけては染色陰性であり、CIS や浸潤癌部では基底層も含め上皮全層に陽性細胞が分布する傾向があった（図 3）。

p53 遺伝子変異は陰性コントロールである正常扁平上皮では認められなかった。7/10 例（70.0 %）の上皮内腫瘍部および浸潤癌部で変異が認めら

表2 上皮内腫瘍部と浸潤癌部の p53 免疫染色と遺伝子検索結果

症例No	上皮内腫瘍部					浸潤癌部				
	組織診断	p53 IHC	p53 遺伝子変異		組織診断	p53 IHC	p53 遺伝子変異			
			codon	BC (AAC)			codon	BC (AAC)		
1	LGD	F	161	GCC→GAC (A→D)	M	D	161	GCC→GAC (A→D)		
			254	ATC→ATT (I→I)						
	HGD	D	161	GCC→GAC (A→D)						
			250	CCC→CTC (P→L)						
			253	ACC→ATC (T→I)						
CIS	D	161	GCC→GAC (A→D)							
2	LGD	F	245	GGC→AGC (G→S)	M	D	245	GGC→AGC (G→S)		
			301	CCC→TCA (P→S)						
	HGD	F	172	GTT→ATT (V→I)						
			245	GGC→AGC (G→S)						
	CIS	D	245	GGC→AGC (G→S)						
3	LGD	F	244	GGC→AGC (G→S)	M	F	244	GGC→AGC (G→S)		
	HGD	F	244	GGC→AGC (G→S)	SM	F	244	GGC→AGC (G→S)		
	CIS	F	244	GGC→AGC (G→S)						
4	HGD	F	151	CCC→GCC (P→A)	M	F	151	CCC→GCC (P→A)		
			209	AGA→AAA (R→K)	SM	F	151	CCC→GCC (P→A)		
			242	TGC→TAC (C→Y)						
	CIS	F	151	CCC→GCC (P→A)						
5	LGD	F	157	GTC→TTC (V→F)	M	F	157	GTC→TTC (V→F)		
			166	TCA→CCA (S→P)						
			213	AGT→AAT (S→N)						
6	LGD	F	133	ATG→ATT (M→I)	M	D	238	TGT→TAT (C→Y)		
			238	TGT→TAT (C→Y)	SM	D	238	TGT→TAT (C→Y)		
			F	wild-type						
7	HGD	-	wild-type	M	D	190	GGA→GAA (P→L)			
	CIS	D	190	GGA→GAA (P→L)		D	190	GGA→GAA (P→L)		
						225	CAA→TAA (V→I)			
8	LGD	-	wild-type	M	-	wild-type				
	HGD	-	wild-type	SM	-	wild-type				
	CIS	-	wild-type							
9	HGD	-	wild-type	M	-	wild-type				
	CIS	-	wild-type	SM	-	wild-type				
10	HGD	-	wild-type	M	-	wild-type				
				SM	-	wild-type				

LGD: low-grade dysplasia, HGD: high-grade dysplasia, CIS: carcinoma *in situ*,

M: 粘膜固有層浸潤癌, SM: 粘膜下層浸潤癌, IHC: 免疫染色、

D: びまん性陽性、F: 限局性陽性、-: 陰性、BC: 塩基変異、AAC: アミノ酸置換

れ、3/10例(30.0%)では両者ともに wild-type であった。変異は全て点突然変異による一塩基置換で、フレームシフト変異はなかった(図2)。症例1のLGDでアミノ酸置換を伴わないサイレン

ト変異(コドン254: ATC→ATT; I→I)がみられた以外は、全てアミノ酸置換を伴うミスセンス変異であった。p53免疫染色との対比では、遺伝子変異を認めた全ての領域で蛋白過剰発現があ

