

肺癌におけるチミジル酸合成酵素の発現とその臨床的意義

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9451 |

肺癌におけるチミジル酸合成酵素の発現とその臨床的意義

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡邊洋宇教授)

足 立 巖

チミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) は、還元的メチル化によってデオキシウリジン一リン酸からデオキシチミジン一リン酸を生成する酵素であるとともに5-フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU) の標的酵素でもある。近年5-FUの抗腫瘍効果発現にはアポトーシスが関与していることが明らかにされた。bcl-2は、アポトーシスを抑制する癌遺伝子である。またp53は細胞周期制御因子の一つであるとともにアポトーシスを誘導する働きも有している。本研究では非小細胞肺癌症例84例を対象としてTSおよびbcl-2蛋白、p53の免疫組織学的染色を施行し、各蛋白の発現と臨床病理学的因子との関連および予後との関連について検討した。TS蛋白発現陽性率は、非小細胞肺癌全体で39.3%、腺癌で32.6%、扁平上皮癌で47.4%であった。また、TS値およびTS陽性率と臨床病理学的因子との間には有意な相関を認めなかった。TS値と予後との関連をみると、扁平上皮癌症例において病期Ⅲ症例の予後は、TS陽性例で陰性例と比較して有意に不良であった ($p < 0.05$)。bcl-2蛋白発現陽性率は非小細胞肺癌全体で27.4%、腺癌で21.7%、扁平上皮癌で34.2%であった。なお、各臨床病理学的因子とbcl-2蛋白発現率との間には関連を認めなかった。P53過剰発現率は非小細胞肺癌全体で61.9%、腺癌で52.2%、扁平上皮癌で73.7%であり扁平上皮癌で有意に高率であった ($p < 0.05$)。各臨床病理学的因子とp53過剰発現率との間にも関連を認めなかった。TS値とp53発現量との間には、非小細胞肺癌全体で有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。また腺癌と扁平上皮癌に分けて検討しても同様であった。多変量解析では、非小細胞肺癌全体でbcl-2蛋白発現陰性、p53過剰発現、T2以上が、腺癌症例ではp53過剰発現が、扁平上皮癌症例ではbcl-2蛋白発現陰性、T2以上、N1以上が有意な予後不良因子と判定された。以上の結果より、非小細胞肺癌組織を用いた免疫染色によるTS発現の評価が可能であることが判明した。また非小細胞肺癌組織におけるTSと変異型p53の相互発現調節機構の存在が示唆された。

Key words non-small cell lung cancer, thymidylate synthase, bcl-2, p53, immunohistochemical staining

肺癌は、他の多くの固形癌で治療成績の向上をみる中、依然極めて不良な予後を示しており、臓器別悪性腫瘍の死因でも第一位となった¹⁾。生体から物理的に除去可能な程度の腫瘍細胞数と分布範囲内で、ある時期に病巣が発見されれば、手術によって治癒に導くことができる。しかし、肺癌に対する手術術式の改良、とりわけリンパ節郭清範囲拡大の予後改善効果に関してはその限界が明らかにされつつある。胃癌や大腸癌、子宮癌などと比較して、肺癌を早期に発見する手段の開発が遅かに遅れていることは否めない。その結果、肺癌と診断された症例の過半数が何らかの非治癒因子を有しており、化学療法や放射線治療の対象とされる。しかし、肺癌の大部分を占める非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer) に対し明確な延命効果を示す化学療法は未だに確立されていない。この現実立脚し、現在も非小細胞肺癌を標的とした新規抗癌剤開発に莫大な人力と費用がかけられている。一方、既存の抗癌剤の抗腫瘍効果をより確実に発揮させるための試みも盛んになされている²⁾³⁾。Dohdenら⁴⁾は、細胞内の還元型葉酸濃度が5-フルオロウラシル

(5-fluorouracil, 5-FU) の抗腫瘍効果に静的、動的に大きな影響を及ぼすことを報告した。またOmuraら⁵⁾は、ラットを用いた実験でシスプラチン投与により腫瘍組織内の還元型葉酸が速やかに上昇することを報告している。我が国では、この理論に基づいた少量反復シスプラチンと5-FUの併用療法が普及し、胃癌や結腸癌・直腸癌に高い奏効率が報告されている⁶⁾。また葉酸そのものであるフォリン酸カルシウム (forinate calcium, leucovorin, LV) は、欧米で広く5-FUと併用され、その有用性が認められている⁷⁾。5-FUは、5-フルオロデオキシウリジン一リン酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) に代謝された後、還元型葉酸とともにチミジル酸合成酵素 (thymidylate synthase, TS) に結合し、強固な不活性三者結合体 (ternary complex) を形成することによって抗腫瘍効果を発揮する⁸⁾。したがって、腫瘍細胞内の還元型葉酸濃度を上昇させる薬剤を使用した場合、5-FUの抗腫瘍効果は腫瘍内のTS発現量に依存すると考えられる。以前よりTSの測定にはその基質結合部位数を測定する結合アッセイ法が用いられてきた⁹⁾。5-FU

平成11年9月22日受付, 平成11年11月5日受理

Abbreviations : DAB, 3, 3'-diaminobenzidine; FdUMP, 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate; 5-FU, 5-fluorouracil; LV, leucovorin; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; p16/INK4 cyclin-dependent kinase-4 inhibitor; TS, thymidylate synthase

によるTS阻害の作用部位を直接定量するこの方法は、信頼性が広く認められている反面、多量の検体を必要とする欠点を有する。切除不可能である進行癌症例から十分量の腫瘍組織を得ることは容易ではない。また仮にかかる重量の検体採取が可能な部位に発生した癌腫であっても、くり返す検体採取が患者に与える負担は極めて大きい。教室の宇野¹⁰⁾は、胃癌および大腸癌を用いた検討で、抗TSポリクローナル抗体を用いた免疫染色によって判定したTS値が、結合アッセイ法を用いて定量したTS値と高い相関を示すことを明らかにした。さらに近年、5-FUの抗腫瘍効果発現にアポトーシスが関与していることが明らかになった¹¹⁾。bcl-2はアポトーシスを抑制する癌遺伝子である。またp53は細胞周期制御因子の一つであるとともにアポトーシスを誘導する働きも有している¹²⁾。本研究では、非小細胞肺癌にTS蛋白、bcl-2蛋白およびp53の免疫組織学的染色を施し、各蛋白発現の定量化を試みた。さらに、それらの蛋白発現と臨床病理学的因子や予後との関連、および各蛋白発現間の相関について検討した。

対象および方法

I. 対象

1988年から1991年までの4年間に、金沢大学附属病院第一外科において切除された84例の非小細胞肺癌症例を対象とした(表1)。平均年齢は66.2±9.0歳(平均±標準偏差)、男性60例、女性24例であり、組織型は腺癌46例、類上皮癌38例であった。病期分類を肺癌取り扱い規約¹³⁾に従って行ったところ、I期22例、II期19例、III A期20例、III B期19例、IV期4例であった。

II. 免疫組織化学染色

各症例のバラフィン包埋ブロックを4 μm厚に薄切し、シランコーティングスライド(武藤化学, 東京)に付着させ切片を作製し免疫染色を行った。

1. ポリクローナルおよびモノクローナル抗体

免疫組織化学染色には、抗TSポリクローナル抗体(大鵬薬品工業, 東京 より供与)、抗Bcl-2モノクローナル抗体(Clone 124)(ダコジャパン)、抗p53モノクローナル抗体(DO-7)(ダコジャパン)を用いた

2. 抗TSポリクローナル抗体を用いた免疫染色

切片を100%キシレンで10分間、3回の脱バラフィンを施行した後、100%、100%、100%、90%、70%のエタノールにて各3分間親水し、流水水洗した次に0.01Mクエン酸緩衝液(0.1Mクエン酸2.1gを蒸留水1000mlに溶かし、2Nの水酸化ナトリウムにてpH6.0に調整)に入れ、500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行い抗原の賦活化を行った。次に、0.3%過酸化水素水(H₂O₂)添加液中で20分間反応させPBS(pH 7.4)で洗浄し内因性ペルオキシダーゼを失活させた。続いて10%正常ウシ血清で10分間室温で静置し2次抗体の非特異的結合を阻止した後、1次抗体として抗TSポリクローナル抗体をPBSにて1000倍希釈したものをを用いて室温で1時間反応させた。2次抗体としてビオチン標識抗マウス抗ウサギ・ヤギ抗体(DAKO, Glostrup, Denmark)を20分間反応させた後PBSにて洗浄した。次にストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(DAKO)に30分間反応させた後0.04%ジアミノベンチジン(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)(和光, 東京)にて発色さ

