

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 —

横 田 陽 子

新潟大学医歯学総合研究科分子・診断病理学分野

(指導：味岡洋一教授)

Evaluation of p53 Protein Overexpression by Immunohistochemistry — Study based on Gene Mutation Analysis —

Yoko YOKOTA

Division of Molecular and Diagnostic Pathology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoichi AIOKA)

要 旨

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、どのような染色態度を蛋白過剰発現とするか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, DO7) のモノクローナル抗体を用いて、それぞれの染色態度と遺伝子変異との相関を検討した。外科切除ホルマリン固定大腸進行癌 29 病変、内視鏡的に切除された大腸粘膜内腫瘍 53 病変を対象とし、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。次に、各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。進行癌 29 病変から 42 領域、粘膜内腫瘍 53 病変から 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 種類の抗体間の免疫染色態度の対比では、DO7 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。蛋白過剰発現の判定は、用いる抗体により異なる。PAb1801 染色では、nested (陽性細胞が混在しない陽性細胞集簇が散在) と 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) が、DO7 染色では、nested と diffuse/strong (染色強陽性) が、他の染色態度に比べ有意に高い遺伝子変異率 (71.1-93.8 %) を示したことから、これらの染色態度を蛋白過剰発現とすることが妥当と考えられた。蛋白過剰発現を示す領域の遺伝子変異はその大半 (69.2-100 %) が、アミノ酸置換を伴う missense mutation (または missense mutation を伴う) であり、変異型 p53 蛋白が免疫染色により同定されたものと考えられた。他方、DO7 染色では diffuse/weak (染色弱陽性) のものに遺伝子変異は認められず、同染色態度を蛋白過剰発現としないよう注意が必要である。一方、免疫染色陰性領域でも PAb1801 染色の 50 %, DO7 染色の 77.3 % には遺伝子変異が認められ、それらの変異パターンは deletion, insertion, nonsense

Reprint requests to: Yoko YOKOTA
Division of Molecular and Diagnostic Pathology,
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
分子・診断病理学分野

横 田 陽 子

mutation, splicing site mutation など蛋白の truncation をきたす変異であった。p53 免疫染色陰性例にも p53 蛋白不活化をきたす遺伝子変異が存在する可能性を考慮する必要がある。

キーワード：p53 蛋白過剰発現, 免疫染色, PAb1801, DO7, p53 遺伝子変異

緒 言

p53 遺伝子は染色体 17p13 に存在する腫瘍抑制遺伝子で、細胞周期やアポトーシスを制御し、DNA 修復などのゲノム安定性維持に重要な役割を果たしており^{1)~3)}、その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いる⁴⁾⁵⁾。野生型 p53 蛋白は半減期が短く(30 分程度)細胞内で速やかに分解されるが⁶⁾、変異型 p53 蛋白は分解時間が著しく遅延し核内に蓄積される⁷⁾。このため、変異型 p53 蛋白は免疫組織学的に蛋白過剰発現として同定することが可能であり⁸⁾⁹⁾、逆に蛋白過剰発現から p53 遺伝子異常の存在を推定することが出来る。p53 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片でも可能なことから、これまで種々の腫瘍の病理診断や、病理組織像と悪性度との関係を検討する際の有用な手段として用いられてきた^{10)~16)}。

免疫染色の利点は、遺伝子検索に比べ簡便・安価であり、短時間で多数の検体の検索が可能で、過去に蓄積された病理組織検体を利用できることにある。しかし、問題点として、陽性・陰性の判定が研究者により異なること、使用するモノクローナル抗体の種類によっては必ずしも同一の結果が得られないこと、がある。p53 免疫染色に関しても、文献により使用しているモノクローナル抗体には種々のものがある。また、蛋白過剰発現の判定もカットオフ値を、1 個以上の陽性細胞^{17)~19)}、5 % 以上の陽性細胞²⁰⁾、10 % 以上の陽性細胞^{21)~23)}、50 % 以上の陽性細胞²⁴⁾ とするものや、陽性細胞の分布を重視するもの²⁵⁾、陽性細胞頻度と染色強度を組み合わせたもの²⁶⁾ など多岐にわたっている。これらのことから、異なる研究者間の結果の比較には注意を要すると同時に、p53

免疫染色を病理診断や研究に用いる際、どのような染色態度を過剰発現と判定すれば良いのかに苦慮せざるを得ない。

本研究は、免疫染色による p53 蛋白過剰発現評価法の確立を目的として、市販・汎用されている 2 種類の抗体 (PAb1801 と DO7) を用いて、それぞれの免疫染色態度の比較およびモノクローナル抗体別に p53 遺伝子変異との関係を検討した。

対象と方法

1. 対象

外科切除ホルマリン固定大腸進行癌 29 症例 29 病変、内視鏡的に切除された大腸粘膜内腫瘍 48 症例 53 病変 (純粹癌 2 病変、腺腫内癌 37 病変、管状腺腫 14 病変) を対象とした。病変の病理組織診断は大腸癌取り扱い規約に従った²⁷⁾。術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。

進行癌は中心最大剖面、粘膜内腫瘍は全剖面のパラフィン包埋ブロックを用い、HE 染色と p53 免疫染色用 3 μ m 切片 2 枚、および p53 遺伝子検索用 10 μ m 切片 (進行癌例は 3 枚、粘膜内腫瘍例は 10 枚) の連続切片を作製した。

2. p53 免疫染色

p53 蛋白に対するモノクローナル抗体は PAb1801 (Novocastra, Leica, UK) (希釈倍率 40 倍)、DO7 (Novocastra, Leica, UK) (希釈倍率 100 倍) の 2 種類を用いた。2 抗体とも wild-type, mutant-type の両者を認識し、エピトープはそれぞれ、32-79 番アミノ酸、20-25 番アミノ酸である。

