

Ta 膀胱腫瘍の Stage-up 例における p53 蛋白の免疫組織化学的検討

立川共済病院泌尿器科 (部長: 藤岡俊夫)

塚本 拓司, 藤岡 俊夫, 中野 浩之, 高梨 勝男

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION FOR p53 OVEREXPRESSION IN Ta BLADDER CANCER WITH DISEASE PROGRESSION

Takuji TSUKAMOTO, Toshio FUJIOKA, Hiroyuki NAKANO and Katuo TAKANASHI

From the Department of Urology, Tachikawa Kyousai Hospital

To evaluate the significance of p53 overexpression on the progression of bladder cancer, seven patients with Ta bladder cancer who eventually progressed to the invasive stage ($\geq$ stage T1) were immunohistochemically analyzed. The immunohistochemical study was performed using the p53 protein antibody on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from all primary and recurrent tumors. In three patients, immunoreactivity was detected only at the time of disease progression, suggesting that p53 mutation may be related to the disease. However, since no staining could not be found in stage Ta bladder cancer, the patient with a risk of progression could not be detected by this immunohistochemical study.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 347-349, 1996)

Key words: Bladder cancer, p53 protein, Progression

緒 言

近年の分子生物学の進歩に伴い、膀胱腫瘍に関してさまざまな遺伝子の異常が発見され、発癌機構の遺伝子レベルでの解析が進んでいる。とくに p53 癌抑制遺伝子 (以下、p53 遺伝子) は、膀胱腫瘍の中でも浸潤癌にその変異が多く認められることから、表在性腫瘍の stage-up における役割が注目されている¹⁾。

p53 遺伝子は、17番染色体短腕 (17p) に位置し、その変異は多くの癌種で報告されている²⁾。野生型の遺伝子は 53-kD の核内蛋白をコードしており、この蛋白は DNA と結合して細胞増殖を抑制し、従って、遺伝子の変異により癌化が促進されると考えられている²⁾。

核内の野生型 p53 蛋白は生物学的半減期が短いのに対し、変異型のそれは延長することが知られている³⁾。このため、p53 遺伝子の変異により、核内に p53 蛋白が蓄積され、蛋白の過剰発現 (p53 overexpression) として認められる。抗 p53 蛋白抗体を用いた免疫組織化学的検査では、野生型の p53 蛋白は微量しか存在しないため検出されないが、一方、変異型は核内で増加するため、検出可能となる⁴⁾。

表在性膀胱腫瘍が浸潤性腫瘍として再発する stage-up に関し、従来、さまざまな検討がなされてきたが、これを予測する有用な危険因子については一定の見解がえられていないのが現状である。しかし、最

近、免疫組織化学的に検討された p53 overexpression の有無が、stage-up の予測に関し有用であるという報告がみられ、注目されている⁵⁾。そこで、われわれの施設で経験した進達度 Ta の膀胱腫瘍 (以下、Ta 膀胱腫瘍) が浸潤癌 (進達度 T1 以上) として再発した症例に注目し、これらの全経過中における p53 overexpression の有無を検討する目的で、抗 p53 蛋白抗体を用いて免疫組織化学的検索を加えた。

対 象 と 方 法

1981年より1988年の8年間に当院で TUR-Bt を初回治療として行い、5年以上の経過観察が可能であった Ta 膀胱腫瘍症例は88例であった。このうち、経過観察中に T1 以上に stage-up した症例を8例 (9%) 認めた。この8例中、経過中の全標本の検討が可能であった7例を今回の対象とした (Table 1)。

p53 overexpression に関する免疫組織化学的検討は、抗 p53 蛋白抗体としてニチレイ ポリクローナル抗体を用いて、酵素抗体法によりパラフィン包埋切片を染色した。まず、パラフィン包埋された標本を薄切し、通常の方法で脱パラフィンを行った。その後の染色は DACO LSAB キットを使用して施行した。すなわち、最初に3%過酸化水素メタノールで内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、正常山羊血清を加えた。つぎに、一次抗体としてニチレイ抗 p53 ポリクローナル抗体を加え、30分間室温で反応させた後、

