

# I 期非小細胞肺癌における VEGF および p53 蛋白発現の比較検討

Comparison of VEGF and p53 Protein Expression  
in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer

尾高 真・佐藤修二・増淵正隆・鈴木英之・平野 純  
朝倉 潤・山下 誠・三好 勲・秋葉直志・山崎洋次

**要旨**：原発性 I 期非小細胞肺癌切除例 67 例を対象として VEGF 蛋白および p53 蛋白の発現と予後との関連を免疫組織学的に検討した。VEGF 蛋白は 67 例中 20 例 (30%)、p53 蛋白は 57 例中 26 例 (46%) が陽性であった。VEGF 蛋白の陽性率は腺癌で有意に高かった ( $p=0.011$ )。分化度、T 因子、p 因子別では有意差を認めなかった。再発は VEGF 陽性例で有意に多く、特に遠隔転移症例が多かった ( $p=0.016$ )。予後との関連は VEGF 陽性例の生存期間中央値は 52.2 カ月で陰性例の 78.5 カ月に比べ有意に予後不良であった ( $p=0.0054$ )。p53 蛋白発現の有無と再発、生存率には関連を認めなかった。p53 蛋白陽性例における VEGF 蛋白陽性率は p53 蛋白陰性例のそれに比べ高かったが、両蛋白発現の相関は認めなかった。I 期非小細胞肺癌において VEGF 蛋白の発現は予後因子になり得ると思われた。

〔肺癌 40 (1): 11~15, 2000, JJLC 40: 11~15, 2000〕

**Key words** : VEGF, p53, Non small cell lung cancer

## はじめに

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は癌組織における血管新生を促進させることにより癌の増殖、転移を引き起こす。また p53 は癌の発生、増殖に関わる重要な癌抑制遺伝子であるが血管新生にも関与すると報告されている<sup>1)</sup>。そこで I 期非小細胞肺癌切除例における VEGF 蛋白、p53 蛋白の発現を免疫組織学的に調べ、VEGF、p53 の臨床的意義を検討するとともに、両者の関連を明らかにすることを目的とした。

## 対 象

1985 年 4 月から 1997 年 12 月の間に当科で切除した原発性非小細胞肺癌のうち、絶対治癒切除が行われた術後病理病期が I 期の 67 例を対象とした。年齢は 40 歳から 85 歳 (平均 63.7 歳) で、性別では男性 47 例、女性 20 例であった。組織型は扁平上皮癌 32 例、腺癌 31 例、大細胞癌 4 例であった。分化度は高分化型 18 例、中分化型 27 例、低分化型 22 例で、p 因子は p0; 38 例、p1; 23 例、p2; 4 例であった。

## 方 法

### 1) VEGF 蛋白の染色

10% ホルマリン固定パラフィン包埋標本を 4 $\mu$ m に薄切し、脱パラフィンした切片を用いた。phosphate-

buffered saline (PBS) で 1:100 に希釈した抗ヒト VEGF モノクローナル抗体 (Novocastra 社, Clone R11) を 1 次抗体とし、4 overnight で反応させた。PBS で洗浄し 2 次抗体 (SAB-PO (M) キット) により、diaminobenzidine で発色させヘマトキシリンで核を染色した。

### 2) p53 蛋白の染色

VEGF と同様に抗ヒト p53 モノクローナル抗体 (Novocastra 社, clone Do7) による免疫組織化学染色を行った。

### 3) 判定基準

VEGF 蛋白発現の判定は 20% 以上の腫瘍細胞の細胞質が明らかに強く染色されたものを陽性とした。p53 蛋白発現の判定は 10% 以上の腫瘍細胞の核が明らかに染色されたものを陽性とした。

### 4) 統計学的分析

2 群間の有意差検定には  $\chi^2$  検定または Fisher の直接確率法を用いた。生存率の検討は Kaplan-Meier 法を用い、生存率の差の検定には Log-rank 法を用いた。統計学的有意差の評価は危険率 0.05 以下を有意差ありとした。

## 結 果

### 1) VEGF 蛋白

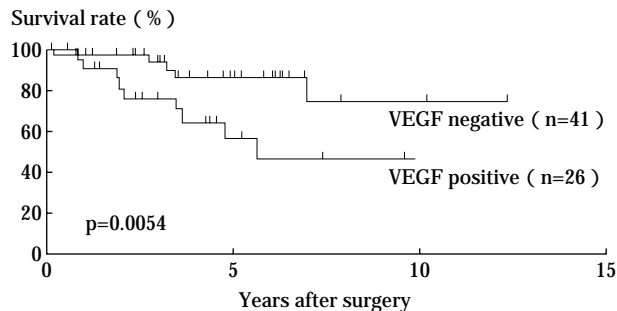
VEGF 蛋白の発現は 67 例中 26 例 (38.8%) が陽性であった。臨床病理因子との関連は、性別では男性 47 例中 14 例 (29.8%)、女性 20 例中 12 例 (60%) が陽性で女性に有意に陽性率が高かった ( $p=0.020$ )。組織型別の陽性率は腺癌 58.1%、扁平上皮癌 21.9%、大細胞癌 25.0% であ