Table 1. Clinical and pathological characteristics of patients

| Characteristics | No. of patients (%) | | |
|-----------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| | Total (n=84) | Adenocarcinoma (n=46) | Squamous cell ca (n=38) |
| Age | 66.2±9.0 | 64.7±9.9 | 67.9±7.5 |
| Sex | | | |
| Male | 60 (71.4) | 25 (54.3) | 35 (92.1) * |
| Female | 24 (28.6) | 21 (45.7) | 3 (7.9) |
| Stage | | | |
| I | 22 (26.2) | 13 (28.3) | 9 (23.7) |
| II | 19 (22.6) | 9 (19.6) | 10 (26.3) |
| III A | 20 (23.8) | 11 (23.9) | 9 (23.7) |
| III B | 19 (22.6) | 11 (23.9) | 8 (21.0) |
| IV | 4 (4.8) | 2 (4.3) | 2 (5.3) |
| T factor | | | |
| T1 | 26 (31.0) | 18 (39.1) | 8 (21.0) * |
| T2 | 23 (39.3) | 15 (32.6) | 18 (47.5) |
| T3 | 9 (10.7) | 5 (10.9) | 4 (10.5) |
| T4 | 16 (19.0) | 8 (17.4) | 8 (21.0) |
| N factor | | | |
| N0 | 32 (38.1) | 18 (39.1) | 14 (36.9) |
| N1 | 20 (23.8) | 9 (19.6) | 11 (28.9) |
| N2 | 25 (29.8) | 14 (30.4) | 11 (28.9) |
| N3 | 7 (8.3) | 5 (10.9) | 2 (5.3) |
| M factor | | | |
| M0 | 82 (97.6) | 45 (97.8) | 37 (97.4) |
| M1 | 2 (2.4) | 1 (2.2) | 1 (2.6) |

*p<0.05

せた。核染色をヘマトキシリンで行った後、流水水洗にて10分間色出しを行った。90%、100%、100%、100%のエタノールにて各3分間脱水を行った後、100%キシレンにより、3回の透徹を行い、マリノール（武藤化学）にて封入し検鏡した。陰性コントロールとしては、非免疫マウス血清を用いて、陽性像が得られないことを確認した。

3. 抗bcl-2モノクローナル抗体を用いた免疫染色

切片を100%キシレンで10分間、3回の脱パラフィンを施行した後、100%、100%、100%、90%、70%のエタノールにて各3分間親水し、流水水洗した次に0.01Mクエン酸緩衝液に入れ、500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行い抗原の賦活化を行った。次に、0.3%過酸化水素水（ H_2O_2 ）添加液中で20分間反応させPBSで洗浄し内因性ペルオキシダーゼを失活させた。続いて10%正常ウシ血清で10分間室温で静置し2次抗体の非特異的結合を阻止した後、1次抗体として抗Bcl-2モノクローナル抗体をPBSにて100倍に希釈し、室温で1時間反応させた。2次抗体としてビオチン標識抗マウス抗ウサギ・ヤギ抗体を20分間反応させた後PBSにて洗浄した。次にストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体に30分間反応させた後0.04% DABにて発色させた。核染色をマイヤー・ヘマトキシリンで行った後、流水水洗にて10分間色出しを行った。90%、100%、100%、100%のエタノールにて各3分間脱水を行った後、100%キシレンにより3回の透徹を行い、マリノールにて封入し検鏡した。陰性コントロールとしては、非免疫マウス血清を用いて陽性像が得られないことを確認した。

4. 抗p53モノクローナル抗体による免疫染色

切片を100%キシレンで10分間、3回の脱パラフィンを施行した後、100%、100%、100%、90%、70%のエタノールにて各3分間親水し、流水水洗した次に0.01Mクエン酸緩衝液に入れ、500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行い抗原の賦活化を行った。次に、0.3%過酸化水素水（ H_2O_2 ）添加液中で20分間反応させ、PBSで洗浄し内因性ペルオキシダーゼを失活させた。続いて10%正常ウシ血清で10分間室温で静置し2次抗体の非特異的結合を阻止した後、1次抗体として抗p53モノクローナル抗体をPBSにて100倍に希釈して用いて室温で1時間反応させた。2次抗体としてビオチン標識抗マウス抗ウサギ・ヤギ抗体を20分間反応させた後PBSにて洗浄した。次にストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体に30分間反応させた後0.04% DABにて発色させた。核染色をマイヤー・ヘマトキシリンで行った後、流水水洗にて10分間色出しを行った。90%、100%、100%、100%のエタノールにて各3分間脱水を行った後、100%キシレンにより、3回の透徹を行い、マリノールにて封入し検鏡した。陰性コントロールとしては、非免疫マウス血清を用いて陽性像が得られないことを確認した。

Ⅲ. 免疫染色の評価

免疫染色の評価は透過光顕微鏡画像解析装置CAS200イメージ分析装置（Cell Analysis System, Elmhurst, USA）を用いて免疫組織染色強度を定量的に測定した。マイヤー・ヘマトキシリンによる核染色のODは620nmの波長で測光し、DABのODは500nmの波長で測光した。

1. TSの染色強度の測定

TSの染色強度の測定にはER/PR定量分析法を用い、全核面積に対するDABで発色した核の面積比（陽性面積比、% positive

area）の測定を行った。測定は腫瘍の任意の視野を選択し、10～15視野で行った。この結果得られた陽性面積比を平均し染色率とした。また、全症例の染色率の平均値を求め、平均値以上を陽性例、平均値未満を陰性例とした。

2. bcl-2の染色強度の測定

bcl-2の染色強度の測定には細胞計測プログラムを用い、細胞質の平均吸光度を測定した。陰性標準標本の平均吸光度測定は5標本から任意に選択した10～15視野で行った。染色標本の平均吸光度測定は腫瘍のリンパ球浸潤の少ない部分を任意に選択し、10～15視野で行った。染色標本の吸光度より陰性標準標本の吸光度を引いて得られた値の平均値を求め、平均値以上を陽性、平均値未満を陰性と判定した。

3. p53の染色強度の測定

p53の染色強度の測定にはER/PR定量分析法を用い、全核面積に対するDABで発色した核の面積比（陽性面積比、% positive area）の測定を行った。測定は腫瘍の任意の視野を選択し、10～15視野で行った。この結果得られた陽性面積比を平均し、染色率とした。また全症例の染色率の平均値を求め、平均値以上を陽性例、平均値未満を陰性例とした。

Ⅳ. 臨床病理学的因子

肺癌の記載は肺癌取扱い規約に従った。臨床病理学的因子として性別、組織型、臨床病期、リンパ節転移度、p53値およびbcl-2値を選択し、各因子についてTSの染色強度を比較検討した。

Ⅴ. 統計学的検討

得られた値はすべて平均値±標準偏差で示した。統計学的検討には、 χ^2 検定、対応のないt検定、ScheffeのF検定を用いた。また関連の有意性の検定はPearsonの相関係数を求め行った。生存率はKaplan-Meier法にて算出し、その有意差検定はlog-rank法にて行った。また生存率の関与度についての変量解析にはCox比例ハザードモデルを用いた。いずれも危険率5%未満の場合（ $p<0.05$ ）を統計学的に有意差ありとした。