3 μ m パラフィン切片を脱パラ水洗後、0.01M クエン酸緩衝液に浸し、121 $^{\circ}$ C 20 分オートクレー

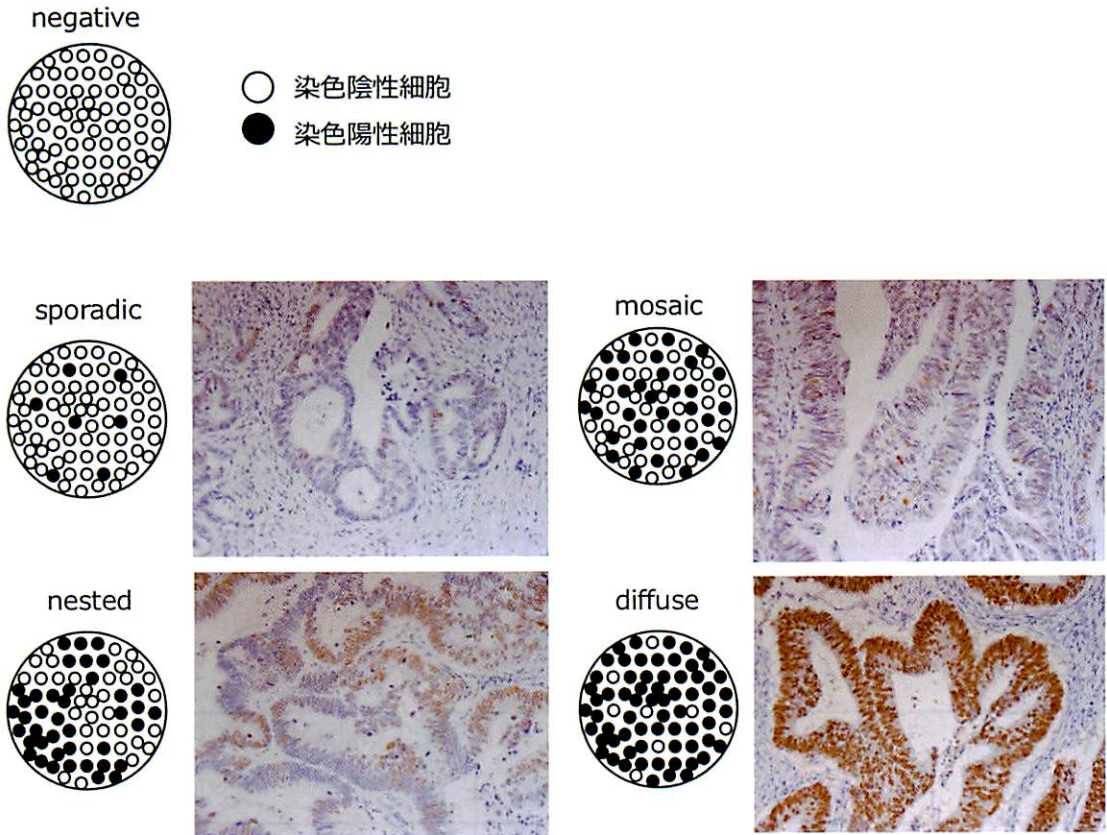


図1 p53 免疫染色陽性細胞分布パターンの分類

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 : 陰性細胞がほとんど混在することなく陽性細胞がびまん性に存在.

ブで抗原賦活を行った. 内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを 0.3 % 過酸化水素加メタノール室温 20 分間で行い, 一次抗体をそれぞれの希釈倍率で 4℃一晩反応させた. その後, 酵素標識二次抗体 (ヒストファインシンブルステイン MAX-PO (MULTI) ニチレイ) を室温 30 分間反応させ, 0.02 % DAB.4HCl・0.02 % 過酸化水素・0.05M トリス緩衝液 pH7.6 で発色の後, ヘマトキシリンで後染色した.

3. p53 免疫染色標本の評価

核が茶色に染色されるものを染色陽性細胞とし, 染色陰性コントロールは対象切片に含まれる

正常大腸組織とした. 2 種類の抗体を用いた免疫染色標本で同一領域の染色態度を判定した.

染色態度の異なる領域は, 独立した領域としてマッピングし, 後述する遺伝子検索では別個のサンプルとして DNA を抽出した. 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以下の 5 つに分類した. 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 (図 1). 染色強度は以下の 2