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of 67 cases of NSCLC

Clinical Variable	VEGF		p value	
	positive	negative		
Age	< 64	12	20	p = 0.8339
	64	14	21	
Gender	Male	14	33	p = 0.0202
	Female	12	8	
Histology	Ad.	18	13	p = 0.0110
	Sq.	7	25	
	La.	1	3	
Differentiation	well	9	9	p = 0.4873
	mod.	10	17	
	poor	7	15	
T factor	T1	10	17	p = 0.8071
	T2	16	24	
p factor	p0	15	24	p = 0.8164
	p1	10	14	
	p2	1	3	

**Table 2.** Relationship between recurrence and immunoreactivity

	No. of Patients		p value	
	Without Recurrence	With Recurrence		
VEGF	negative	36	5	p = 0.0048
	positive	15	11	
p53	negative	23	8	p = 0.8115
	positive	20	6	

**Fig. 1.** Survival curve of stage I NSCLC patients in relation to VEGF expression

り腺癌において有意に陽性率が高かった( $p=0.011$ ). 分化度別では高分化型 50.0%, 中分化型 37.0%, 低分化型 31.8% で分化度別による有意差は認めなかった. T 因子別, p 因子別では VEGF 蛋白陽性率に有意差を認めなかった (Table 1).

再発は 16 例に認め, 遠隔転移 13 例, 局所再発 3 例であった. 再発との関連は VEGF 陽性例で再発が 11 例 (42.3%) に, 陰性例で 5 例 (12.2%) に認められ, VEGF 陽性例において有意に再発率が高かった( $p=0.0048$ ) (Table 2). 遠隔転移についても陽性例で 10 例 (38.5%), 陰性例で 4 例 (9.8%) であり, VEGF 陽性症例において有

意に多かった ( $p=0.016$ ).

予後との関連は, VEGF 陽性例での MST (Median survival time) は 52.2 カ月, 陰性例では 78.5 カ月で VEGF 陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であった ( $p=0.0054$ ) (Fig. 1). 組織型別に予後を検討すると腺癌では VEGF 蛋白陽性例の MST は 42.6 カ月, 陰性例では 78.9 カ月と陽性例で予後不良であったが, 有意差は認めなかった. 扁平上皮癌ではそれぞれ 37.6 カ月, 38.1 カ月であり有意差は認めなかった.

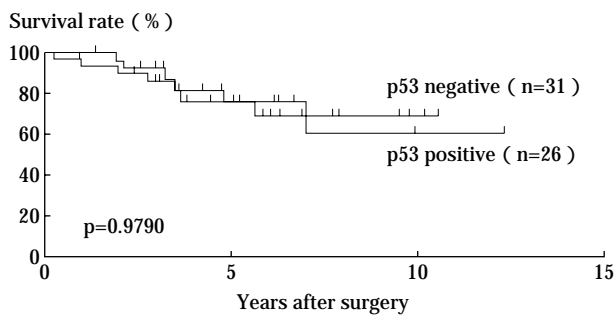
## 2) p53 蛋白

p53 蛋白の発現は 57 例中 26 例 (45.6%) が陽性であった. 組織型別では扁平上皮癌の陽性率は 58.6% で腺癌の 33.3% に対して高かったが有意差は認めなかった. 性別, 分化度別による陽性率に有意差は認めなかった. T 因子別, p 因子別でも有意差を認めなかった. p53 陽性例での MST は 72.2 カ月, 陰性例では 59.4 カ月で生存期間に有意差を認めなかった (Fig. 2). 組織型別による p53 蛋白の発現と生存期間には関連を認めなかった. 再発は p53 陽性例で 6 例 (23.1%), 陰性例で 8 例 (25.8%) であり有意差を認めなかった (Table 2.).