成 績

I. TS蛋白発現陽性率と臨床病理学的因子との相関

1. 肺癌細胞におけるTS蛋白の発現率

腺癌細胞、および扁平上皮癌細胞の細胞質にTSが染色され、その染色性は比較的均一なものから不均一なものまで様々であった（図1、2）。CAS200イメージ分析装置によって定量化した癌組織のTS染色陽性面積比（以下、TS値）は、非小細胞肺癌全体で0.088から0.218、平均0.143±0.029であった。また腺癌および扁平上皮癌では各々0.140±0.030、0.146±0.028であり、両者の間に有意差を認めなかった。以上の結果より、癌組織についてはTS値が全症例の平均値である0.143以上であるものをTS蛋白発現陽性、0.143未満を陰性と判定した。この基準で判定したTS蛋白発現陽性例は、非小細胞肺癌で39.3%（84例中33例）腺癌で32.6%（46例中15例）、扁平上皮癌で47.4%（38例中18例）であった。なお、正常肺組織におけるTS値は0.140±0.027であり、正常組織と癌組織のTS値との間には差を認めなかった。

2. 臨床病理学的因子との相関

臨床病期別のTS値は、非小細胞肺癌症例全体ではI期が0.141±0.025、II期が0.151±0.029、III A期が0.139±0.029、III B期が0.140±0.027、IV期が0.128±0.010であった。またI

期, II期, III A期, III B期, IV期症例のTS蛋白陽性率は, 各々31.8%, 61.1%, 36.8%, 47.1%, 0%であり, TS値, TS蛋白陽性率ともに各病期間に有意差はなかった. なお年齢, 性別, 組織型, T因子, N因子, M因子についても同様であった(表2). 腺癌のTS値はI期がTS値 0.137 ± 0.027 , II期が 0.150 ± 0.030 , III A期が 0.129 ± 0.027 , III B期が 0.146 ± 0.036 , IV期が 0.130 ± 0.015 であった. またI期, II期, III A期, III B期, IV期症例のTS蛋白陽性率は, 各々23.1%, 44.4%, 27.3%, 45.5%, 0%であり, TS値, TS蛋白陽性率ともに各病期間に有意差はなかった. なお年齢, 性別, 組織型, T因子, N因子, M因子についても同様であった. 扁平上皮癌のTS値は, I期が 0.148 ± 0.020 , II期が 0.146 ± 0.033 , III A期が

0.149 ± 0.028 , III B期が 0.149 ± 0.034 , IV期が 0.126 ± 0.007 であった. またI期, II期, III A期, III B期, IV期症例のTS蛋白陽性率は, 各々44.4%, 55.6%, 44.4%, 62.5%, 0%であった. 扁平上皮癌でも腺癌と同様に, 病期, 年齢, 性別, 組織型, T因子, N因子, M因子によるTS値, TS蛋白陽性率の差を認めなかった.

3. 臨床病期別にみたTS値と生存期間との相関

臨床病期別にTS値と予後との関連をみると, 病期I, 病期II症例ではTS蛋白陽性例と陰性例の間には予後に差を認めなかった. 一方, 病期III AとIII B症例を合わせて検討すると, 扁平上皮癌症例において, TS蛋白陽性例は陰性例と比較して有意に予後不良であった($p < 0.05$) (図3).

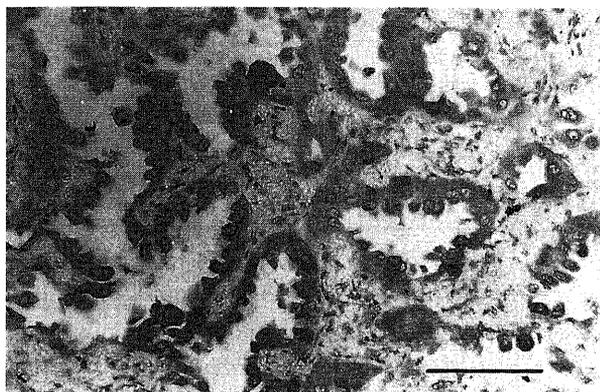


Fig. 1. Immunohistochemical staining of TS in adenocarcinoma. TS immunoreactivity is observed strongly in the cytoplasm. Bar indicates 100 μ m.

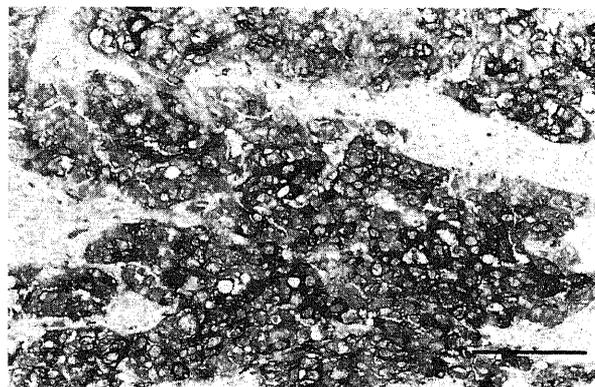


Fig. 2. Immunohistochemical staining of TS in squamous cell carcinoma. TS immunoreactivity is seen strongly in the cytoplasm. Bar indicates 100 μ m.

Table 2. Clinical and pathological characteristics of patients and expression of TS

| Characteristics | No. of patients | TS Score (mean \pm SD) | |
|-----------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Adenocarcinoma | Squamous cell carcinoma |
| Sex | | | |
| Male | 60 | 0.145 ± 0.028 | 0.147 ± 0.029 |
| Female | 24 | 0.145 ± 0.032 | 0.140 ± 0.019 |
| Stage | | | |
| I | 22 | 0.137 ± 0.027 | 0.148 ± 0.020 |
| II | 19 | 0.150 ± 0.030 | 0.146 ± 0.033 |
| III A | 20 | 0.129 ± 0.027 | 0.149 ± 0.028 |
| III B | 19 | 0.146 ± 0.036 | 0.148 ± 0.034 |
| IV | 4 | 0.130 ± 0.015 | 0.126 ± 0.007 |
| T factor | | | |
| T1 | 26 | 0.133 ± 0.025 | 0.138 ± 0.030 |
| T2 | 33 | 0.145 ± 0.029 | 0.145 ± 0.026 |
| T3 | 9 | 0.127 ± 0.023 | 0.156 ± 0.034 |
| T4 | 16 | 0.152 ± 0.041 | 0.153 ± 0.029 |
| N factor | | | |
| N0 | 32 | 0.139 ± 0.027 | 0.144 ± 0.026 |
| N1 | 20 | 0.153 ± 0.035 | 0.151 ± 0.036 |
| N2 | 25 | 0.136 ± 0.033 | 0.149 ± 0.020 |
| N3 | 7 | 0.126 ± 0.017 | 0.125 ± 0.038 |
| M factor | | | |
| M0 | 82 | 0.139 ± 0.030 | 0.147 ± 0.028 |
| M1 | 2 | 0.141 | 0.020 |
| Total | 84 | 0.140 ± 0.030 | 0.146 ± 0.028 |

II. bcl-2 蛋白発現陽性率と臨床病理学的因子との相関

bcl-2 蛋白発現陰性標準標本の吸光度測定により得られた平均 OD 値は 0.140 ± 0.042 ($n=30$) であった。以上の結果より OD 値 0.140 以上を bcl-2 蛋白発現陽性、0.140 未満を bcl-2 蛋白発現陰性と判定した。この基準で判定した bcl-2 蛋白発現陽性率は非小細胞肺癌で 27.4% (84 例中 23 例)、腺癌で 21.7% (46 例中 10 例)、扁平上皮癌で 34.2% (38 例中 13 例) であった。臨床病期別の bcl-2 蛋白発現陽性率は、非小細胞肺癌全体では、I 期

が 27.3%、II 期が 42.1%、III A 期が 25.0%、III B 期が 15.8%、IV 期が 25% であり、病期の進行と bcl-2 蛋白発現陽性率との間には一定の傾向を認めなかった。なお年齢、性別、組織型、T 因子、N 因子、M 因子についても同様であった (表 3)。腺癌の bcl-2 蛋白発現陽性率は I 期が 23.1%、II 期が 11.1%、III A 期が 27.3%、III B 期が 18.2%、IV 期が 50% であり、病期の進行と bcl-2 蛋白発現陽性率との間には一定の傾向を認めなかった。年齢、性別、組織型、T 因子、N 因子、M 因子についても同様

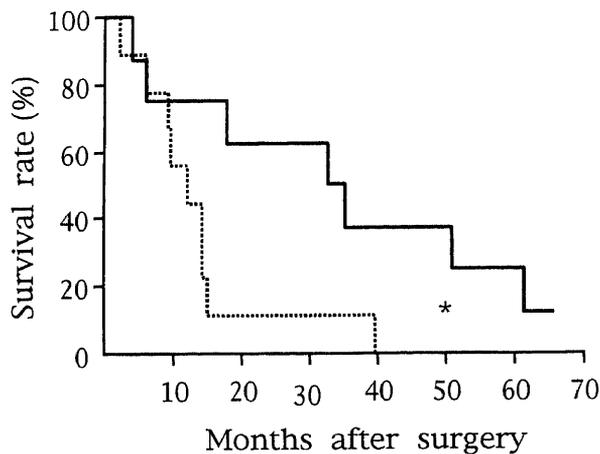


Fig. 3. Survival curves of patients with squamous cell carcinoma in stage III after curative resection. —, TS positive cases; - - -, TS negative cases. * $p < 0.05$, by log-rank test.