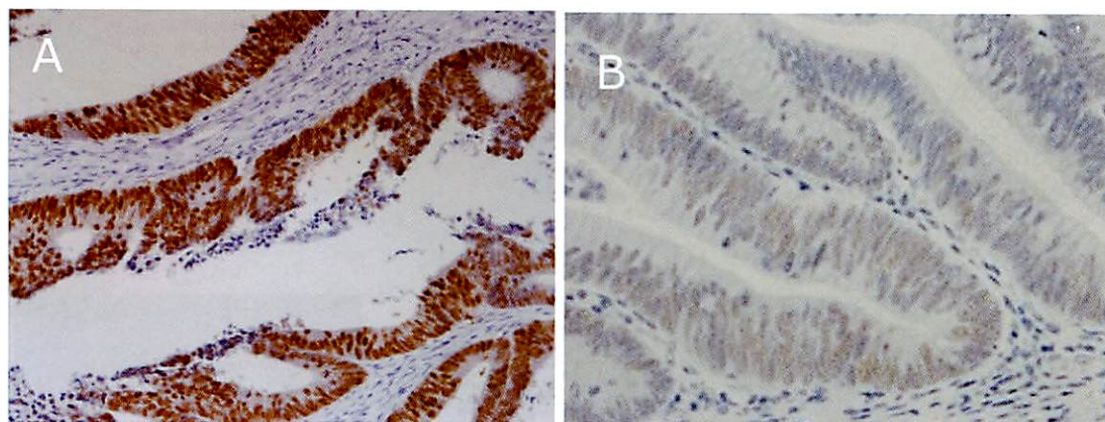


図2 p53免疫染色強度の分類

- A：強陽性 (strong)。核が濃染し、光顕対物4倍視野で明らかに陽性と判定できるもの。
 B：弱陽性 (weak)。核の染色性が薄く、光顕対物4倍視野では明らかに陽性とは判定できず、光顕対物10倍以上の視野で陽性と判定できるもの。

表1 p53免疫染色の陽性細胞分布パターンと陽性細胞頻度

染色パターン	n	陽性細胞頻度 %	
		平均 ± 標準偏差	(最少-最大)
sporadic	20	9.9±4.5	(2.0-18.6)
mosaic	12	39.7±8.3	(29.4-51.0)
nested	15	59.3±5.4	(49.4-68.3)
diffuse	34	89.0±5.9	(73.6-96.2)

各群間で有意差あり ($P<0.0001$)

つに分類した。強陽性 (strong)：核が濃染し、光顕対物4倍観察下で明らかに陽性と判定できるもの、弱陽性 (weak)：核の染色性が薄く、光顕対物10倍以上の観察下で陽性と判定できるもの(図2)。強陽性が弱陽性かの判定に苦慮するものは弱陽性とした。強陽性細胞と弱陽性細胞とが混在する領域の染色強度は弱陽性とした。免疫染色標本の評価は、著者と研究指導者の2名で行った。

予備的検討として、進行癌症例を対象に、各陽

性細胞分布パターン別の陽性細胞頻度を、細胞1,000個以上をカウントして定量評価した。陽性細胞頻度は、sporadic, mosaic, nested, diffuseそれぞれの群間で有意差があり(表1)、sporadicは陽性細胞頻度20%以下に、mosaicは30-50%に、nestedは50-70%に、diffuseは70%以上にそれぞれ分布していた(図3)。

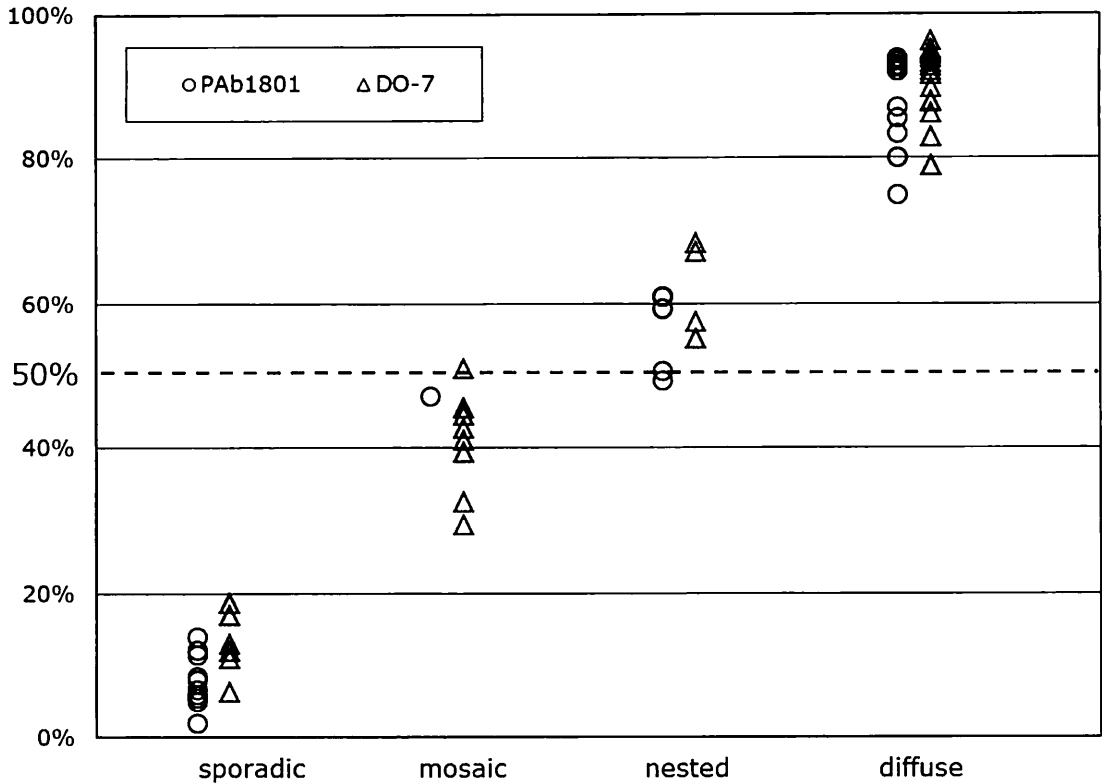


図3 p53 免疫染色陽性細胞分布パターンと陽性細胞頻度
sporadic は陽性細胞頻度 20 % 以下に, mosaic は 30 - 50 % に, nested は
50 % - 70 % に, diffuse は 70 % 以上に分布している。