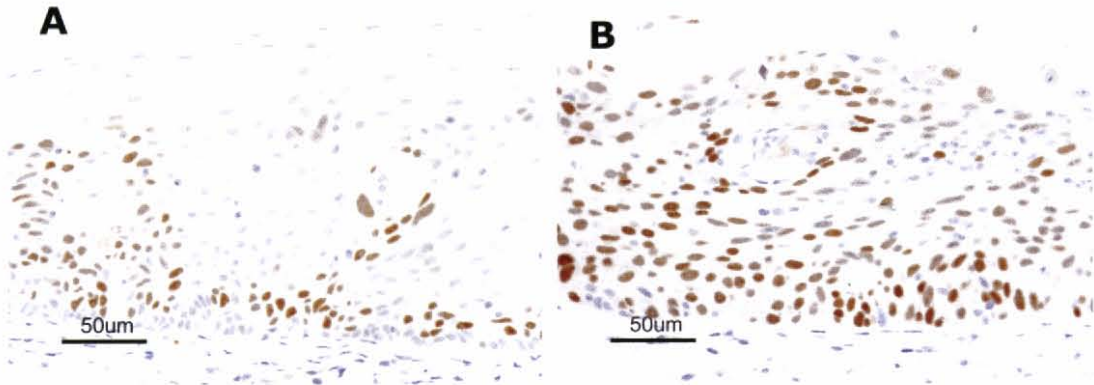


図3 食道扁平上皮内腫瘍の p53 免疫染色

A : LGD. 限局性陽性. 陽性細胞が傍基底層に限局する.
 B : CIS. びまん性陽性. 陽性細胞が上皮全層に分布する.

表3 組織診断と p53 遺伝子変異

組織診断		遺伝子変異		遺伝子変異の内訳		
		-	+	単一のcodon	複数のcodon	
LGD	(n:6)	1	5 (83.3%)	1/5 (20.0%)	4/5 (80.0%)	#
HGD	(n:8)	4	4 (50.0%)	1/4 (25.0%)	3/4 (75.0%)*	
CIS	(n:7)	2	5 (71.4%)	5/5 (100%)	0 **	##
M	(n:10)	3	7 (70.0%)	6/7 (85.7%)	1/7 (14.3%)	
SM	(n:6)	3	3 (50.0%)	3/3 (100%)	0	

LGD : low-grade dysplasia、HGD : high-grade dysplasia、CIS : carcinoma *in situ*

M : 粘膜固有層浸潤癌部、SM : 粘膜下層浸潤癌部

* vs ** : $P < 0.05$ 、# vs ## : $p < 0.01$

り, wild-type の全領域は染色陰性であった。遺伝子変異陽性率は LGD 5/6 (83.3%), HGD 4/8 (50.0%), CIS 5/7 (71.4%), M 癌部 7/10 (70.0%), SM 癌部 3/6 (50.0%) で、組織診断間で有意差はなかったが、変異コドンの個数には組織診断により違いがあった (表3)。遺伝子変異が検出された病変を母数として変異の内訳をみると、CIS、SM 浸潤癌部の全例と M 癌部の 6/7 (85.7%) では変異コドンは単一であったが、LGD および HGD ではそれぞれ 4/5 (80.0%), 3/4 (75.0%) に、同一病変から複数の変異コド

ンが検出された。HGD と CIS、LGD + HGD と CIS + M 癌部 + SM 癌部、との間には有意差がみられた。

3. 扁平上皮内腫瘍部と浸潤癌部の p53 遺伝子変異パターンの対比

同一病変内における上皮内腫瘍部と浸潤癌部との組織発生学的連続性をみるため、両者の p53 遺伝子変異パターンを対比・比較した (表4)。CIS と浸潤癌部では、症例7を除き、変異パターンは同一であった。Dysplasia で変異パターンが CIS

表4 上皮内腫瘍部と浸潤癌部の p53 遺伝子変異の対比

症例 No	上皮内腫瘍部			浸潤癌部	
	LGD	HGD	CIS	M	SM
1	161 254	161 250 253	161	161	-
2	245 301	172 245	245	245	245
3	244	244	244	244	244
4	-	151 209 242	151	151	151
5	157 166 213	-	-	157	-
6	133 238	-	-	238	238
7	-	W	190	190 225	-
8		W	W	W	W
9	W	W	W	W	W
10	-	W	W	W	W

LGD : low-grade dysplasia、HGD : high-grade dysplasia、
CIS : carcinoma *in situ*、M : 粘膜固有層浸潤癌、SM: 粘膜下層浸潤癌
数字は点突然変異のあったコドン番号、W: wild-type