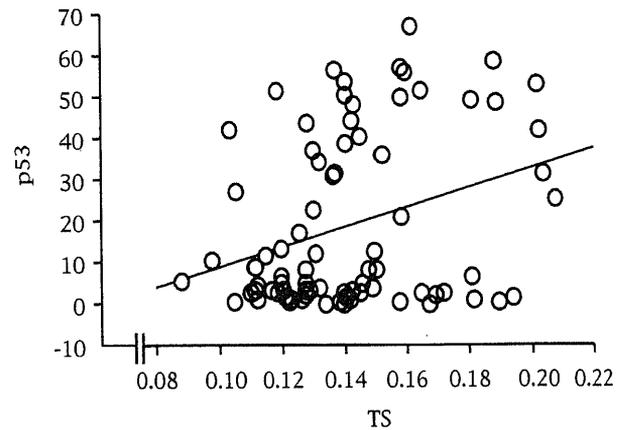


Fig. 4. Relationship between TS and p53. The liner regression line formed from the data points is shown in TS versus p53 ($r=0.39$, $p < 0.001$).

Table 3. Clinical and pathological characteristics of patients and expression and expression of Bcl-2

| Characteristics | No. of patients | Ratio of Bcl-2 protein positive cases (%) | |
|-----------------|-----------------|---|-------------------------|
| | | Adenocarcinoma | Squamous cell carcinoma |
| Sex | | | |
| Male | 60 | 4/25 (16.0) | 11/35 (31.4) |
| Female | 24 | 6/21 (28.5) | 2/3 (66.7) * |
| Stage | | | |
| I | 22 | 3/13 (23.7) | 3/9 (33.3) |
| II | 19 | 1/9 (11.1) | 7/10 (70.0) * |
| III A | 20 | 3/11 (27.3) | 2/9 (22.2) |
| III B | 19 | 2/11 (18.2) | 1/8 (12.5) |
| IV | 4 | 1/2 (50.0) | 0/2 (0) |
| T factor | | | |
| T1 | 26 | 3/18 (16.7) | 3/8 (37.5) |
| T2 | 33 | 3/15 (20.0) | 9/18 (50.0) |
| T3 | 9 | 1/5 (20.0) | 0/4 (0) |
| T4 | 16 | 3/8 (37.5) | 1/8 (12.5) |
| N factor | | | |
| N0 | 32 | 5/18 (27.8) | 3/14 (21.4) |
| N1 | 20 | 1/9 (11.1) | 7/11 (63.6) * |
| N2 | 25 | 4/14 (28.6) | 3/11 (27.3) |
| N3 | 7 | 0/5 (0) | 0/2 (0) |
| M factor | | | |
| M0 | 82 | 10/45 (22.2) | 13/37 (35.1) |
| M1 | 2 | 0/1 (0) | 0/1 (0) |
| Total | 84 | 10/46 (21.7) | 13/38 (34.2) |

* $P < 0.05$

であった。また扁平上皮癌の bcl-2 蛋白発現陽性率は、I 期が 33.3%，II 期が 70.0%，III A 期が 22.2%，III B 期が 12.5%，IV 期が 0% であり腺癌と同様に病期の進行と bcl-2 蛋白発現陽性率との間には一定の傾向を認めなかった。なお年齢、性別、組織型、T 因子、N 因子、M 因子についても同様であった。

III. p53 蛋白発現陽性率と臨床病理学的因子との相関
p53 発現陰性標準標本の吸光度測定により得られた平均陽性

面積比は 3.62 ± 0.44 (n=30) であった。この結果から、陽性面積比 3.62 以上を p53 過剰発現、3.62 未満を p53 正常発現と判定した。この基準で判定した p53 過剰発現率は非小細胞肺癌で 61.9% (84 例中 52 例)、腺癌で 52.2% (46 例中 24 例)、扁平上皮癌で 73.7% (38 例中 28 例) であった。臨床病期別の p53 過剰発現率は、非小細胞肺癌全体で I 期が 50%、II 期が 72.2%、III A 期が 57.9%、III B 期が 70.6%、IV 期が 75% であり病期の進

Table 4. Clinical and pathological characteristics of patients and expression of p53

| Characteristics | No. of patients | Ratio of p53 positive cases (%) | |
|-----------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------|
| | | Adenocarcinoma | Squamous cell carcinoma |
| Sex | | | |
| Male | 60 | 16/25 (64.0) | 27/35 (77.1) |
| Female | 24 | 8/21 (38.1) | 1/3 (33.3) |
| Stage | | | |
| I | 22 | 6/13 (46.2) | 5/9 (55.6) |
| II | 19 | 5/9 (55.6) | 9/10 (90.0) * |
| III A | 20 | 7/11 (63.6) | 5/9 (55.6) |
| III B | 19 | 5/11 (45.5) | 7/8 (87.5) * |
| IV | 4 | 1/2 (50.0) | 2/2 (100) |
| T factor | | | |
| T1 | 26 | 10/18 (55.6) | 6/8 (75.0) |
| T2 | 33 | 8/15 (53.3) | 14/18 (77.8) |
| T3 | 9 | 2/5 (40.0) | 1/4 (25.0) |
| T4 | 16 | 4/8 (50.0) | 7/8 (87.5) |
| N factor | | | |
| N0 | 32 | 9/18 (50.0) | 8/14 (57.1) |
| N1 | 20 | 4/9 (44.4) | 10/11 (90.9) * |
| N2 | 25 | 8/14 (57.1) | 8/11 (72.7) |
| N3 | 7 | 3/5 (60.0) | 2/2 (100) |
| M factor | | | |
| M0 | 82 | 24/45 (53.3) | 27/37 (73.0) * |
| M1 | 2 | 0/1 (0) | 1/1 (100) |
| Total | 84 | 24/46 (52.2) | 28/38 (73.7) * |

*P<0.05

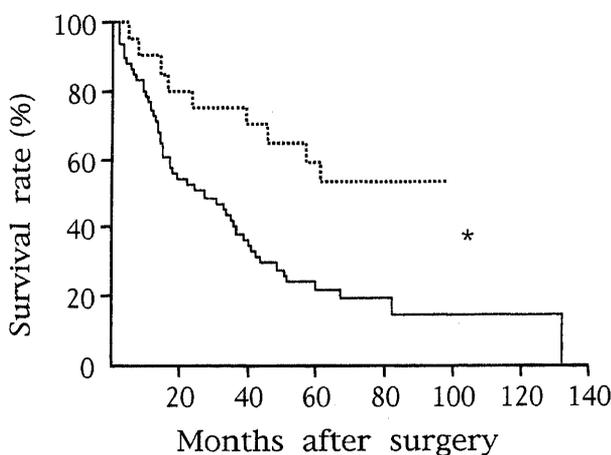


Fig. 5. Survival curves of patients with all cases after curative resection. —, bcl-2 positive cases; - - -, bcl-2 negative cases. *p<0.05, by log-rank test.