4. p53 遺伝子変異の検索

10 μ m 切片 (進行癌例は 3 枚, 粘膜内腫瘍例は 10 枚) を用い, 免疫染色態度別にマッピングされた領域から, 顕微鏡観察下のマニュアル操作でマイクロダイセクションを行い, DNA アイソレーター PS キット (和光純薬工業) で DNA を抽出した²⁸⁾。陰性コントロールは同一切片の正常大腸粘膜とした。p53 遺伝子変異の多くは DNA 結合ドメインであるエクソン 5 ~ 8 に生じる²⁹⁾ とされているため, 本研究でもこれら 4 つのエクソンを, AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, USA) を用いて PCR にて増幅した。それぞれのエクソンの増幅に用いたプライマーを表 2 に示す。PCR 産物は, 3 % アガロースゲルで

電気泳動し, 増幅を確認の後, ExoSAP-IT[™] (USB[®], USA) で精製し, これをテンプレートとして ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA) を用いてサイクルシーケンス反応を行い, 反応産物を NucleoSEQ (MACHEREY - NAGEL, Germany) で精製した後, Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems, USA) 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。

5. 統計解析

統計解析には Pearson のカイ二乗検定または

表2 PCRプライマーの塩基配列

Exon	sense (5'→3') antisense (3'→5')
5-1 (codon 126-166)	gac ttt caa ctc tgt ctc ctt c tga ctg ctt gta gat ggc ca
5-2 (codon 142-187)	cct gtg cag ctg tgg gtt gat t cag ctg ctc acc atc gct atc t
6-1 (codon 187-222)	cca ggc ctc tga ttc ctc act gat gct cat agg gca cca cca cac tat
6-2 (codon 187-224)	tct ggc ccc tcc tca gca tct tat tcc cag aga ccc cag ttg caa a
7-1 (codon 225-258)	tgg cct cat ctt ggg cct gtg tta cca gtg tga tga tgg tga gga
7-2 (conon 228-261)	act gta cca cca tcc act ac agt gtg cag ggt ggc aag
8-1 (codon 261-295)	act gcc tct tgc ttc tct ttt c agg ctc ccc ttt ctt gcg gag att
8-2 (codon 266-307)	acg gaa cag ctt tga ggt gcg t ttg gtc tcc tcc acc gct tct t

表3 PAb1801抗体とDO7抗体を用いたp53免疫染色態度の比較

A. 陽性細胞分布パターン

PAb1801	DO7				
	negative	sporadic	mosaic	nested	diffuse
negative	22	12	3		1
sporadic		20	94		13
mosaic			9		17
nested				16	6
diffuse					66

一致率 133/279 (47.7%)

B. 染色強度

PAb1801	DO7		
	negative	weak	strong
negative	22	15	1
weak		141	13
strong			87

一致率 250/279 (89.6%)

Fisher の直接確立計算法、Mann - Whitney の U 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 検索対象領域

同一病変でも異なる p53 免疫染色態度を示す複数の領域が存在するため、免疫染色態度と p53 遺伝子変異との関係を検討するサンプルとして、進行癌 29 病変から 42 領域、粘膜内腫瘍 53 病変から 237 領域の合わせて 279 領域が抽出された。

2. 異なる抗体を用いた p53 免疫染色態度の比較

PAb1801 抗体と DO7 抗体を用いた p53 免疫染色（以降、それぞれ PAb1801 染色、DO7 染色と略す）の染色態度を比較した（表 3）。陽性細胞分

布パターン的一致率は 47.7 %（133/279）であった。DO7 染色は PAb1801 染色に比べ陽性細胞頻度がより高頻度に表現される傾向があった。PAb1801 染色 negative の 38 領域中 16 領域（42.1 %）は DO7 染色陽性であり、sporadic, mosaic, nested の 175 領域中 36 領域（20.5 %）では DO7 染色は diffuse と判定された。染色強度の一致率は 89.6 %（250/279）と分布パターンに比べ高かったが、DO7 染色は PAb1801 染色に比べ染色強度が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

PAb1801 染色の染色態度と p53 遺伝子変異との関係を表 4 に示す。進行癌、粘膜内腫瘍いずれも染色態度は sporadic と mosaic は weak が、

表 4 PAb1801 抗体を用いた p53 免疫染色態度と遺伝子変異

染色態度		進行癌			粘膜内腫瘍		
分布パターン	強度	n	遺伝子変異 (+)	変異パターン	n	遺伝子変異 (+)	変異パターン
negative		12	8 (66.7%)	insertion (3) nonsense (4) splicing site (1)	26	11 (42.3%)	deletion (3) insertion (1) nonsense (5) splicing site (2)
							missense (1)
sporadic	weak	11	0		116	7 (6.0%)	missense+silent (1) nonsense (3) silent (1) splicing site (1)
	strong	-	-		-	-	
mosaic	weak	1	0		24	1 (4.2%)	missense+nonsense (1)
	strong	-	-		1	1 (100%)	missense (1)
nested	weak	-	-		2	1 (50.0%)	nonsense (1)
	strong	7	7 (100%)	missense (7)	13	12 (92.3%)	missense (12)
diffuse	weak	-	-		-	-	missense (36) missense+nonsense (3) missense+silent (1) missense+deletion (1) missense+splicing site (1) nonsense (2)
	strong	11	10 (90.9%)	missense (10)	55	44 (80.0%)	