## 3) VEGF 蛋白と p53 蛋白の関連

VEGF 蛋白発現と p53 蛋白発現との関連は, p53 陰性例における VEGF 陽性率は 29.3%, p53 陽性例における

**Fig. 2.** Survival curve of stage I NSCLC patients in relation to p53 expression



**Table 3.** Relationship between expression of VEGF and p53

		VEGF		p value
		negative	positive	
p53	negative	22	9	p = 0.1820
	positive	14	12	

VEGF 陽性率は 46.2% であり, VEGF 蛋白と p53 蛋白の発現との間に有意な関連は認めなかった (Table 3). 組織型別に検討すると腺癌ではそれぞれ 43.8%, 87.5% であり有意な相関を認めた ( $p=0.040$ ) が, 扁平上皮癌ではそれぞれ 8.3%, 29.4% であり関連は認めなかった. VEGF 蛋白と p53 蛋白の発現を組み合わせると生存率を検討すると, VEGF 陰性/p53 陰性例での MST は 40.1 カ月, VEGF 陰性/p53 陽性 54.3 カ月, VEGF 陽性/p53 陰性 77.3 カ月, VEGF 陽性/p53 陽性 37.3 カ月であり, VEGF 陽性/p53 陽性例が最も予後不良であったが, 他の群との間に有意差を認めなかった (Fig. 3).

他の臨床病理因子を合わせた多変量解析では, 年齢 (64 歳以上), p 因子 ( $p_2$ ), VEGF において有意差が認められた (Table 4).

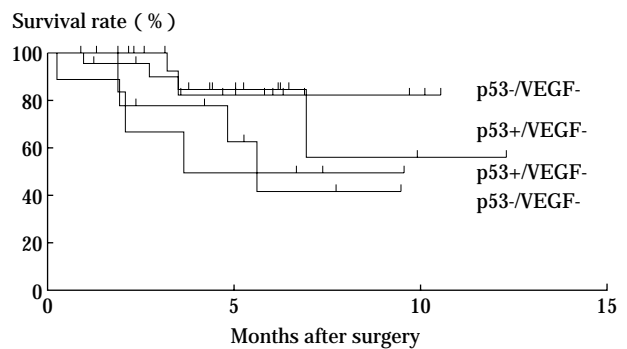
**考 察**

本研究では I 期非小細胞肺癌における VEGF 蛋白, p53 蛋白の発現の有無を検討し両蛋白の発現が予後因子になり得るかどうかを解明することを目的とした.

VEGF 蛋白に関しては, 陽性例では再発, 特に遠隔転移が有意に多かった. さらに VEGF 蛋白陽性例では陰性例に比べ有意に生存率が低く予後不良であった. しかし組織型別に検討すると VEGF 蛋白の発現と予後との関連は認めなかった.

腫瘍における血管新生を促進させる因子として VEGF が報告されて以来, VEGF 蛋白の発現と各固形腫瘍の予後との相関性が報告された. Toi ら<sup>2)</sup>は乳癌において VEGF 高発現群では再発頻度が高いと報告し, Gasparini

**Fig. 3.** Survival curve of stage I NSCLC in relation to VEGF and p53 expression



**Table 4.** Multivariate Analysis

Variable	coefficient	S.E.	Hazard ratio	p-value
VEGF	2.377	0.771	10.774	0.0020
p53	- 0.738	0.705	0.478	0.2948
Age ( 64 )	1.899	0.710	6.681	0.0075
p2	2.841	1.146	17.126	0.0131
poor differentiation	1.445	1.195	4.243	0.2267

ら<sup>3)</sup>はリンパ節転移のない乳癌症例における VEGF と予後との相関を報告した. 肺癌においては Fontanini ら<sup>4)</sup>, Mattern ら<sup>5)</sup>が VEGF 蛋白発現と予後との相関を報告している. これらの報告と同様に, I 期非小細胞肺癌においても VEGF 蛋白の発現と再発, 予後との関連が認められた.

次に p53 蛋白に関しては陽性, 陰性群間の生存率に有意差はみられず, 再発との関連も認めなかった. 非小細胞肺癌における p53 蛋白の発現と予後との関連についてはこれまでにいくつかの報告があるが<sup>6),7),8)</sup>一致した見解はない. Nishino ら<sup>9)</sup>は非小細胞肺癌について, p53 蛋白陽性, 陰性例間に生存率に差がないが, 腺癌に限ると p53 蛋白陰性例の生存率が有意に高いことを指摘した. 藤田ら<sup>10)</sup>は非小細胞肺癌 I, II 期では p53 蛋白陽性, 陰性群間の生存率に有意差を認めなかったと報告した. また扁平上皮癌では p53 は予後とは無関係であるが, 腺癌では進行癌に p53 蛋白発現が多いとする報告もある<sup>11)</sup>. 本研究では I 期非小細胞肺癌においては p53 蛋白の発現の有無は予後を反映しないことが示唆された.

p53 遺伝子が腫瘍の血管新生に関与することが報告され<sup>12)</sup>, p53 蛋白と VEGF 蛋白の関連が検討されるようになった. wild type- p53 は VEGF のプロモーター活性を抑えることで VEGF mRNA レベルを下げる<sup>13)</sup>と報告された. Kang ら<sup>14)</sup>は大腸癌において p53, VEGF 両者が陽性の腫瘍では肝転移が多く予後も不良であると示し, Fontanini ら<sup>4)</sup>は肺癌で p53, VEGF 両蛋白の発現が相関すると報告した. 本研究では VEGF 陽性率が p53 陰性例に比べ p53 陽性例において高かったが有意差を認めなかった. 組織