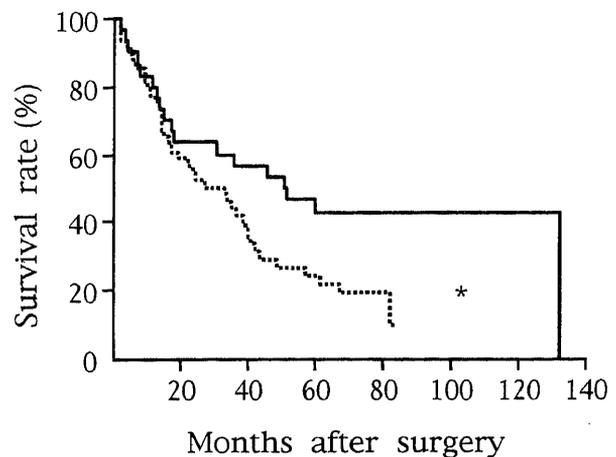


Fig. 6. Survival curves of patients with all cases after curative resection. —, p53 positive cases; - - -, p53 negative cases. *p<0.05, by log-rank test.

Table 5. Survival rate of all cases

| Groups | No. of cases | Survival rate (%) | | |
|--------------------|--------------|-------------------|--------|---------|
| | | 1-year | 3-year | 5-year |
| TS | | | | |
| Positive | 33 | 69.7 | 51.5 | 33.1 |
| Negative | 51 | 80.0 | 45.2 | 30.2 |
| bcl-2 | | | | |
| Positive | 23 | 90.9 | 68.2 | 53.8 * |
| Negative | 61 | 73.8 | 40.3 | 22.9 |
| p53r | | | | |
| Positive | 52 | 76.5 | 42.3 | 23.5 * |
| Negative | 32 | 81.2 | 56.2 | 42.6 |
| p-stage | | | | |
| I or II | 41 | 92.7 | 68.3 | 45.3 ** |
| III A, III B or IV | 43 | 64.3 | 27.4 | 17.4 |
| T | | | | |
| 1 | 26 | 96.2 | 64.1 | 46.6 * |
| 2, 3 or 4 | 58 | 70.2 | 40.4 | 24.1 |
| N | | | | |
| 0 | 32 | 83.9 | 71.0 | 47.7 * |
| 1, 2 or 3 | 52 | 75.0 | 33.7 | 21.4 |

The univariate analysis by log-rank test showed that bcl-2-negative, p53-positive, advanced stage, large tumor size and lymph node metastasis were poor prognostic factors, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$.

Table 6. Survival rate of adenocarcinoma

| Groups | No. of cases | Survival rate (%) | | |
|--------------------|--------------|-------------------|--------|--------|
| | | 1-year | 3-year | 5-year |
| TS | | | | |
| Positive | 15 | 80.0 | 53.3 | 33.3 |
| Negative | 31 | 80.0 | 41.9 | 31.4 |
| bcl-2 | | | | |
| Positive | 10 | 77.8 | 44.4 | 33.3 |
| Negative | 36 | 80.6 | 46.2 | 30.8 |
| p53r | | | | |
| Positive | 24 | 78.3 | 37.0 | 18.5 * |
| Negative | 22 | 81.8 | 54.5 | 43.8 |
| p-stage | | | | |
| I or II | 22 | 95.5 | 63.6 | 40.9 * |
| III A, III B or IV | 24 | 65.2 | 28.5 | 23.7 |
| T | | | | |
| 1 | 18 | 94.4 | 64.9 | 46.5 |
| 2, 3 or 4 | 28 | 70.4 | 33.3 | 22.2 |
| N | | | | |
| 0 | 18 | 88.2 | 70.6 | 52.9 * |
| 1, 2 or 3 | 28 | 75.0 | 30.4 | 17.1 |

The univariate analysis by log-rank test showed that p53-positive, advanced stage and lymph node metastasis were poor prognostic factors, respectively. * $p < 0.05$.

Table 7. Survival rate of squamous cell carcinoma

| Groups | No. of cases | Survival rate (%) | | |
|--------------------|--------------|-------------------|--------|--------|
| | | 1-year | 3-year | 5-year |
| TS | | | | |
| Positive | 18 | 72.2 | 50.0 | 32.4 |
| Negative | 20 | 80.0 | 50.0 | 28.1 |
| bcl-2 | | | | |
| Positive | 13 | 100 | 84.6 | 67.7 * |
| Negative | 25 | 64.0 | 32.0 | 12.0 |
| p53r | | | | |
| Positive | 28 | 75.0 | 46.4 | 27.2 |
| Negative | 10 | 80.0 | 60.0 | 40.0 |
| p-stage | | | | |
| I or II | 19 | 89.5 | 73.7 | 50.7 * |
| III A, III B or IV | 19 | 63.2 | 26.3 | 10.5 |
| T | | | | |
| 1 | 8 | 100 | 62.5 | 46.9 |
| 2, 3 or 4 | 30 | 70.0 | 46.7 | 25.7 |
| N | | | | |
| 0 | 14 | 78.6 | 71.4 | 40.8 |
| 1, 2 or 3 | 24 | 75.0 | 37.5 | 25.0 |

The univariate analysis by log-rank test showed that bcl-2-negative and advanced stage were poor prognostic factors, respectively. *p<0.05.

Table 8. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on non-small cell lung cancers-all cases

| Variables | χ^2 | p value |
|--------------------------|----------|---------|
| bcl-2 negative | 6.367 | 0.0116 |
| p53 positive | 6.449 | 0.0111 |
| Stage III A, III B or IV | 4.404 | 0.0358 |
| T2, 3, or 4 | 4.717 | 0.0299 |
| N1, 2, or 3 | 1.807 | 0.1789 |

Bcl-2-negative, p53-positive, advanced stage and large tumor size were independent poor prognostic factors.

Table 9. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on adenocarcinoma

| Variables | χ^2 | p value |
|--------------------------|----------|---------|
| bcl-2 negative | 0.060 | 0.8071 |
| p53 positive | 5.082 | 0.0242 |
| Stage III A, III B or IV | 0.969 | 0.3250 |
| T2, 3, or 4 | 1.916 | 0.1663 |
| N1, 2, or 3 | 0.807 | 0.3690 |

P53 positive was an independent poor prognostic factor.

行と p53 過剰発現との間には相関を認めなかった。なお年齢、性別、T 因子、N 因子、M 因子についても同様であった (表4)。組織型別では、扁平上皮癌症例で陽性率が73.7%であり、腺癌症例の陽性率52.2%に比し有意に高値であった (p<0.05)。腺癌の p53 過剰発現率は I 期が46.2%、II 期が55.6%、III A 期が63.6%、III B 期が45.5%、IV 期が50%であり、全症例と同様に

Table 10. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on squamous cell carcinoma

| Variables | χ^2 | p value |
|--------------------------|----------|---------|
| bcl-2 negative | 12.366 | 0.0004 |
| p53 positive | 0.089 | 0.7659 |
| Stage III A, III B or IV | 1.136 | 0.2864 |
| T2, 3, or 4 | 3.261 | 0.0709 |
| N1, 2, or 3 | 5.056 | 0.0245 |

Bcl-2-negative and lymph node metastasis were independent poor prognostic factors.