および浸潤癌部と同一であったものは、LGD では wild-type であった症例9とコドン244の単一点突然変異を認めた症例3の2例、HGDでは wild-type であった3例(症例8, 9, 10)と症例3の4例のみであった。しかし、LGD, HGDのいずれも、症例7を除き(HGDがwild-typeで、M癌部でコドン190と225の変異あり)、CISおよ

び浸潤癌部とは変異コドンが共通していた。

考 察

食道扁平上皮 内腫瘍と浸潤癌部の p53 遺伝子変異を比較・検討した研究はこれまでに多数あるが^{18)19)22) - 24)26)27)}、それらは、上皮内腫瘍を dys-

plasia もしくは癌に併存する非癌上皮として一括したもの¹⁸⁾¹⁹⁾²²⁾²⁶⁾，別個に発生した病変を対象としたもの¹⁸⁾²²⁾²⁷⁾，免疫染色のみの検討²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁶⁾，等であり，いずれも p53 遺伝子変異が生ずる発癌早期段階とは LGD，HGD のいずれが相当するのか，またそれらが癌の直接の発生母組織なのか，については明確にされていない．上皮内腫瘍を dysplasia として一括した場合，p53 遺伝子変異が生じる“発癌早期段階”とはあくまで概念に過ぎず，遺伝子検索結果を具体的病理組織診断に応用し，臨床に還元することはできない．また，浸潤癌部を併存しない上皮内腫瘍は，厳密には，浸潤癌の前段階とは確定しがたい．他方，p53 蛋白過剰発現は p53 遺伝子変異を反映していることから²¹⁾，同蛋白過剰発現の免疫組織学的検討では，同一病変内に存在する上皮内腫瘍と浸潤癌部の，組織像と p53 遺伝子変異の詳細な比較検討が可能である．しかし，変異コドンの違いを免疫組織学的に判別することは不可能であり，上皮内腫瘍と浸潤癌部の両者に蛋白過剰発現がみられても，それぞれが異なる遺伝子変異を持つ細胞集団から構成されている可能性もあり，両者の組織発生の連続性を検証することは困難である．

本研究では，上皮内腫瘍を LGD，HGD，CIS に細分類し，それらと同一病変内に併存する浸潤癌部の p53 遺伝子変異を検討した．その結果，上皮内腫瘍部，浸潤癌部いずれも 7/10 (70.0 %) に遺伝子変異と蛋白過剰発現がみられ，遺伝子変異と蛋白過剰発現の有無は一致していた．これまでの報告では，浸潤癌の 40～80 %^{16)～19)} に遺伝子変異が，dysplasia の 55～92 %^{22)～24)26)27)} に p53 蛋白過剰発現がみられたとされているが，本研究結果は既報の頻度内であった．本研究での p53 遺伝子変異率を各組織成分別に比較すると，LGD，HGD，CIS，浸潤癌部で有意差はなく（それぞれ 83.3 %，50.0 %，71.4 %，50.0～75.0 %），LGD と HGD は，1 例を除き，同一病変内に併存する CIS および浸潤癌部と変異コドンが共通するか，いずれもが wild-type であった．これらのことから，p53 遺伝子変異の観点からみた限りは，LGD および HGD は同一病変内の CIS や浸潤癌

部と組織発生の連続性があることが推定される．一方で，dysplasia と CIS および浸潤癌部の遺伝子変異パターンは必ずしも同一ではなかった．CIS と浸潤癌部では，1 例の M 癌部を除き，遺伝子変異は単一の変異コドンからなっていたが，LGD と HGD ではそれぞれ 4/5 (80.0 %) と 3/4 (75.0 %) に変異コドンに多様性（複数の変異コドンの存在）が認められた．上皮内腫瘍における p53 遺伝子変異の多様性については，胃高分化粘膜内癌³³⁾，大腸高分化粘膜内癌³²⁾，で報告されている．これらの臓器では，粘膜内癌で様々な p53 遺伝子変異を来した複数の細胞集団が存在し，それらの一部がクローン選択を経て粘膜下層に浸潤し，均一な p53 遺伝子変異パターンを持つ浸潤癌が形成されると推定されている³²⁾³³⁾．本研究結果も，LGD と HGD は異なる p53 遺伝子変異を持つ複数の細胞集団から構成され，それがクローン選択を経て均一な p53 遺伝子変異を持つ CIS となり，粘膜固有層へ浸潤すると解釈することができ，LGD の段階を食道扁平上皮の発癌早期と位置づけることが可能であると考えられた．

