

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 横田 陽子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 623 号
学位授与の日付 平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 免疫染色による p53 蛋白過剰発現の評価法について
—遺伝子変異との相関からみた検討—

論文審査委員 主査 教授 若井 俊文
副査 教授 味岡 洋一
副査 准教授 梅津 哉

博士論文の要旨

【背景と目的】 p53 遺伝子変異は同蛋白過剰発現として免疫組織学的に同定することが可能とされているが、免疫染色に用いられるモノクローナル抗体にはさまざまなものがあり、蛋白過剰発現についても一定の基準はない。本研究では免疫染色による蛋白過剰発現判定法の確立を目的として、市販・汎用されている 2 種類 (PAb1801、D07) のモノクローナル抗体を用いて、それぞれの染色態度、染色態度と遺伝子変異との相関を検討した。

【方法】 外科切除ホルマリン固定大腸進行癌 29 病変、内視鏡的摘除大腸粘膜内腫瘍 53 病変を対象とした。PAb1801、D07 の 2 種類の抗体を用いた免疫染色で同一領域の染色態度を判定した。染色態度は、陽性細胞分布パターンと染色強度の組み合わせで評価した。陽性細胞分布パターンは、negative : 陽性細胞なし、sporadic : 陽性細胞が散在性に存在、mosaic : 陽性細胞がびまん性に存在するが、陰性細胞が混在する、nested : 陰性細胞が混在しない陽性細胞集簇巣が散在、diffuse : 陰性細胞が混在することなく陽性細胞がびまん性に存在、の 5 つに、染色強度は、強陽性 (strong) と弱陽性 (weak) に分類した。各染色態度領域からマイクロダイセクションにより DNA を抽出して、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遺伝子変異を検索した。

【結果】 1) 大腸進行癌は 42 領域、大腸粘膜内腫瘍は 237 領域の合わせて 279 領域が検索対象として抽出された。2) 2 種類の抗体を用いた免疫染色態度の比較 : 陽性細胞分布パターンの一致率は 47.7%、染色強度の一致率は 89.6%であり、D07 染色は PAb1801 染色に比べ陽性細胞頻度がより高く、染色強度がより強く表現される傾向があった。3) PAb1801 染色の染色態度と p53 遺伝子変異との相関 : sporadic、mosaic の遺伝子変異陽性率は低く (5.5-7.7%)、nested と diffuse では高かった (81.8-94.4%)。両群間には有意差があった ($p < 0.0001$)。遺伝子変異パターンは、進行癌では全領域が、粘膜内腫瘍では 87.9%が、アミノ酸置換を伴う missense mutation (もしくは missense mutation を伴う) であった。染色 negative でも進行癌の 66.7%、粘膜内腫瘍の 42.3%に遺伝子変異が認められた。遺伝子変異パターンは、deletion、insertion、nonsense mutation、splicing site mutation など蛋白の truncation をきたす変異であった。4) D07 染色の染色態度と p53 遺伝子変異との相関 : sporadic、mosaic、

diffuse/weakの遺伝子変異陽性率は低く(0-11.6%)、nestedとdiffuse/strongでは高かった(71.1-93.8%)。両群間には有意差があった($p < 0.0001$)。遺伝子変異パターンは、進行癌では全領域が、粘膜内腫瘍では86.2%が、アミノ酸置換を伴う missense mutation (もしくはmissense mutationを伴う)であった。他方、染色negativeでも進行癌の80.8%、粘膜内腫瘍の75.0%に遺伝子変異が認められた。遺伝子変異パターンは、deletion、insertion、nonsense mutation、splicing site mutationなど蛋白のtruncationをきたす変異であった。

【結論と考察】 p53免疫染色によるp53蛋白過剰発現の判定は、用いるモノクローナル抗体により異なる。PAb1801抗体を用いた免疫染色では、nestedとdiffuseの陽性細胞分布パターンを示すものを、D07抗体を用いた免疫染色では、nestedとdiffuse/strongの陽性細胞分布パターンと染色強度を示すものを、遺伝子変異を背景に持つ蛋白過剰発現とすることが妥当と考えられた。D07抗体を用いた免疫染色では、diffuseな陽性細胞分布パターンを示すものでも染色強度がweakなものに遺伝子変異はなく、同染色態度を蛋白過剰発現と判定しないよう注意すべきである。一方、免疫染色陰性例にも遺伝子変異が存在することに留意する必要がある。

審査結果の要旨

本研究では免疫染色による蛋白過剰発現判定法の確立を目的として、市販・汎用されている2種類(PAb1801、D07)のモノクローナル抗体を用いて、それぞれの染色態度、染色態度と遺伝子変異との関連を検討した。大腸進行癌29病変、内視鏡的摘除大腸粘膜内腫瘍53病変を対象とし、PAb1801、D07の2種類の抗体を用いた免疫染色で同一領域の染色態度を判定した。各染色態度領域からマイクロダイセクションによりDNAを抽出して、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遺伝子変異を検索した。免疫染色の陽性細胞分布パターンの一致率は47.7%、染色強度の一致率は89.6%であり、D07染色はPAb1801染色に比べ陽性細胞頻度がより高く、染色強度がより強く表現される傾向があった。PAb1801染色の染色態度とp53遺伝子変異との関連は、sporadic、mosaicの遺伝子変異陽性率は低く(5.5-7.7%)、nestedとdiffuseでは高かった(81.8-94.4%)。D07染色の染色態度とp53遺伝子変異との関連は、sporadic、mosaic、diffuse/weakの遺伝子変異陽性率は低く(0-11.6%)、nestedとdiffuse/strongでは高かった(71.1-93.8%)。他方、染色negativeでも進行癌の80.8%、粘膜内腫瘍の75.0%に遺伝子変異が認められた。

【結論と考察】 p53免疫染色によるp53蛋白過剰発現の判定は、用いるモノクローナル抗体により異なる。PAb1801抗体を用いた免疫染色では、nestedとdiffuseの陽性細胞分布パターンを示すものを、D07抗体を用いた免疫染色では、nestedとdiffuse/strongの陽性細胞分布パターンと染色強度を示すものを、遺伝子変異を背景に持つ蛋白過剰発現とすることが妥当と考えられた。D07抗体を用いた免疫染色では、diffuseな陽性細胞分布パターンを示すものでも染色強度がweakなものに遺伝子変異はなく、同染色態度を蛋白過剰発現と判定しないよう注意すべきである。一方、免疫染色陰性例にも遺伝子変異が存在することに留意する必要がある。

p53蛋白過剰発現判定法を遺伝子検索の観点から確立している点で学位論文として価値のある研究成果であると判断しました。