Table 1. Results of immunostaining for p53 in bladder tumors. Positive staining was seen in 3 patients (case 1-3) at the time of progression

症 例 & 年 齢	初発腫瘍	1 回目再発	2 回目再発	3 回目再発	4 回目再発	5 回目再発	6 回目再発	7 回目再発	転 帰
症例 1 52M	G1 単発	*22M後 ★G1Ta	41M後 G1Ta	76M後 G2T1					96M後 経過観察中 再発なし
症例 2 45M	G2 多発	33M後 G2Ta	39M後 G2Ta	54M後 G2Ta	100M後 G2Ta	108M後 G2Ta	129M後 G2TIS	170M後 G3T1	198M後 経過観察中 再発なし
症例 3 81M	G2 多発	5M後 G2Ta	9M後 G2Ta	23M後 G2Ta	154M後 G2T1				157M後 drop-out
症例 4 70M	G2 単発	19M後 G2TIS	24M後 G2T1						90M後 経過観察中 再発なし
症例 5 72F	G2 単発	116M後 G2Ta	152M後 G3T2						164M後 経過観察中 再発なし
症例 6 72M	G2 単発	11M後 G2Ta	57M後 G1Ta	84M後 G2T3a					120M後 drop-out
症例 7 54M	G2 単発	4M後 G1Ta	31M後 G1Ta	34M後 G2Ta	42M後 G2Ta	45M後 G2Ta	48M後 G2T1	60M後 G2T2	90M後 経過観察中 再発なし

背景が黒で示された再発は p53 陽性を示す。

* 初回 TUR から再発までの期間

★再発時の異型度と深達度

ビオチン化二次抗体と10分間反応させた。最後に、HRP 標識ストレプトアビジンと反応させ、ジアミノベンチジンで発色した。なお、核染色はメチルグリーンにて施行している。

結 果

今回の検討では、腫瘍の5%以上が染色された症例を p53 蛋白陽性とした。p53 蛋白陽性例では、いずれも腫瘍部分の核内が染色され、非腫瘍部や間質の核が染色されることはなかった (Fig. 1)。

Table 1 に染色結果を示した。7 例中 p53 蛋白陽性例は、症例 1～3 の 3 例であった。これらの症例で、

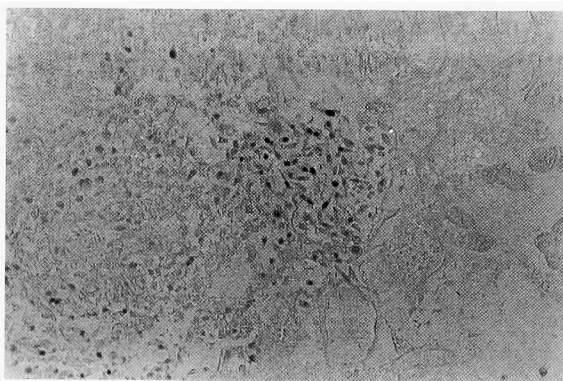


Fig. 1. Nuclei of tumor cells exhibit positive staining with anti-p53 monoclonal antibody while normal urothelium and stromal cells are unreactive (×200).

p53 蛋白はいずれも T1 に stage-up した時点で初めて陽性となった。

一方、全症例の経過を通じて Ta 膀胱腫瘍には、p53 蛋白陽性例を認めなかった。また、TIS 膀胱腫瘍を 2 例認め (症例 2 & 4)、いずれも stage-up 直前の再発時に発症したが、免疫組織化学的には p53 蛋白は陰性であった。さらに、症例 5～7 では、stage-up 時に筋層浸潤を認めたものの、全経過中で免疫組織化学的に p53 蛋白は認められなかった。