LGD に対する臨床的措置は，内視鏡的摘除とするか経過観察とするかのコンセンサスが得られていない¹¹⁾¹²⁾．その理由としては，LGD の生物学的性格（CIS や浸潤癌に確実に進展する病変かどうか）が明確ではないことと，LGD と非腫瘍病変である反応性幼若上皮との病理組織学的鑑別が必ずしも容易ではないこと³⁵⁾が挙げられる．p53 遺伝子変異を検討した本研究結果から，食道扁平上皮内腫瘍では，LGD の段階から既に CIS や浸潤癌と同質の細胞集団が含まれていると推定され，LGD に対しては内視鏡的摘除などの積極的な臨床対応が必要であると考えられる．他方，LGD と反応性幼若上皮の病理組織学的鑑別には，p53 遺伝子変異の有無を反映する p53 免疫染色が有用な診断補助手段になりうる．しかし，同免疫染色を病理組織診断に応用する際には，LGD でも p53 遺伝子変異がないものが存在する（本研究対象では 3/10，30 %）ことを念頭におく必要がある．

結 論

食道扁平上皮内腫瘍では、low-grade dysplasia (LGD) の段階で既に上皮内癌 (CIS) や浸潤癌と同様に高頻度に *p53* 遺伝子変異が起きており、同一病変内の LGD と癌には共通の同遺伝子変異がみられた。これらのことから、LGD が食道扁平上皮の発癌早期段階であり、LGD に対しては積極的な臨床対応が必要と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 青柳 豊教授、同分子・診断病理学分野 味岡洋一教授、標本作成・免疫染色・遺伝子解析の技術指導を頂きました分子・診断病理学分野の職員 (山口尚之、佐藤彩子、小林和恵) の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Hamilton SR and Aoltonen LA (eds): World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon, IARC Press, pp10-26, 2000.
- 2) Spechler SJ and Goyal RK: Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 315: 362-371, 1986.
- 3) Barrett NR: Chronic peptic ulcer of the oesophagus and oesophagitis. *Br J Surg* 38: 175-182, 1950.
- 4) Takubo K, Aida J, Sawabe M, Kurosumi M, Arima M, Fujishiro M and Arai T: Early squamous cell carcinoma of the oesophagus: the Japanese view - point. *Histopathology* 51: 733-742, 2007.
- 5) がんの統計編集委員会 (編): がんの統計 '03. 財団法人がん研究振興財団, pp40-49, 2003.
- 6) Ide H, Nakamura T, Hayashi K, Endo T, Kobayashi A, Eguchi R and Hanyu F: Esophageal squamous cell carcinoma: pathology and prognosis. *World J Surg* 18: 321-330, 1994.
- 7) Lerut TE, de Leyn P, Coosemans W, Van Raemdonck D, Cuypers P and Van Cleynenbreughel B: Advanced esophageal carcinoma. *World J Surg* 18: 379-387, 1994.
- 8) Kitamura K, Kuwano H, Yasuda M, Sonada K, Sumiyoshi K, Tsutsui S, Kitamura M and Sugimachi K: What is the earliest malignant lesion in the esophagus? *Cancer* 15: 1614-1619, 1996.
- 9) 吉田 操: 食道・胃・十二指腸—食道. 竹本忠良, 長廻 紘編. 消化管内視鏡診断テキスト I, 文光堂, 東京, pp27-33, 1983.
- 10) Yoshida T, Inoue H, Usui S, Satodate H, Fukami N and Kudo S: Narrow-band imaging system with magnifying endoscopy for superficial esophageal lesions. *Gastroenterol Endosc* 59: 288-295, 2004.
- 11) 門馬久美子, 吉田 操, 藤原純子, 荒川丈夫, 藤原 崇, 江頭秀人, 江川直人, 三浦昭順, 加藤剛, 出江洋介, 根本哲生, 船田信顕, 葉梨智子: 食道扁平上皮 dysplasia の診断・取扱い—内視鏡の立場から: ヨード・NBI 観察. 胃と腸 42: 147-160, 2007.
- 12) Shimizu M, Nagata K, Yamaguchi H and Kita H: Review. Squamous intraepithelial neoplasia of the esophagus: past, present, and future. *J Gastroenterol* 44: 103-112, 2009.
- 13) Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
- 14) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC and Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708, 1989.
- 15) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
- 16) Imazeki F, Omata M, Nose H and Isono K: p53 gene mutation in gastric and esophageal cancers. *Gastroenterology* 103: 892-896, 1992.
- 17) Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T and Ishizaki K: Loss of 17p, mutation of the p53 gene and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 53: 846-850, 1993.