病期の進行と p53 過剰発現の間には相関を認めなかった。また年齢、性別、組織型、T 因子、N 因子、M 因子による p53 過剰発現率の差を認めなかった。扁平上皮癌の p53 過剰発現率をみると、I 期が55.6%、II 期が90%、III A 期が55.6%、III B 期が87.5%、IV 期が100%であり、腺癌症例と同様に病期の進行と p53 過剰発現の間には相関を認めなかった。なお年齢、性別、組織型、T 因子、N 因子、M 因子についても同様であった。

IV. TS 値と bcl-2 値との相関

TS 値と bcl-2 蛋白発現量との相関は、非小細胞肺癌全体、腺癌、扁平上皮癌のいずれにおいても認められなかった。

V. TS 値と p53 値との相関

非小細胞肺癌において TS 値と p53 発現量との間には有意な正の相関関係が認められた (p<0.05, 図4)。また、腺癌と扁平上皮癌に分けて検討しても、各々両者間に有意な相関関係がみられた。

VI. 単変量解析による非小細胞肺癌の予後因子の検討

単変量解析では、非小細胞肺癌全体で bcl-2 蛋白発現陰性 (図

5), p53過剰発現 (図6), 病期Ⅲ以上, T2以上, リンパ節転移陽性が予後不良因子と判定された。また腺癌症例ではp53過剰発現, リンパ節転移陽性, 病期Ⅲ以上が, 扁平上皮癌症例ではbcl-2蛋白発現陰性, 病期Ⅲ以上が予後不良因子と判定された (表5, 6, 7)。

Ⅶ. 多変量解析による非小細胞肺癌の予後因子の検討

多変量解析では, 非小細胞肺癌全体でbcl-2蛋白発現陰性, p53過剰発現, T2以上が独立した予後不良因子と判定された。また腺癌症例ではp53過剰発現が, 扁平上皮癌ではbcl-2蛋白発現陰性, T2以上, リンパ節転移陽性が独立した予後不良因子と判定された (表8, 9, 10)。

考 察

5-FUは, 様々な因子により抗腫瘍効果が影響を受ける薬剤である。主たる細胞毒性発揮機序であるTS阻害の成立には, 5-FUの活性型である5-フルオロデオキシウリジン1リン酸 (5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate, FdUMP) に加えて十分量の還元型葉酸の存在が必須である⁹⁾。さらに, 5-FUの解毒・分解に与るジヒドロピリミジン脱水素酵素 (dihydropyrimidine dehydrogenase) の活性も5-FUの細胞毒性に影響を及ぼす¹⁴⁾。しかし, 標的酵素であるTS蛋白の発現量は, 単独でも5-FUを中心薬剤とする癌化学療法の効果予測に有用であると報告されている¹⁵⁾。一方, TS蛋白発現量と5-FUの感受性試験結果とが相関しないとの報告もある¹⁴⁾。しかし, 種々の因子に修飾される5-FUの抗腫瘍効果を試験管やヌードマウスを用いた抗腫瘍剤感受性試験で判定すること自体が困難である。さらに, 5-FUは投与速度によって代謝される経路が異なることも感受性試験の信頼性を損ねる一因であろう。通常, ヌードマウスを用いた5-FUに対する感受性試験には40mg/kg前後の5-FUが短時間に投与される。5-FUは, このように急速に投与された場合その相当量がフッ化RNAに代謝され, RNAのプロセッシング障害などを介して細胞毒性を発揮すると考えられる。現在我が国では, 5-FUの持続投与と腫瘍内の還元型葉酸を上昇させる調節因子を併用する化学療法が主流になっている³⁰⁾。欧米では, 5-FU療法 (5-FU based chemotherapy) とは5-FUとLVの併用療法を意味する¹⁶⁾。これらは, いずれも5-FUによる有効なTS阻害の成立を期待しておこなわれている化学療法である。したがって, 5-FUのTS阻害による抗腫瘍効果を評価しない感受性試験の結果が臨床成績と異なって当然と言える。5-FUによるTS阻害には, TSに対する十分量のFdUMPと同じく十分量の CH_2FH_4 の供給が必須だからである。これらの条件をみたせば, 腫瘍の由来臓器や組織型などに関わらず5-FUは明確な細胞毒性を発揮すると考えられる。調節因子を併用した5-FUは, 肺癌に対する補助化学療法として有用であったと報告されている¹⁷⁾。したがって, 腫瘍組織内で発現しているTS蛋白量を把握することは, 非小細胞肺癌に対する化学療法の治療戦略上極めて意義深いことと言える。

本研究では, TS蛋白のポリクローナル抗体を用いた免疫染色によって肺癌組織においてもTS蛋白の発現が観察された。またCAS200を用いたTS染色性の定量が可能であった。抗TSポリクローナル抗体を用いた免疫染色は, 生検標本などの微量検体を用いても施行が可能である。したがって, 切除不能な進行・再発症例に対しても行うことのできる, 有用なTS蛋白定量法であると考えられる。

p53本来の機能を有する野生型p53は半減期が短く, 免疫染色での検出はしばしば困難である¹⁸⁾。一方, 変異型p53の半減期はその20倍程度であるため, 本研究で陽性と判断されたp53はそのほとんどが変異型であると思われる¹⁸⁾。本研究では, p53の発現量とTS値の間に高い相関関係が認められた。したがって, 変異型p53発現症例は高いTS値を呈すると考えられる。教室の宇野¹⁰⁾も, ヒト大腸癌組織で同様の相関を認めたと報告した。この現象に関連して, 野生型p53が試験管内でTSのプロモーター活性を阻害するとの報告がある¹⁹⁾。またTS蛋白もmRNAとリボ核蛋白複合体を形成し, p53の発現を調節していると報告されている²⁰⁾。これらの知見から, TS値とp53発現量の間に見られる相関は野生型p53発現の低下に伴うTSのプロモーター活性上昇によるものと推測される。本研究によって, TS蛋白と野生型p53との間の相互発現調節機構が非小細胞肺癌組織にも存在することが強く示唆された。これら細胞増殖の調節に与る蛋白の変異が連鎖的に他の因子の発現異常をもたらせば, 細胞の癌化に拍車がかかるものと考えられる。

一方, 原発巣におけるTS蛋白の発現量とその悪性度と相関するという報告がある²¹⁾。本研究では, TS蛋白の発現量は肺癌取扱い規約に定められているいずれの臨床病理学的因子とも相関しなかった。しかし, 単変量解析による予後との関連では, 扁平上皮癌の病期ⅢAと病期ⅢB症例でTS蛋白高発現症例が有意に低い術後生存率を示した。非小細胞肺癌では, 病期ⅢBまでが切除の適応となる。病期Ⅱに分類される症例の数が少ないため, 手術適応となる症例のほとんどが病期ⅠないしⅢに含まれる。さらに, 後者の手術治療成績は, 前者のそれと比較して明確に劣っている。したがって, 病期Ⅲ症例のなかでとりわけ予後の不良な集団を拾い上げることは, 予後向上を目的とした補助療法を施行する有用な指標となる。

最近, 進行・再発非小細胞肺癌に高い奏効率を示すと報告されている新規抗腫瘍剤にトポイソメラーゼ (TOP I) 阻害剤CPT-11がある²²⁾。CPT-11は, TOP I活性が高値を示す腫瘍により高い抗腫瘍効果を発揮するとされているが²³⁾, 同じS期特異性蛋白であるTOP IとTS蛋白の発現には高い相関があると推測される。TS値の高い症例には5-FU療法が奏効する割合が低いことを考えあわせると, このような症例にはCPT-11を第一選択薬剤とすべきである。このような治療戦略によって, TS高値を示す病期Ⅲ症例の予後を改善できるかについては極めて興味深い。今後の臨床的検討が望まれる。

細胞が死に至る過程はネクローシスとアポトーシスに大別される。前者ではミトコンドリアの障害や細胞膜の破綻が生じ, 細胞膜の流出に伴って周囲には炎症が惹起される。後者は, 核の凝縮に引き続く断片化が特徴的で, 形成されたアポトーシス小体はマクロファージに貪食され周囲に炎症を生じない。アポトーシスに属する細胞死として, 個体の発生過程で特定部位の細胞が死滅し形態形成を遂行する現象がある。これは「計画された細胞死 (programmed cell death)」と称されており, その制御機構については未だ解明されていない部分が多い。さらに, 成熟組織の細胞交代や免疫システムの構築, 有害化した細胞の排除などにもアポトーシスは大きな役割を果たしている。アポトーシスの誘因としては放射線や温熱による細胞障害, ウィルス感染, 細胞の癌化などが挙げられる。近年, 抗癌剤によって障害を受けた癌細胞の死もアポトーシスの過程をたどることが判明している²⁴⁾。様々な誘因によって惹起されたアポトーシス