考 察

膀胱腫瘍における p53 遺伝子の変異に関しては、1990年 Olumi らが、p53 遺伝子が位置する 17p の欠失に関して初めて報告している⁶⁾。さらに、1991年 Sidransky らは、18例の浸潤性膀胱腫瘍における p53 遺伝子の変異を検討し、その61%に点突然変異を含む変異を見いだしている⁷⁾。その後も、p53 遺伝子の変異に関し検討が加えられ、浸潤性膀胱腫瘍において高頻度に変異が認められることから、Sidransky らは p53 遺伝子の変異が表在性膀胱腫瘍を浸潤癌化させるという仮説を示している¹⁾。

p53 遺伝子の変異と免疫組織化学的に検出された p53 overexpression との関係について、Esrig らは32例の膀胱腫瘍症例を用いて検討している。これによると、分子生物学的手法により検出された p53 遺伝子変異の内、84%が免疫組織化学的に検出されたとして

いる⁸⁾ すなわち, 高い相関を認めるものの, 約20%の症例では免疫組織化学的には検出できないことになる⁹⁾ また, 一方, p53 overexpression が必ずしも p53 遺伝子の変異を意味しない場合もある⁹⁾ 今回の検討では, p53 overexpression が免疫組織化学的に認められた例は, いずれも浸潤性膀胱腫瘍に stage-up した時点であった. 上記のように, 免疫組織化学的検査の結果から p53 遺伝子変異の有無を検討する場合, 両者は必ずしも一致しないことを念頭に置かなければならないが⁹⁾, しかし, Sidransky らの仮説と同様, p53 遺伝子の変異と表在性膀胱腫瘍の stage-up が関係していると推察することは, 今回の結果からも可能であると思われた.

Sarkis らは膀胱腫瘍の p53 overexpression を免疫組織化学的に検討し, Ta の35%, TIS 61%が p53 蛋白陽性であり, さらに, 陽性例が有意に高率に stage-up したと報告している^{5,10)} われわれの検討では Ta および TIS の腫瘍はまったく染色されず, stage-up の危険因子としての p53 overexpression の意義は不明であった. しかし, 今回の結果を考える際, 組織の固定状態による p53 蛋白の変性などの false negative の可能性も⁸⁾ 考慮しなければならない. 加えて, 対象症例も7例と少ないことから, 表在性膀胱腫瘍における p53 overexpression の免疫組織化学的検索の意義に関しては, さらに症例を増やして検討する必要があると思われた.

結 語

Ta 膀胱腫瘍の stage-up 症例に対し, 免疫組織化学的に p53 overexpression の有無を検討した.

Stage-up 症例の経過中, p53 蛋白は浸潤癌 (T1 以上) になった時点で初めて陽性となった. この結果から p53 遺伝子の変異と表在性膀胱腫瘍の stage-up の関係が示唆された. 一方, 進達度 Ta や TIS の表在性膀胱腫瘍で p53 overexpression は検出されず, 今回の検討では表在性膀胱腫瘍の stage-up を p53 overexpression を用いて予見することはできなかった. しかし, 症例数も7例と少ないことから, さらに

検討を加えることが必要と思われた.

文 献

- 1) Sidransky D and Messing E: Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. *Urol Clin North Am* **19**: 629-639, 1992
- 2) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al.: p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53, 1991
- 3) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, et al.: 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
- 4) Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al.: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* **335**: 675-677, 1991
- 5) Sarkis AS, Zhang JF, Cordon-Cardo C, et al.: p53 nuclear overexpression and disease progression in Ta bladder carcinoma. *Int J Oncol* **3**: 355-360, 1993
- 6) Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, et al.: Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* **50**: 7081-7083, 1990
- 7) Sidransky D, Eschenbach AV, Tsai YC, et al.: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* **252**: 706-709, 1991
- 8) Esrig D, Spruck CH III, Nichols PW, et al.: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* **143**: 1389-1397, 1993
- 9) Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al.: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New Engl J Med* **331**: 1259-1264, 1994
- 10) Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al.: Association of p53 nuclear over-expression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* **152**: 388-392, 1994

(Received on June 8, 1995)

(Accepted on February 20, 1996)