

論文の内容の要約

氏名：工藤 逸大

博士の専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in *TP53*-mutated maxillary carcinoma

（TP53 変異型上顎癌における特徴的な遺伝子の発現亢進と p53 発現細胞の不均一な組織内分布）

背景

頭頸部癌の罹患率は大腸がん、胃がんの罹患率と比較するとかなり低い。しかし最新の癌統計では、口腔咽頭がん、喉頭がんは増加傾向にある。頭頸部癌はいまだ克服し得ない疾患で、5 年生存率は約 50%である。ここ数十年頭頸部癌の予後の改善は乏しいのが現状である。中でも上顎洞癌は自覚症状が少なく、進展して症状が出現するため、治療開始時にはすでに癌が進行していることが多い。よって治療後の良好な QOL を得られないことが、特徴としてあげられる。上顎洞癌の治療は化学療法、放射線治療、手術を組み合わせた集学的治療が一般的である。化学療法として 動脈注射では白金製剤、フルオロウラシル系薬剤が選択されることが多い。全身投与では白金製剤を中心とした多剤併用療法が行われる。放射線治療は 60~70 Gy / 30~35 回 / 6~7 週の外照射が一般的である。手術は化学療法、放射線治療により縮小させてから行われることが多い。実際、化学療法、放射線治療により約半数の症例は組織病理学的に腫瘍が残り、最終的には外科的に切除される。シスプラチン（CDDP）は上顎癌の治療において中心的役割を果たすが、現在、CDDP 耐性を示す症例の存在が問題となっている。そこで、化学療法抵抗性遺伝子が上顎癌の CDDP 耐性に関与しているかどうかを調べるために、治療前の上顎扁平上皮癌生検で遺伝子発現を解析した。その結果、治療抵抗性機能を示す遺伝子群は治療抵抗性を示す症例で逆に発現が低下しており、唯一 TP53 変異が治療抵抗性と有意に相関を示した。頭頸部扁平上皮癌 279 例（The Cancer Genome Atlas）でも、TP53 変異癌が野生型癌に比べ生命予後が悪い（ $p=0.0493$ ）ことが示されている。最近、頭頸部癌の全エクソーム解析から、主要なドライバー変異遺伝子として TP53 の変異が報告された。TP53 変異のない腫瘍はほとんどがヒトパピローマウイルス陽性で、相互排他的であった。いずれも TP53 機能不全を介する機序が癌化に関与すると考えられた。しかし TP53 変異には機能獲得型変異もあることが示されており、TP53 変異の有無により上顎癌の生物学的違いのあることも予想された。そこで、本研究では、TP53 変異癌が変異のない癌と比べ、遺伝子発現パターンにどのような相違がみられるか検討した。

材料と方法

（1）対象

治療前検査の上顎癌生検組織14例を対象とした。これらの14例の癌部からtotal RNAを抽出した。

（2）TP53遺伝子変異解析

Total RNAからcDNAを合成し、TP53遺伝子の変異多発領域（aa115-aa342）をPCRし、Sanger法により塩基配列解析を行い、変異の有無を決定した。

（3）包括的遺伝子発現解析

TP53変異の有無でのおのおの5症例について、Affymetrix社のGenechip Human Genome U133 Plus 2.0 arrayを用い、包括的遺伝子発現解析を行った。発現量比較解析にはGeneSpring v7 (Silicon Genetics, Redwood, CA)を用いた。発現量に差のあった遺伝子42個について、mRNA発現量をリアルタイムPCRで定量し検証した。

(4) 免疫組織化学

生検癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋組織から4 μ mで薄切標本を作成し、脱パラフィン、抗原賦活化後、CSTA, SFN, DSC3とTP53に対する抗体およびペルオキシダーゼ標識2次抗体を用いて、免疫染色を行った。

結果

(1) TP53 遺伝子変異

14 症例中 8 例に TP53 変異を認めた。それらは点突然変異 5 例、スプライシング異常 2 例、フレームシフト変異 1 例であった。TP53 変異癌症例と野生型癌症例とでは、臨床病理学的背景には有意差はなかったが、患者年齢だけは有意差が認められ、変異癌患者の平均年齢は 9.6 歳高かった。TP53 の mRNA 発現量は、2 群間で有意差は無かった。

(2) TP53 遺伝子変異の有無による遺伝子発現の違い

10 枚の Genechip を用いた包括的遺伝子発現解析の結果、TP53 変異症例で発現が 3 倍以上増加していた遺伝子が 92、発現が 1/3 以下に低下していた遺伝子が 30 であった。これら 122 個の遺伝子の発現パターンから、10 症例が正確に TP53 変異の有無で 2 つのクラスターに分類された。さらに 4 倍以上差のあった 42 遺伝子を、リアルタイム PCR による発現定量で検証したところ、変異癌で発現が高い 18 遺伝子と低い 3 遺伝子が明らかになった。18 遺伝子には DSC3, GRHL1, EPPK1, PROM2, ANXA8, DSP, JUP, KRT6B など細胞接着関連遺伝子が 8 つ、SFN, CLCA2, SAMD9, TP63 など細胞増殖抑制関連遺伝子が 4 つ見出された。このように予想外にも細胞接着の亢進、細胞増殖の抑制が特徴としてとらえられた。