いずれの染色分布態度でも、進行癌と粘膜内腫瘍との間に遺伝子変異陽性率で有意差は無い。

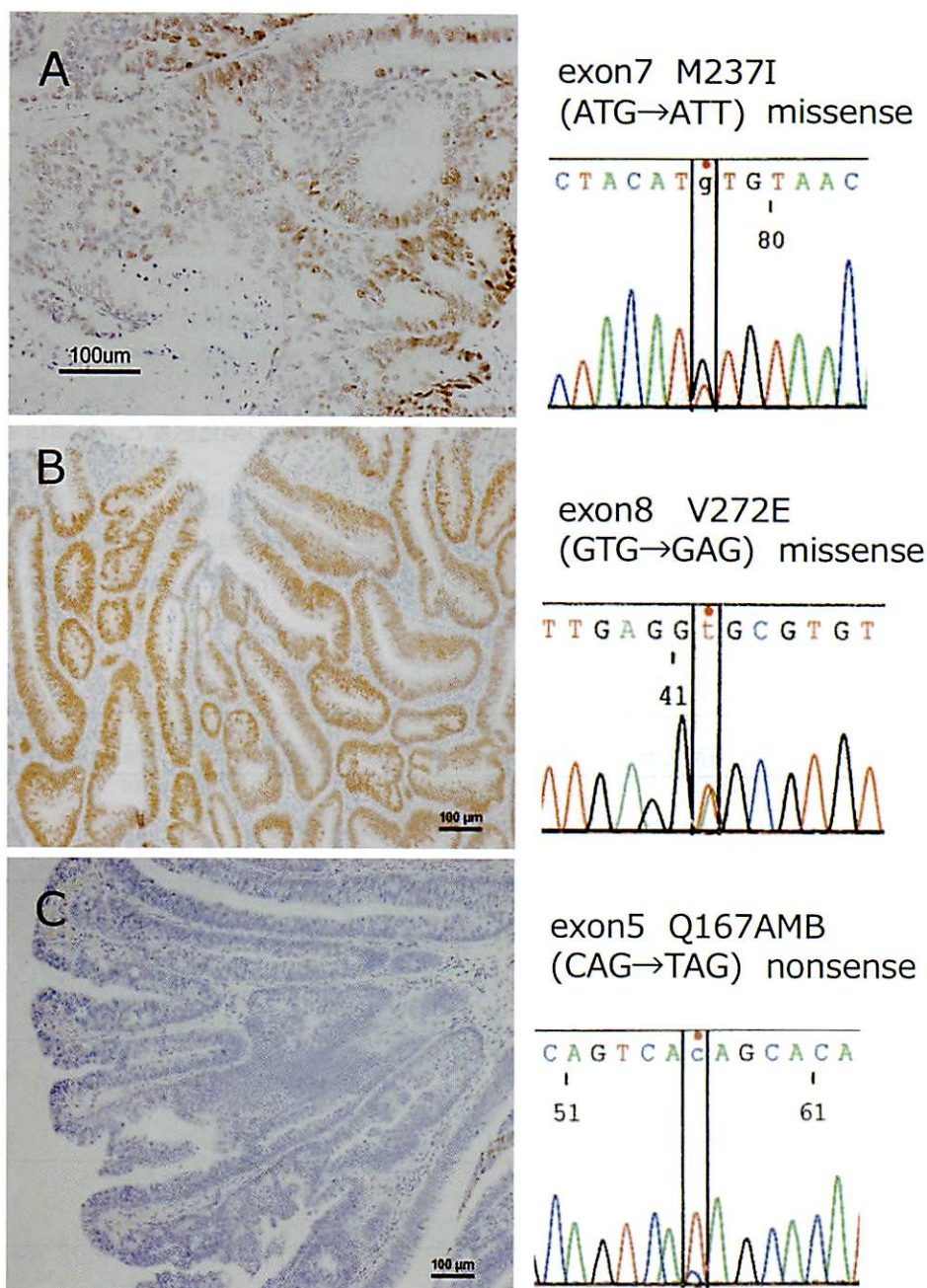


図4 p53免疫染色(PAb1801抗体)による染色態度と遺伝子異常

A: nested/strong, B: diffuse/strong, C: negative. nested/strongとdiffuse/strongの染色態度を示す領域では、p53遺伝子に高頻度で(50～100%)アミノ酸置換を伴う変異(missense mutation)がみられる。他方、negativeの染色態度を示す領域では、蛋白のtruncationを来すdeletion, insertion, nonsense mutation, splicing site mutationなどの変異が起きていることがある(42.3～66.7%)。

表 5 PAb1801 抗体を用いた p53 免疫染色態度と遺伝子変異との相関

染色陽性細胞 分布パターン	p53 遺伝子変異	
	+	-
negative	19 (50.0%)	19
sporadic	7 (5.5%)	120
mosaic	2 (7.7%)	24
nested	20 (90.9%)	2
diffuse	54 (81.8%)	12

* : $p < 0.0001$, (sporadic, mosaic) vs (nested, diffuse)

n.s : not significant

negativeは他の全てのパターンとの間に有意差有り($P < 0.001$)

nested と diffuse は strong が大部分を占めた。

染色陽性領域では, sporadic と mosaic の分布パターンを示すものは遺伝子変異陽性頻度が低く, 進行癌で 0 % (0/11) と 0 % (0/1), 粘膜内腫瘍で 6.0 % (7/116) と 8.0 % (2/25) であった。一方, nested と diffuse の分布パターンを示すものは遺伝子変異陽性率が高く, 進行癌で 100 % (7/7) と 90.9 % (10/11), 粘膜内腫瘍で 86.7 % (13/15) と 80.0 % (44/55) であった (図 4 - A, B)。なお, いずれの染色態度でも, 進行癌と粘膜内腫瘍との間に遺伝子変異陽性率で有意差はなかった。遺伝子変異のパターンは, 進行癌では全領域がアミノ酸置換を伴う missense mutation であり, 粘膜内腫瘍でも 87.9 % (58/66) が missense mutation もしくは missense mutation を伴うものであった。他方, 染色陰性の negative でも進行癌の 66.7 % (8/12), 粘膜内腫瘍の 42.3 % (11/26) に遺伝子変異が認められた。negative 領域に認められた遺伝子変異パターンは染色陽性領域とは異なり, 全て deletion, insertion, nonsense mutation, splicing site mutation など蛋白の truncation をきたす