のシグナルは、完全には解明されていない情報伝達経路を通りアポトーシス決定機構に伝えられる。アポトーシスを開始させる機構の制御には様々な遺伝子が関与していると考えられる。bcl-2は、アポトーシスを制御することによって、細胞の癌化や、抗癌剤に対する薬剤抵抗性に関与する独特な癌遺伝子である^{25)~27)}。Kotyら²⁸⁾は、非小細胞肺癌由来の継代細胞株を用いた実験で、bcl-2のアンチセンスオリゴヌクレオチドによってアポトーシスが誘導されると報告した。5-FUのもたらす細胞死もアポトーシスであり、bcl-2蛋白の発現は当該薬剤に対する感受性の低下に帰結するものと考えられる。本研究では、5-FUの抗腫瘍効果に深く関与するTS値とbcl-2蛋白発現との間には相関を認めなかった。したがってbcl-2蛋白の発現は、5-FUに対する感受性低下の独立した因子として作用するものとして考えられる。またbcl-2は、癌化の早期に関与する遺伝子であるとの報告²⁹⁾³⁰⁾や、早い病期症例で陽性率が高いとの報告もある²⁹⁾³⁰⁾。しかし本研究では、非小細胞肺癌全体においても組織型別に検討してもbcl-2蛋白発現陽性率と臨床病期の間には相関は認められなかった。bcl-2蛋白発現と予後との関連に対する諸家の意見は一致していない。Ohsakiら²⁹⁾は、非小細胞肺癌を用いた検討でbcl-2蛋白発現例は生存期間が長かったと報告している。本研究では、bcl-2蛋白の発現陽性例は陰性例と比較して有意に良好な予後を示し、多変量解析によって独立した予後因子と判定された。bcl-2が悪性腫瘍の進展に及ぼす影響の機序は複雑であると推測され、そのために種々の結果が報告されているものと考えられる。

p53は、細胞周期制御因子の一つである。p53はG1期からS期への移行に必須であるE2F1の解離に制御的に働き、その結果細胞はG1期で停止する³¹⁾。また多機能蛋白であるp53は、アポトーシスを誘導する働きも有している³¹⁾。本研究では、変異型p53の発現とTS値との間に有意な正の相関を認めた。TSの高値は、5-FUによる細胞毒性発揮を阻害する重要な因子である。さらにTS値の上昇に伴ってp53変異発生率が高まるとすれば、これらの因子が相まって5-FUの抗腫瘍効果を減ずることになる。大腸癌では、その発癌過程ではたすp53変異の役割が解明されつつある³²⁾³³⁾。またその他の癌腫でもp53の変異が高率に認められ、予後因子としての検討も数多くなされてきた。家接³⁴⁾は、非小細胞肺癌を用いた検討でp53発現は独立した予後不良因子であると結論付けた。本研究においても、p53発現例は有意に不良な予後を示した。またp53の発現はいずれの臨床病理学的因子とも相関せず、多変量解析によって独立した予後因子と確認された。

TSの周辺には個体の健全性保持に重要な代謝過程が複雑に入り組んでいる。還元型葉酸代謝に与るメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (methylene tetrahydrofolate reductase, MTHFR) の異常はホモシスチン尿症の原因となる³⁵⁾。また同じくMTHFRの酵素活性異常によりもたらされる高ホモシスチン血症は、心血管系疾患発生の危険性を著しく高める³⁶⁾。さらに、ホモシスチンの前駆体であるSアデノシルメチオニンは、種々の物質をメチル化する際の重要なメチル基供与体である。Kamiyaら³⁷⁾は、非小細胞肺癌組織においてMTHFRの活性が低い遺伝子型ではサイクリン依存性キナーゼ4阻害蛋白 (cyclin-dependent kinase-4 inhibitor, p16/INK4) の発現が高いと報告した。彼らは、かかるp16/INK4の高発現はp16/INK4のmRNAのプロモーター領域のメチル化の制御に由来するとしている。

p16/INK4は、G1ブロック制御に対し野生型p53と同様抑制的に働く。しかし、教室の宇野はp16/INK4が高発現している胃癌組織で有意にTS値が高いことを報告した。TS蛋白自身はTSmRNAからの蛋白翻訳を調節している可能性もあり、TSを取り巻く蛋白の発現調節機構は極めて複雑であると考えられる。本研究では、非小細胞肺癌で、変異型p53の発現とTS値が正の相関を有することが判明した。今後、この領域の蛋白発現に関与する因子をひとつひとつ解明していくことが、複雑な蛋白群の相互発現調節機構を解明するうえで重要と思われる。

結 論

84例の非小細胞肺癌症例を対象としてTS、bcl-2蛋白およびp53の発現を免疫染色性の数量化によって行い、以下の結論を得た。

1. TS蛋白発現陽性率は、非小細胞肺癌全体で39.3%、腺癌で32.6%、扁平上皮癌で47.4%であった。
2. TS値およびTS蛋白陽性率と臨床病理学的因子との間には有意な相関を認めなかった。
3. 扁平上皮癌で、病期Ⅲ症例の予後はTS蛋白陽性例で陰性例と比較して有意に不良であった。
4. bcl-2蛋白発現陽性率は、非小細胞肺癌全体で27.4%、腺癌で21.7%、扁平上皮癌で34.2%であった。
5. 各臨床病理学的因子とbcl-2蛋白発現率との間には相関を認めなかった。
6. p53過剰発現率は、非小細胞肺癌全体で61.9%、腺癌で52.2%、扁平上皮癌で73.7%であった。
7. 各臨床病理学的因子とp53過剰発現率との間には相関を認めなかった。
8. TS値とp53発現量との間には、非小細胞肺癌全体で有意な正の相関関係が認められた。また、腺癌と扁平上皮癌に分けて検討しても、両者間に有意な相関関係がみられた。
9. 多変量解析では、非小細胞肺癌全体でbcl-2蛋白発現陰性、p53過剰発現、T2以上が、腺癌症例ではp53過剰発現が、扁平上皮癌ではbcl-2蛋白発現陰性、T2以上、リンパ節転移陽性が有意な予後不良因子と判定された。

以上より、非小細胞肺癌におけるTS発現を免疫組織化学的に評価することが可能であることが判明した。またTSはbcl-2の発現とは相関を示さなかったが、p53発現量とは有意な正の相関を示した。今後、種々の細胞周期制御因子とS期特異性蛋白の相互発現調節機構を解明することが重要と思われる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。またCAS200の使用に際し、御指導いただきました医学部附属病院病理部野々村昭孝助教授に心から感謝いたします。終始、直接実験の御指導を賜りました大村健二講師に心から感謝いたします。また本研究の遂行にあたり御協力いただきました金沢大学医学部第一外科教室員の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 国民衛生の動向・厚生指針 臨時増刊、第45巻第9号、厚生統計協会、東京、1998
- 2) Yang CH, Cheng AL, Yeh KH, Yu CJ, Lin JF, Yang PC. High dose tamoxifen plus cisplatin and etoposide treatment of patients with advanced, inoperable non-small cell lung carcinoma.