TP53 変異癌で最も発現倍率が高かった 3 遺伝子-CSTA, SFN, DSC3-について免疫組織化学を行ったところ、いずれもタンパク質レベルで TP53 変異癌に強い発現を示した。さらに p53 タンパク質の組織内発現を検討したところ、正常副鼻腔粘膜は陰性で、TP53 野生型癌では癌細胞全体が核陽性であった。TP53 変異癌では癌全体が染まらず、間質と接する辺縁部の癌細胞のみ核が強く染色された。腫瘍の分化度により p53 の染色パターンの違いをマン・ホイットニー検定で検定したが有意差は認めなかった ($p=0.759$)。

考察

TP53 変異癌組織と野生型 TP53 癌組織では明らかな遺伝子発現の差を認めた。特徴的なものとして細胞接着関連遺伝子の発現増加、細胞増殖抑制関連遺伝子の発現増加が認められた。TP53 変異乳癌では細胞周期および細胞分裂を刺激する遺伝子発現が増加し、TP53 変異は予後不良因子であることが示されている。しかし、上顎癌ではむしろ逆の結果が得られ興味深い。特に CSTA, SFN に関しては、TP53 変異癌で 100 倍以上の発現亢進が認められた。CSTA は、カテプシン B を特異的に阻害するシステインプロテアーゼ阻害剤である。カテプシン B は、腫瘍細胞表面に局在し、細胞外マトリックス (ECM) を分解するため、癌の進行に関与する。CSTA 過剰発現の癌では、より効率的に ECM 分解を阻害し、癌進行を抑制すると考えられる。実際、CSTA 発現亢進と関連して喉頭癌の浸潤および増殖の阻害、乳癌の遠隔転移の減少が報告されている。一方で鼻咽頭癌では予後不良と関連しているとされる。上顎癌での TP53 変異は治療抵抗性を示すが、実際のところ増殖、浸潤、転移に抑制的か促進的かは別問題であり、CSTA 過剰発現から単純には決められない。

過剰発現した SFN (別名 14-3-3 σ タンパク質) もまた、細胞周期 G2 停止を起こすがん抑制タンパク質と考えられ、この他 c-Myc の分解増強による腫瘍代謝抑制も報告されている。しかし、SFN 発現の高い腫瘍も報告されており、癌の増殖および抗癌剤耐性を増加させるため腫瘍進展タンパク質とみなすこともできる。SFN はデスモソーム接着を減少させ細胞移動を増加させる報告もあるが、TP53 変異上

顎癌ではデスモソーム構造タンパク質をコードする DSC3、DSP、および JUP の発現増加が観察されており、逆に細胞接着の亢進が示唆された。HPV 陽性咽頭扁平上皮癌は、HPV 陰性癌と比較して上皮間葉転換が亢進しているといわれており、今回の結果-TP53 変異癌（多くは HPV 陰性癌）の細胞接着亢進と一致する。

p53 は予想どおり正常細胞には染まらず、癌細胞の核だけが強く染まった。興味深いことに、変異 p53 は野生型 p53 に比べ強い発現を示し、しかも陽性癌細胞は間質と接する辺縁部にのみ局在を示した。このような不均一な染色パターンを示す癌症例の報告はなく、はじめて TP53 変異上顎癌組織に見出した。腫瘍中心部の癌細胞が変異 p53 も野生型 p53 も作られなくなる理由は不明である。が、このような野生型 p53 すら合成されない癌細胞の存在は、治療抵抗性を示す機序となりうる。最近、TP53 のミスセンス変異は機能獲得型突然変異として理解されるようになってきた。実際、上顎癌でも変異 p53 が、野生型 p53 ではできない転写活性化をおこす新しい転写因子として働き、複数の遺伝子の発現亢進を起こした可能性はある。しかし、本研究で発現が増加した遺伝子は、ほとんどが接着および細胞増殖阻害において役割を果たしており、癌の進行および悪性形質転換とは反対の腫瘍表現型をもたらすことを示唆した。今後、TP53 変異癌で発現亢進を認めた遺伝子が、治療抵抗性に直接寄与するかを培養がん細胞系で検討する必要があるだろう。また TP53 変異癌の p53 偏在の原因とその意義については興味深い問題であり、偏在発現する p53 は、変異型か野生型か、また TP53 遺伝子変異が偏在するかも知りたいところである。間質と TP53 変異癌細胞との相互作用が発現に関連する可能性もあり、今後がん細胞と間質細胞との共培養から、p53 発現変化を検討することも必要となるであろう。