変異であった (図 4 - C)。

PAb1801 染色では, 同一の陽性細胞分布パターンで異なる染色強度を示す領域が極めて少ないため, 染色態度を陽性細胞分布パターンのみで代表させ, それらと遺伝子変異との相関を検討した (表 5)。染色陽性例では, sporadic (遺伝子変異率 5.5 %) と mosaic (同 7.7 %), nested (同 90.9 %) と diffuse (同 81.8 %) の間で遺伝子変異率に有意差は無く, nested と diffuse は sporadic と mosaic に比べ有意に遺伝子変異率が高かった ($p < 0.0001$)。他方, 染色陰性の negative の遺伝子変異率 (50.0 %) は sporadic と mosaic より有意に高く ($p < 0.001$), nested と diffuse よりも有意に低かった ($p < 0.001$)。

4. DO7 染色の染色態度と p53 遺伝子変異との相関

DO7 染色の染色態度と p53 遺伝子変異との関係を表 6 に示す。進行癌, 粘膜内腫瘍いずれも染色態度は sporadic と mosaic は weak が, nested は strong が大部分を占めたが, diffuse には weak

表6 DO7抗体を用いた p53免疫染色態度と遺伝子変異

染色パターン		進行癌			粘膜内腫瘍		
分布パターン	強度	n	遺伝子変異(+)	変異パターン	n	遺伝子変異(+)	変異パターン
negative		10	8 (80.0%)	insertion (3) nonsense (4) splicing site (1)	12	9 (75.0%)	deletion (3) insertion (1) nonsense (5)
sporadic	weak	6	0		37	5 (13.5%)	missense+silent (1) silent (3) splicing site (1)
	strong	-	-		-	-	
mosaic	weak	9	0		99	4 (4.0%)	missense (2) missense+nonsense (1) nonsense (1)
	strong	-	-		1	1 (100%)	missense (1)
nested	weak	-	-		-	-	
	strong	5	5 (100%)	missense (5)	11	10 (90.9%)	missense (9) nonsense (1)
diffuse	weak	1	0		12	0	
	strong	11	9 (81.8%)	missense (9)	65	45 (69.2%)	missense (36) missense+nonsense (3) missense+silent (1) missense+deletion (1) missense+splicing site (1) nonsense (3)

いずれの染色分布態度でも、進行癌と粘膜内腫瘍との間に遺伝子変異陽性率で有意差は無い。

(14.7 %, 13/89) と strong (85.3 %, 76/89) の2つのパターンがみられた。

染色陽性領域では、sporadic と mosaic の分布パターンを示すものは遺伝子変異陽性頻度が低く、進行癌で0 % (0/6) と0 % (0/9)、粘膜内腫瘍で13.5 % (5/37) と5 % (5/100) であったが、diffuse でも染色強度が weak なものは進行癌、粘膜内腫瘍ともに遺伝子変異は認めなかった(0 %, 0/13)。一方、nested の分布パターンと diffuse の分布パターンで染色強度が strong のものは遺伝子変異率が高く、進行癌で100 % (5/5) と81.8 % (9/11)、粘膜内腫瘍で90.9 % (10/11) と69.2 % (45/65) であった。遺伝子変異のパターンは、進行癌では全領域がアミノ酸置換を伴う missense mutation であり、粘膜内腫瘍でも86.2 % (56/65) が missense mutation もしくは

missense mutation を伴うものであった。いずれの染色態度でも、進行癌と粘膜内腫瘍との間に遺伝子変異陽性率で有意差はなかった。他方、染色陰性の negative でも進行癌の80.0 % (8/10)、粘膜内腫瘍の75.0 % (9/12) に遺伝子変異が認められた。negative 領域に認められた遺伝子変異パターンは染色陽性領域とは異なり、全て deletion, insertion, nonsense mutation, splicing site mutation など蛋白の truncation をきたす変異であった。

DO7 染色でも、sporadic, mosaic, nested の陽性細胞分布パターンでは異なる染色強度を示す領域は極めて少ない。しかし、diffuse は PAb1801 染色とは異なり染色強度 weak と strong の2つのパターンがみられるため、sporadic, mosaic, nested では染色態度を陽性細胞分布パターンのみで代表

表 7 DO7 抗体を用いた p53 免疫染色態度と遺伝子変異との相関

染色陽性細胞 分布パターン	p53 遺伝子変異	
	+	-
negative	17 (77.3%)	5
sporadic	5 (11.6%)	38
mosaic	5 (4.6%)	104
diffuse weak	0	13
nested	15 (93.8%)	1
diffuse strong	54 (71.1%)	22

* : $p < 0.0001$, (sporadic, mosaic, diffuse weak) vs (nested, diffuse strong)

n.s : not significant

negative vs (sporadic, mosaic, diffuse weak): $p < 0.0001$,

negative vs (nested, diffuse strong): n.s

させ、diffuse は weak と strong に分け、それらと遺伝子変異との相関を検討した (表 7)。染色陽性例では、sporadic (遺伝子変異率 11.6 %), mosaic (同 4.6 %), diffuse/weak (同 0 %) の間、nested (同 93.8 %) と diffuse/strong (同 71.1 %) との間で遺伝子変異率に有意差は無く、nested と diffuse/strong は sporadic, mosaic, diffuse/weak に比べ有意に遺伝子変異率が高かった ($p < 0.0001$)。