- 18) Gao H, Wang LD, Zhou Q, Hong JY, Huang TY and Yang CS: *p53* tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high - risk populations in Hena, China. *Cancer Res* 54: 4342 - 4346, 1994.
- 19) Li LY, Tang JT, Jia LQ and Li PW: Mutations of *p53* gene exons 4 - 8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 11: 2998 - 3001, 2005.
- 20) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M and Levine AJ: 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.
- 21) Oren M: *p53*: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* 6: 3169 - 3176, 1992.
- 22) Wang LD, Hong JY, Qui SL, Gao H and Yang CS: Accumulation of *p53* protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* 53: 1783 - 1787, 1993.
- 23) Parenti AR, Rugge M, Frizzera E, Ruol A, Noventa F, Ancona E and Ninfo V: *p53* overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 19: 1418 - 1422, 1995.
- 24) Volant A, Noursbaum JB, Giroux MA, Roue - Quintin I, Metges JP, Ferec C, Gouerou H and Robaszkiewicz M: *p53* protein accumulation in oesophageal squamous cell carcinomas and precancerous lesions. *J Clin Pathol* 48: 531 - 534, 1995.
- 25) Kawamura T, Goseki N, Koike M, Takizawa T and Endo M: Acceleration of proliferative activity of esophageal squamous cell carcinoma with invasion beyond the mucosa: immunohistochemical analysis of Ki - 67 and *p53* antigen in relation to histologic findings. *Cancer* 77: 843 - 849, 1996.
- 26) Tian D, Feng Z, Hanley NM, Setzer RW, Mumford JL and DeMarini DM: Multifocal accumulation of *p53* protein in esophageal carcinoma: evidence for field cancerization. *Int J Cancer* 78: 568 - 575, 1998.
- 27) Kobayashi M, Kawachi H, Takizawa T, Uchida K, Sekine M, Kumagai J, Momma K, Nemoto T, Akashi T, Funata N, Eishi Y and Koike M: *p53* mutation analysis of low - grade dysplasia and high - grade dysplasia/carcinoma in situ of the esophagus using laser capture microdissection. *Oncology* 71: 237 - 245, 2006.
- 28) Fenoglio - Preiser CM, Noffsinger AM, Stemmermann GN, Lantz PE and Isaacson PG: *Gastrointestinal pathology*. 3rd ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp85 - 108, 2008.
- 29) 日本食道学会編：食道癌取り扱い規約，第10版補訂版，金原出版，東京，2008.
- 30) Oohashi Y, Watanabe H, Ajioka Y and Hatakeyama K: *p53* immunostaining distinguishes malignant from benign lesions of the gall - bladder. *Pathol Int* 45: 58 - 65, 1995.
- 31) Kuwabara S, Ajioka Y, Watanabe H, Hitomi J, Nishikura K and Hatakeyama K: Heterogeneity of *p53* mutational status in esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 89: 405 - 410, 1998.
- 32) Yamada S, Ajioka Y, Watanabe H, Hashidate H, Takaku H, Kazama S, Yokoyama J, Nishikura K, Fujiwara T and Asakura H: Heterogeneity of *p53* mutational status in intramucosal carcinoma of the colorectum. *Jpn J Cancer Res* 92: 161 - 166, 2001.
- 33) Iwamatsu H, Nishikura K, Watanabe H, Ajioka Y, Hashidate H, Kashimura H and Asakura H: Heterogeneity of *p53* mutational status in the superficial spreading type of early gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 4: 20 - 26, 2001.
- 34) Montesano R, Hollstein M and Hainaut P: Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 21: 225 - 235, 1996.
- 35) 渡辺英伸，中川 悟，遠藤泰志，西倉 健，味岡 洋一：食道扁平上皮の上皮内癌と異形成の組織診断. *胃と腸* 30: 407 - 416, 1995.

(平成 22 年 1 月 18 日受付)