

氏名	はしもと きよし 橋 本 潔
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第469号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	MCM2 and Ki-67 Expression in Human Lung Adenocarcinoma: Prognostic Implications (ヒト肺腺癌における MCM2 および Ki-67 の発現：予後との関連)
学位論文審査委員	(主査) 貝原信明 (副査) 井藤久雄 清水英治

学位論文の内容の要旨

Minichromosome maintenance (MCM) 蛋白はMCM2~7の異なった核蛋白より構成されて、DNA複製に重要な役割を果たしており、細胞周期で1度だけDNA複製が行われることを保証する「ライセンス化」に関わる因子である。近年、MCM蛋白発現が細胞増殖活性との関連性を示す報告が散見され、悪性度の指標となりうる可能性が示唆されているが、未だ十分な知見の蓄積はない。近年、我が国においては肺腺癌が増加している。そこで、本研究ではヒト肺腺癌細胞におけるMCM2発現をKi-67とP53のそれと比較しつつ免疫組織化学的に検討した。さらに、予後因子としての意義について解析した。

症例と方法

ヒト肺腺癌培養細胞株6株におけるMCM2発現を、Western blotにて検討した。また、外科的に切除された肺腺癌145例のパラフィン包埋ブロックから代表的切片を選択した。その内訳は細気管支肺胞上皮癌(以下、肺胞上皮癌)23例、非細気管支肺胞上皮癌(以下、非肺胞上皮癌)122例である。鳥取大学医学部病理学第一講座で作製された抗MCM2抗体(2H10)および抗Ki-67抗体(MIB1)、抗P53抗体(P0-7)を用いて免疫組織化学を行った。いずれも1000腫瘍細胞中の陽性細胞率を算定し、標識率(%)を算出した。判定は高発現例と低発現例に分類したが、前者の基準はMCM2では40%以上、Ki-67は20%以上、P53は10%以上とした。

なお、本研究は鳥取大学医学部倫理委員会の承認を受けた(番号283)。

結果

MCM2蛋白は全ての肺癌培養細胞株から抽出された蛋白質を用いたWestern blotで120 kDa近傍に2本のバンドとして種々の程度に検出された。その他の非特異的バンドは見いだされなかった。

MCM2、Ki-67の免疫活性は何れも核に見いだされたが、分裂核にはKi-67のみ見いだされた。MCM2とKi-67のLIは肺胞上皮癌で各々 6.9 ± 3.1 、 5.8 ± 2.5 、非肺胞上皮癌で 46.6 ± 2.7 、 33.0 ± 2.2 であり、何

れも後者において標識率が有意に高かった ($P < 0.01$)。

MCM2高発現例69例と低発現例76例について比較すると、前者は女性よりも男性 ($P = 0.02$)、肺胞上皮癌よりも非肺胞上皮癌 ($P < 0.01$)、高分化型より中低分化型 ($P < 0.01$)、pStage I、IIよりIII ($P < 0.01$)、Ki-67低発現症例より高発現症例 ($P < 0.01$)、P53低発現症例より高発現症例 ($P < 0.01$) で有意に頻度が高かった。

平均生存率は肺胞上皮癌では83.2ヶ月、非肺胞上皮癌で45.0ヶ月であり、後者において有意に予後不良であった ($P < 0.01$)。非肺胞上皮癌をMCM2もしくはKi-67高発現例80例と両者とも低発現であった42例を比較すると、前者は有意に予後不良であった ($P < 0.01$)。Cox比例ハザードモデルを用いた単変量解析では、非肺胞上皮癌におけるMCM2高発現症例 ($P = 0.04$)、Ki-67の高発現症例 ($P = 0.02$) は何れも有意に予後不良であった。一方、P53の発現と患者の生命予後に相関はなかった。MCM2 and/or Ki-67高発現80症例は両者低発現42症例と比較して有意に予後不良であり ($P < 0.01$)、ハザード比は2.28とマーカーの中で最高値を示した。多変量解析では「pStage III」 ($P < 0.01$)、「男性」 ($P = 0.02$)、「MCM2 and /or Ki-67高発現」 ($P = 0.04$) は独立した予後因子であることが示された。

考 察

本研究で用いた抗MCM2抗体2H10はWestern blot解析で120kDa近傍に2本のバンドを認識した。MCM2はリン酸化により機能調節されていることが知られており、上位のバンドはリン酸化MCM2と見なされる。他にエキストラバンドが見いだされないことから、本抗体の特異性が示された。

Ki-67はG0期からG1期に入った細胞では陰性であり、M期からG1期に入った細胞ではG1晩期からM期までに免疫活性を示す。事実、分裂核にもKi-67が見いだされた。他方、MCM2はG1、S、G2期に発現している。こうした発現様式は、腺癌細胞における標識率はKi-67よりもMCM2において高いことによって説明される。加えて、MCM2とKi-67発現を同時に解析することは、細胞周期のより広い範囲を捉えることになり、両者の高発現が肺癌患者の予後と関連することが理解される。

肺胞上皮癌は非肺胞上皮癌よりも予後良好であることが示されており、本研究でも確認された。両者を比較すると、標識率はMCM2、Ki-67とも肺胞上皮癌で有意に低値であったことは、両分子の予後因子としての有用性を示唆している。

非肺胞上皮癌ではMCM2、Ki-67の発現に加え、性と病期が独立した予後因子であることが示された。病期が予後と関連することは肺癌に限らず、多くのヒト悪性腫瘍で確認されている。興味あることに、肺癌では女性より男性の予後が不良であることが報告されているが、その詳細な機序解明は今後に残された課題である。

なお、P53とMCM2発現には有意な相関が見いだされた。しかしながら、P53発現と患者予後との関連は見いだされなかった。

結 語

非肺胞上皮癌患者は肺胞上皮癌患者よりも予後が不良である。非肺胞上皮癌ではMCM2とKi-67蛋白の発現解析により、患者予後の判定に有用な情報が得られることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究ではヒト肺腺癌における MCM2 蛋白発現の意義を、P53 蛋白、Ki-67 蛋白発現と比較しつつ検討を加えている。用いた抗体は本研究者が所属する研究グループにより独自に作製されたものであり、その特異性はウエスタン・ブロット法で確認されている。その結果、MCM2 は肺癌培養細胞株の何れにおいても種々の程度に発現していることを示した。免疫組織化学的検討から、MCM2 と Ki-67 標識率は肺胞上皮癌より非肺胞上皮癌で有意に高いこと、また、何れの病変においても MCM2 標識率は Ki-67 標識率よりも有意に高いことを示した。加えて、MCM2 高発現は性、組織型、分化度、病期、Ki-67 および P53 発現に関連しており、非肺胞上皮癌では MCM2 もしくは Ki-67 高発現例では予後不良であり、独立した予後因子であることを示した。かかる知見はヒト肺腺癌細胞における MCM2、Ki-67 発現の臨床病理学的意義について解明したものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。