他方、染色陰性の negative の遺伝子変異率 (77.3 %) は sporadic, mosaic, diffuse weak より有意に高く ($p < 0.001$)、nested と diffuse/strong とは有意差はなかった。

考 察

ホルマリン固定パラフィン包埋切片で使用可能

な抗 p53 蛋白モノクローナル抗体には、市販されているものだけでも 30 種類以上あるが、各抗体を用いた論文を PubMed (～ 2009 年) で検索すると、その 80 % 以上で PAb1801, DO7, DO1, PAb240 のいずれかが用いられている^{10)–26)}。本研究ではそれらの中でも最も汎用されている PAb1801 と DO7 の 2 種類の抗体を用いた免疫染色を行い、それぞれの免疫染色の染色態度の比較および p53 遺伝子変異との相関を検討した。

はじめに、同一領域の PAb1801 染色と DO7 染色の染色態度を比較した (表 3)。これまで、使用するモノクローナル抗体により染色陽性率に解離があることは報告されてきたが¹⁹⁾²¹⁾、具体的な染色態度の違いについての比較検討はされていない。本研究結果では、PAb1801 染色と DO7 染色では染色態度が異なり (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%), DO7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ることがわかった. このことは, 2つのモノクローナル抗体が認識するエピトープが異なる(PAb1801は32-79番アミノ酸, DO7は20-25番アミノ酸) ことにも起因していると推定されるが, p53蛋白の組織学的同定という観点からは, DO7染色はPAb1801染色に比べより感度が高い染色と考えることができる. 個々の施設, 研究者によりp53免疫染色に用いるモノクローナル抗体はほぼ一定していると考えられるが, 異なる抗体を用いた他施設の免疫染色標本を検討する機会も少なくない. その際には, PAb1801染色, DO7染色に関しては, 上述した染色態度の違いを念頭に置く必要がある.

p53免疫染色の病理診断や病理組織学的研究における有用性は, 蛋白過剰発現の同定から背景にある遺伝子変異を推定できることにある. しかし, これまで, どのような染色態度を蛋白過剰発現とするかについての共通基準は確立されていない. p53免疫染色による過剰発現は, 遺伝子変異と有意に高い一致率を示す染色態度をもって規定されるべきであろう. 本研究では, PAb1801染色に関しては, nestedもしくはdiffuseの染色態度を過剰発現とすることが妥当と考えられた. PAb1801染色では陽性細胞分布パターンと染色強度はほぼ対応しており(sporadicとmosaicはweak, nestedとdiffuseはstrong), sporadicとmosaicの遺伝子変異率は5.5%, 7.7%と低頻度で, それに対してnestedとdiffuseの遺伝子変異率は90.9%, 81.8%と高頻度であり, 両群間には有意差があった(表5). 他方, DO7染色に関しては, nestedとdiffuse/strongを過剰発現とすることが妥当と考えられた. DO7染色ではPAb1801染色と同様に, sporadicとmosaicはweakに, nestedはstrongにほぼ対応していたが, diffuseにはweakとstrongの2つの染色強度があった. 従ってDO7染色ではdiffuseをweakとstrongの2つに分け, 染色態度と遺伝子変異との相関について検討した. sporadic, mosaic, diffuse/weakの遺伝子変異

率は11.6%, 4.6%, 0%と低頻度で, それに対してnestedとdiffuse/strongの遺伝子変異率は93.8%と71.1%と高頻度であり, 両群間には有意差があった(表7). DO7染色では, 陽性細胞分布パターンがdiffuseであっても染色弱陽性のものは蛋白過剰発現としないよう注意を要する.

PAb1801染色, DO7染色いずれも蛋白過剰発現が妥当とされる染色態度領域の遺伝子変異は, 進行癌, 粘膜内腫瘍ともに大半がアミノ酸置換を伴うmissense mutation(またはmissense mutationを伴う)であり, 変異型p53蛋白が免疫染色で同定されたものと考えられる. 一方, DO7染色でdiffuse/weakの場合に遺伝子変異が検出されなかった理由は, 上述したようにDO7染色がPAb1801染色に比べ感度が高いことにあると想定される. DO7染色では, PAb1801染色では検出できない野生型p53蛋白の発現も認識している可能性が高いと考えられる.

p53蛋白過剰発現の判定に関しては, これまで, 陽性細胞頻度で規定するもの¹⁷⁾⁻²⁴⁾, 陽性細胞の分布を重視するもの²⁵⁾, 陽性細胞頻度と染色強度を組み合わせるもの²⁶⁾など多岐にわたっている. 本研究で用いた陽性細胞分布パターン分類では, sporadicは陽性細胞頻度20%以下, mosaicは同30-50%, nestedは同50-70%, diffuseは同70%以上に対応している(図3). 本研究結果から, 陽性細胞頻度の点ではいずれの染色でも50%(nested, diffuse)が蛋白過剰発現とするためのカットオフ値であり, DO7染色で過剰発現を判定する際には更に染色強度(diffuseの場合のstrong)を組み合わせることが必要と考えられる.

一方, 蛋白過剰発現とは逆に, 免疫染色陰性病変でも10-30%にはp53遺伝子変異が報告されている¹⁸⁾²¹⁾⁻²³⁾³⁰⁾³¹⁾. 本研究でも, PAb1801染色negativeの50%(19/38), DO7染色negativeの77.3%(17/22)に遺伝子変異が認められ(表5, 表6), PAb1801染色でnegativeの遺伝子変異率は, 蛋白過剰発現とされるnestedやdiffuseに比べても有意に高頻度であった.