Cancer 86: 415-420, 1999

- 3) 中野修治, 三ツ木健二, 一瀬一郎, 黒木巳賀, 安西慶三, 中村 稔, 仁保善之. 5-FUと時間差化学療法にLeucovorinとDipyridamoleの併用を試みた非小細胞肺癌5例の検討. 癌と化学療法 18: 1375-1378, 1991
- 4) Dohden K, Omura K, Watanabe Y. Ternary complex formation and reduced folate in surgical specimens of human adenocarcinoma tissues. Cancer 71: 471-480, 1993
- 5) Omura K, Misaki T, Hashimoto T, Kanehira E, Watanabe T, Ishida F, Watanabe Y, Shirasaka T. Changes in folate concentration in Yoshida sarcoma after administration of leucovorin or cisplatin. Cancer Chemother Pharmacol 35: 183-187, 1995
- 6) 白坂哲彦, 島本雄司, 大下英之, 木村彰男, 福島正和, 5-FU系抗癌剤とシスプラチンの併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序-5-FUのbiochemical modulationの立場から-. 癌と化学療法 18: 403-409, 1991
- 7) Peters GJ, van der Wilt CL, van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM. Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colorectal cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. J Clin Oncol 12: 2035-2042, 1994
- 8) Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frösing R, Bernstein L, Hays AA. Mechanism of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. Cancer Res 48: 5894-5900, 1988
- 9) Carreras CW, Santi DV. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. Annu Rev Biochem 64: 721-762, 1995
- 10) 宇野雄祐. 胃癌・大腸癌におけるチミジル酸合成酵素および細胞周期制御因子の発現とその臨床的意義に関する研究. 十全医会誌 108: 381-395, 1999
- 11) Pritchard DM, Watson A, JM, Potten CS, Jackman AL, Hickman JA. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: Evidence for the involvement of RNA perturbation. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1795-1799, 1997
- 12) 大竹由美子. 原発性非小細胞肺癌におけるbcl-2蛋白およびp53蛋白発現の予後因子としての意義について. 十全医会誌 106: 1-9, 1997
- 13) 日本肺癌学会編. 臨床・病理, 肺癌取扱い規約, 改訂第4版, 23-30頁, 金原出版, 東京, 1995
- 14) Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, Kitajima M, Takechi T, Okabe H, Fukushima M. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-Fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. Clin Cancer Res 5: 883-889, 1999
- 15) Maehara Y, Kusumoto T, Kusumoto H, Anai H, Sakaguchi Y, Kido Y, Okamura T, Korenaga D, Sugimachi K. 5-Fluorouracil and UFT-sensitive gastric carcinoma has a high level of thymidylate synthase. Cancer 63: 1693-1696, 1989
- 16) Laufman LR, Brenckman Jr WD, Stydnicki KA, Morgan ED, Collier M, Knick VB, Duch DS, Mullin R, Ferone R. Clinical experience with leucovorin and 5-fluorouracil. Cancer 63: 1031-1035, 1989
- 17) Wada H, Miyahara R, Tanaka F, Hitomi S. Postoperative adjuvant chemotherapy with PVM (Cisplatin + Vindesine + Mitomycin) and UFT (Uracil + Tegafur) in resected stage I-II NSCLC (non-small cell lung cancer): a randomized clinical trial. West Japan Study Group for lung cancer surgery (WJSG). Eur J Cardiothorac Surg 15: 438-443, 1999
- 18) Levine AJ, Monand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. Nature 351: 453-456, 1991
- 19) Jingfang JU, Joan PL, Maley F, Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3769-3774, 1999
- 20) Chu E, Sitki MC, Jingfang JU, Chen TM, Samir K, Donna MV, Mizumura N, Patel M, Maley GF, Maley F, Allegra CJ. Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. Mol Cell Biol 19: 1582-1594, 1999
- 21) Kosaka T, Ueshige N, Sugaya J, Nakano Y, Takashima S. Effect of low-dose CDDP/5-FU therapy on thymidylate synthase content. Gan To Kagaku Ryoho 25: 450-453, 1998
- 22) Tsuruo T, Matsuzaki T, Matsushita M, Saito H, Yokokura T. Antitumor effect of CPT-11, a new derivative of camptothecin, against pleiotropic drug-resistant tumors in vitro and in vivo. Cancer Chemother Pharmacol 21: 71-74, 1988
- 23) Jansen WJ, Zwart B, Hulscher ST, Giaccone G, Pinedo HM, Boven E. CTP-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. Int J Cancer 70: 335-340, 1997
- 24) 辻本賀英. アポトーシス-細胞死の分子生物学-. 癌と化学療法 21: 591-595, 1994
- 25) Tujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in follicular lymphoma. Science 228: 1440-1443, 1985
- 26) 辻本賀英. bcl-2遺伝子とは. Medical Immunology 22: 127-131, 1991
- 27) 江崎幸治. bcl-2とアポトーシス. 臨床医 29: 2092-2094, 1995
- 28) Koty PP, Zhang H, Levitt ML. Antisense bcl-2 treatment increases programmed cell death in non-small cell lung cancer cell lines. Lung Cancer 23: 115-127, 1999
- 29) Ohsaki Y, Toyosima E, Fujiuchi S, Matsui H, Hirata S, Miyokawa N, Kubo Y, Kikuchi K. Bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers: correlation with survival time. Clin Cancer Res 2: 915-920, 1996
- 30) 米田 敏, 白日高歩, 川原克信, 草野卓雄, 岩崎昭憲, 山下純一, 岡林 寛, 白石武史, 田代光太郎, 大島孝一. 原発性非小細胞肺癌におけるbcl-2蛋白発現に関する検討. 肺癌 35: 857-863, 1993
- 31) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. Science 246: 491-494, 1989
- 32) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Nakamura Y.

Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989

33) Shan L, Nakamura Y, Zhang Z, Jing X, Nakamura M, Murakami Y, Yokoi T, Kakudo K. Overexpression of p53 protein correlates with a high risk of malignant transformation of adenomas in patients with multiple colorectal adenomas. *Pathol Int* 48: 281-286, 1998

34) 家接健一. 原発性非小細胞肺癌における p53 蛋白発現および腫瘍増殖能に関する研究. *十全医会誌* 102: 492-505, 1993

35) Fowler B, Jakobs C. Post- and prenatal diagnostic methods for the homocystinurias. *Eur J Pediatr* 157: S88-S93, 1998

36) Miner SE, Evrovski J, Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 30: 189-201, 1997

37) Kamiya H, Kawakami K, Miyanaga T, Omura K, Oda M, Murakami S, Watanabe Y. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is associated with expression of p16 in human lung cancer. *Oncology Reports* 5: 911-914, 1998

Expression of Thymidylate Synthase in Non-small Cell Lung Cancer and its Clinical Significance Iwao Adachi, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University Kanazawa, 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **108**, 608 — 619 (1999)

Key words non-small cell lung cancer, thymidylate synthase, bcl-2 protein, p53, immunohistochemical staining

Abstract

Thymidylate synthase (TS) catalyzes the reductive methylation of deoxyuridine 5'-monophosphate to deoxythymidine 5'-monophosphate, and is also a target enzyme of 5-fluorouracil (5-FU). Recently, it has been revealed that apoptosis plays an important role in the anti-cancer effects of 5-FU. bcl-2, which is an oncogene, suppresses apoptosis. p53 is one of the cell cycle regulators and induces apoptosis. In this study, immunohistochemical staining of thymidylate synthase (TS), bcl-2 protein, and p53 was performed in 84 patients with non-small cell lung cancers to evaluate the relationship between the expression of the respective proteins and the clinicopathological factors or prognoses of patients. The positive rate of TS protein expression was 39.3% over all patients with non-small cell lung cancers. When positive rates of TS protein expression were classified by the histological type of cancer, 32.6% of patients with adenocarcinomas were positive, while 47.4% of those with squamous cell carcinomas were positive. Moreover, there was no significant correlation between either the level or the positive rate of TS protein expression and the respective clinicopathological factors. When the relationship between the TS level and prognosis of patients in clinical stage III with squamous cell carcinoma was evaluated, significantly poorer prognosis was noted in patients who were positive for TS protein expression compared to those who were negative ($p < 0.05$). The positive rates of bcl-2 protein expression were 27.4% over all patients, 21.7% in those with adenocarcinomas, and 34.2% in those with squamous cell carcinomas. However, there were no correlations between the respective clinicopathological factors and the positive rate of bcl-2 protein expression. The rate of p53 overexpression was 61.9% over all patients, 52.2% in those with adenocarcinomas, and 73.7% in those with squamous cell carcinomas. The rate of p53 expression was significantly higher in patients with squamous cell carcinomas than in the other patients ($p < 0.05$). There was no correlation between the respective clinicopathological factors and the rate of p53 overexpression. However, there was a positive correlation between the TS level and the p53 level over all patients with non-small cell lung cancer ($p < 0.05$). Moreover, similar results were obtained when evaluations were performed after classifying the non-small cell lung cancers into adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. Multivariate analysis revealed that negative expression of bcl-2, overexpression of p53 and tumor stage above T1 were independent predictors of poor prognosis in overall cases. p53 overexpression was an independent predictor of poor prognosis for an adenocarcinoma, and negative expression of bcl-2, tumor stage above T1 and positive lymph node metastasis were independent predictors of poor prognosis for a squamous cell carcinoma. These results show that TS protein expression can be evaluated by immunohistochemical staining of non-small cell lung cancer tissues. Moreover, they also suggest that some mechanism is operating which regulates mutual expression of TS and mutated p53 in non-small cell lung cancers.