型別では腺癌では両蛋白の発現に相関が認められた。この結果から I 期の肺腺癌においては p53 蛋白の発現が VEGF 蛋白の発現を促すことに関係すると考えられた。

今回の検討では病理病期 I 期の非小細胞肺癌において VEGF 蛋白の発現と予後に関連がみられた。病期 I 期の肺癌に対しては通常、補助療法は行われていない。しかし生存率を改善するためには予後不良例に対する補助療法も考慮されなければならない。VEGF 蛋白の発現の有無は術後補助療法が必要な患者集団を抽出することができる可能性につながると考えられた。

## 結 論

67 例の I 期非小細胞肺癌切除例で免疫組織学的に VEGF, p53 蛋白の発現を調べ、以下の結論を得た。

- (1) VEGF 蛋白陽性例では再発が多かった。
- (2) VEGF 蛋白陽性例では陰性例に比べ予後不良であった。
- (3) p53 蛋白の発現は再発、予後に関連しないと考えられた。今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。
- (4) I 期非小細胞肺癌において VEGF 蛋白の発現は予後因子になり得ると思われた。

## 参考文献

- 1) van Meir E, Polverini P, Chazin V : Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction to wild-type p53 expression in glioblastoma cells. *Nature* 8 : 171 176, 1994.
- 2) Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, et al : Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 32A : 2513 2519, 1996.
- 3) Gasparini G, Toi M, Gion M, et al : Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 89 : 139 147, 1997.
- 4) Fontanini G, Vignati S, Lucchi M, et al : Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer : Their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer* 75 : 1295 1301, 1997.
- 5) Mattern M, Koomagi R, Volm M, et al : Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 73 : 931 934, 1996.
- 6) Fontanini G, Vignati S, Bigini D, et al : bcl-2 protein : a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 71 : 1003 1007, 1995.
- 7) McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, et al : The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 66 : 735 738, 1992.
- 8) Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, et al : Expression of p53 oncoprotein in non-small cell lung cancer : a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol* 13 : 1893 1903, 1995.
- 9) Nishino M, Koshikawa T, Kuroishi T, et al : Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 14 : 497 502, 1996.
- 10) 藤田結花, 大崎能伸, 豊嶋恵理, 他 : 非小細胞肺癌における bcl 蛋白および p53 蛋白の発現の検討. *肺癌* 37 : 347 356, 1997.
- 11) Volm M, Efferth T, Mattern J : Oncoprotein( c-myc, c-erbB 1, c-erbB2, c-fos ) and suppressor gene product ( p53 ) expression in squamous cell carcinoma of the lung. Clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 12 : 11 20, 1992.
- 12) Dameron K, Volpert O, Tainsky M : Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265 : 1582 1584, 1994.
- 13) Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme V : Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 55 : 6161 6165, 1995.
- 14) Kang SM, Maeda K, Onoda N : Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer* 74 : 502 507, 1997.

(原稿受付 1999年5月25日/採択 1999年11月1日)

**Comparison of VEGF and p53 Protein Expression  
in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer**

*Makoto Odaka, Syuji Sato, Masataka Masubuchi, Hideyuki Suzuki, Jun Hirano,  
Jun Asakura, Makoto Yamashita, Isao Miyoshi, Tadashi Akiba, Yoji Yamazaki*

Department of Surgery, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

Object : The association between expression of VEGF or p53 protein and the outcome was assessed in 67 patients with completely resected primary stage I non-small cell lung cancer. Result : VEGF protein was expressed in 39% ( 26/67 ) and the p53 protein was found in 46% ( 26/57 ). The VEGF protein-positive rate was significantly higher in adenocarcinoma (  $p=0.011$  ) but the expression rate did not vary significantly depending on tumor differentiation, T factor, or p factor. The recurrence rate was significantly higher in patients with VEGF-positive cancer and the incidence of distant metastasis was markedly increased (  $p=0.016$  ) Regarding the association between the expression of these proteins and the outcome, the median survival time of VEGF-positive patients was 52.2 months and that of VEGF-negative patients was 78.5 months, with the outcome of VEGF-positive patients being significantly poorer (  $p=0.0054$  ). Neither recurrence nor survival rate was associated with the expression of p53 protein. Although the VEGF-positive rate was higher in p53-positive patients than in p53-negative patients, there was no correlation between these two proteins. Conclusion : In patients with stage I non-small cell lung cancer, expression of VEGF protein seems to be of prognostic value.

[ JJLC 40 : 11 ~ 15, 2000 ]

---