免疫染色negativeにみられた遺伝子変異は, その全てがdeletion, insertion, nonsense mutation,

splicing site mutation など蛋白の truncation をきたす変異であった。Yemelyanova ら³¹⁾ は p53 染色で陽性細胞頻度が 60 - 100 % のものと完全に陰性のものには遺伝子変異が存在するとしており、本研究結果とほぼ合致する。truncated 蛋白により抗 p53 モノクローナル抗体では認識できない染色陰性例も、変異型 p53 蛋白を同定する蛋白過剰発現と同様に、その背景には p53 蛋白不活化をきたす遺伝子変異が存在する可能性を考慮する必要がある。

結 論

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、DO7 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。DO7 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。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科分子・診断病理学分野、味岡洋一教授に深謝いたします。また、本研究に関して協力を頂きました同分野職員（山口尚之、佐藤彩子、小林和恵）をはじめ教室の皆様にも深謝いたします。

文 献

- 1) Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ: The p53 proto - oncogene can act as a suppressor of trans - formation. *Cell* 57: 1083 - 1093, 1989.
- 2) Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304 - 6311, 1991.
- 3) Lane DP: p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15 - 16, 1992.
- 4) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hosteller R, Cleary K, Signer SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weslon A, Modali R, Harris CC and Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705 - 708, 1989.
- 5) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49 - 53, 1991.
- 6) Gronostajski RM, Goldberg AL and Pardee AB: Energy requirement for degradation of tumor - associated protein p53. *Mol Cell Biol* 4: 442 - 448, 1984.
- 7) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M and Levine AJ: Activating mutations for trans - formation by p53 produce a gene product that forms an hsc70 - p53 complex with an altered half - life. *Mol Cell Biol* 8: 531 - 539, 1988.
- 8) Oren M: p53: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* 6: 3169 - 3176, 1992.
- 9) Hussain SP and Harris CC: Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58: 4023 - 4037, 1998.
- 10) Allred DC, Harvey JM, Berardo M and Clark GM: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11: 155 - 168, 1998.
- 11) Grzybicki DM and Moore SA: Implications of prognostic markers in brain tumors. *Clin Lab Med* 19: 833 - 847, 1999.
- 12) Dworakowska D, Gozdz S, Jassem E, Badzio A, Kobierska G, Urbaniak A, Skokowski J, Damps I and Jassem J: Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non - small cell lung cancer. *Lung Cancer* 35: 35 - 41, 2002.
- 13) Munro AJ, Lain S and Lane DP: P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a system -

- atic review. *Br J Cancer* 92: 434 - 444, 2005.
- 14) Cappello F, Ribbene A, Campanella C, Czarnecka AM, Anzalone R, Bucchieri F, Palma A and Zummo G: The value of immunohistochemical research on PCNA, p53 and heat shock proteins in prostate cancer management: a review. *Eur J Histochem* 50: 25 - 34, 2006.
 - 15) Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Kokkola A and Haglund C: Comparison of the prognostic value of a panel of tissue tumor markers and established clinicopathological factors in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 28: 2279 - 2287, 2008.
 - 16) Vang R, Shih IeM and Kurman RJ: Ovarian low - grade and high - grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* 16: 267 - 282, 2009.
 - 17) Porter PL, Gown AM, Kramp SG and Coltrera MD: Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol* 140: 145 - 153, 1992.
 - 18) Smith DR, Ji C - Y and Goh H - S: Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 74: 216 - 223, 1996.
 - 19) Zhang H: Evaluation of four antibodies in detecting p53 protein for predicting clinicopathological and prognostic significance in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 4126 - 4132, 1999.
 - 20) Ghavam - Nasiri M - R, Rezaei E, Ghafarzadegan K, Seilanian - Toosi M and Malekifard H: Expression of p53 in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathologic features. *Arch Iranian Med* 10: 38 - 42, 2007.
 - 21) Bertorelle R, Esposito G, Belluco C, Bonaldi L, Mistro AD, Nitti D, Lise M and Chieco - Bianchi L: p53 gene alterations and protein accumulation in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 49: M85 - M90, 1996.
 - 22) Nasierowska - Guttmeier A, Trzeciak L, Nowacki MP and Ostrowski J: p53 protein accumulation and p53 gene mutation in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 6: 275 - 279, 2000.
 - 23) George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, Groshen S, Stein J, Skinner D, Jones PA and Cote RJ: p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 25: 5352 - 5358, 2007.
 - 24) Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Yamaji T, Loda M and Fuchs CS: Loss of nuclear p27 (CDKN1B/KIP1) in colorectal cancer is correlated with microsatellite instability and CIMP. *Mod Pathol* 20: 15 - 22, 2007.
 - 25) 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.
 - 26) Fernando SSE, Wu X and Perera LS: p53 overexpression and steroid hormone receptor status in endometrial carcinoma. *In J Sur Pathol* 8: 213 - 222, 2000.
 - 27) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約, 第8版, 金原出版, 東京, 2013.
 - 28) Yamada S, Ajioka Y, Watanabe H, Hashidate H, Takaku H, Kazama S, Yokoyama J, Nishikura K, Fujiwara T and Asakura H: Heterogeneity of p53 mutation status in intramucosal carcinoma of the colorectum. *Jpn J Cancer Res* 92: 161 - 166, 2001.
 - 29) Montesano R, Hollstein M and Hainaut P: Genetic alteration in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 69: 225 - 235, 1996.
 - 30) Dix B, Robbins P, Carrello S, House A and Iacopetta B: Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 70: 585 - 590, 1994.
 - 31) Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM and Kurman RJ: Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 24: 1248 - 1253, 2011.

(平成27年1月20日受付)