

原発性非小細胞肺癌における骨髄中微小癌細胞の臨床的意義：  
転移と認知する上での妥当性と播種経路に関する1考察

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9455">http://hdl.handle.net/2297/9455</a>

## 原発性非小細胞肺癌における骨髓中微小癌細胞の臨床的意義

—転移と認知する上での妥当性と播種経路に関する1考察—

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)

野 崎 善 成

骨髓中微小癌細胞の存在意義を明らかにすることを目的として、非小細胞肺癌患者203症例の骨髓液を対象に上皮細胞に特異的なマーカーであるサイトケラチン (cytokeratin, CK) に対する免疫組織染色を行い骨髓中微小癌細胞の検出を試みるとともに、骨髓中における微小癌細胞の播種経路としての腫瘍血管の関与を探るため、原発巣における腫瘍内微小血管密度 (microvessel density, MVD) ならびに血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 発現との相関性を検討した。さらに転移関連マーカーとしてnm23-H1の原発巣における発現性を免疫組織学的に評価し、骨髓中微小癌細胞の播種との相関を探った。全体として骨髓中微小癌細胞の検出率は42.4%であり、組織型別にみた検出率に差は認めなかったが、病期、T因子およびN因子の進行とともに検出率は有意に上昇し (それぞれ $p < 0.001$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.0005$ )、治癒切除の施行された症例において、全体およびI期、III A期において骨髓中微小播種例は非播種例に比し有意に予後不良 (それぞれ $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0003$ ,  $p = 0.0133$ ) であり、且つ播種陽性例には遠隔再発が多く認められた。さらに骨髓中微小播種例のMVDは非播種例に比し有意に高値を示し ( $p < 0.0001$ )、VEGF発現率も播種例で有意に高く ( $p < 0.0001$ )、骨髓播種の成立におけるVEGFを介した腫瘍血管新生の関与が示唆された。原発巣におけるnm23-H1蛋白発現陽性率は44.2%であり、組織型、病期、T因子、N因子、M因子のいずれにおいても有意差は認められなかったが、nm23-H1蛋白発現減弱例が骨髓中微小播種を有する頻度は有意に高かった ( $p = 0.0023$ )。Nm23-H1蛋白発現の予後因子としての意義は確認できなかったが、減弱例は遠隔転移による再発が多い傾向が認められた。以上の結果から骨髓中微小癌細胞播種は、遠隔転移再発の前段階として術後再発の一指標となる可能性が示された。その成立には、原発巣におけるVEGFを介した腫瘍新生血管およびnm23-H1蛋白発現の減弱性の関与が示された。

**Key words** non-small cell lung cancer, bone marrow microdissemination, microvessel density, vascular endothelial growth factor, nm23-H1

肺癌は近年増加傾向にあり、本邦における部位別悪性新生物死亡率において、男性では死因の第一位、女性では胃癌に次ぎ第二位を占めるに至っている<sup>1)</sup>。非小細胞肺癌の根治的治療手段は外科的切除が中心であるが、いわゆる病理学的病期I期の治癒切除例においても5年生存率は70%前後<sup>2)3)</sup>と、胃癌などの他の固形癌に比し、再発性の高さが指摘されている。再発形式の約2/3は、脳、骨、肺などへの血行性転移様式をとることから<sup>3)4)</sup>、手術時すでに存在する骨髓、末梢血液中への癌細胞の播種の可能性が指摘されている。近年、免疫組織学的あるいは分子生物学的手法を用いて、従来の病理組織学的方法からは検出不可能な微小な播種癌細胞の検出が可能となり、その存在が肺癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌などの癌で多数報告されている<sup>5)</sup>。非小細胞肺癌に関してはこれまで、Pantelら<sup>6)</sup>、Coteら<sup>7)</sup>、Ohgamiら<sup>8)</sup>の報告があるが、いずれの報告においても骨髓中癌細胞陽性例の予後は不良であり、骨髓中癌細胞の存在が肺癌

の再発予知ないし再発危険因子として重要な生物学的予後因子となる可能性が支持されている。

腫瘍血管新生は、腫瘍の増殖、進展を規定する重要な因子である<sup>9)10)</sup>。また腫瘍組織内の血管密度と遠隔転移、術後再発との相関が報告され<sup>11)~14)</sup>、腫瘍内新生血管の転移経路としての重要性が注目されている。癌転移の成立には、原発巣での増殖と離脱、組織への浸潤、脈管への侵入、運搬、標的臓器の血管での捕捉と浸出、標的臓器での浸潤、増殖と多段階的過程を経る必要がある。腫瘍組織での血管新生を促進する因子のうち、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) は現在最も強力な血管内皮増殖作用を有するとされ、非小細胞肺癌においても、VEGFは血管新生を介して癌の進展に関与することが示され<sup>15)16)</sup>、VEGF発現が予後不良因子として再発性と関与することが報告されている<sup>17)</sup>。

近年の分子生物学的手法の発達に伴い、転移能を有さな

平成11年11月25日受付, 平成11年12月15日受理

Abbreviations : APAAP, alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase; BMM, bone marrow microdissemination; CEA, carcino-embryonic antigen; CI, confidence interval; CK, cytokeratin; EMA, epithelial membrane antigen; MVD, microvessel density; RT-PCR, reverse transcription-PCR; VEGF, vascular endothelial growth factor

い癌細胞株に発現している遺伝子と、同じ親株に由来し転移能を獲得した子株に発現している遺伝子との間で発現量の異なる遺伝子群が存在することが明らかとなってきた。現在まで、発現レベルと転移能とに相関を有する新規遺伝子は多数報告されており、転移能を規定する遺伝子、いわゆる転移関連遺伝子として注目されている<sup>18)</sup>。Nm23はマウスメラノーマ細胞株よりディファレンシャルスクリーニング法により単離された遺伝子で<sup>19)</sup>、低転移性株に比べ高転移株において発現減弱を示し<sup>20)</sup>、さらに高転移株への遺伝子導入により転移能が抑制される<sup>21)</sup>ことから転移抑制遺伝子として注目を集めている。Nm23にはnm23-H1とnm23-H2の2つのアイソフォームが存在することが知られている。肺癌においてはnm23-H2よりもnm23-H1の方が転移能との関連が強いとされており、nm23-H1を導入したヒト肺癌高転移細胞株は転移能が抑制されることが報告された<sup>22)</sup>。これまでにnm23発現と癌転移能との間に負の相関関係が認められたものに悪性黒色腫<sup>23)</sup>、肺癌<sup>24)~26)</sup>、大腸癌<sup>27)28)</sup>、肝細胞癌<sup>29)</sup>などが挙げられるが、肺癌に関してはいまだ統一した見解は得られていない。

本研究では、原発性非小細胞肺癌患者を対象にサイトケラチン (cytokeratin, CK)18をマーカーとした免疫組織染色により骨髄中微小癌細胞の検出を試み、再発および予後との相関性を検討するとともに、原発巣における微小血管密度ならびにVEGF発現との関連性を探った。さらに原発巣におけるnm23-H1蛋白の発現を免疫組織学的に評価し、非小細胞肺癌におけるその発現意義と骨髄中微小播種との関連性につき検討した。

## 対象および方法

### I. 対象

1996年10月から1999年3月までに金沢大学医学部第一外科学講座および石川県立中央病院呼吸器外科にて原発性非小細胞肺癌と診断された患者203例、および肺癌を疑われ肺生検が行われた非担癌患者56例の骨髄液を対象とした。このうち治療切除が施行された157例に対し、骨髄中微小癌細胞の播種と再発および予後との相関を検討した。さらに163検体原発巣切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック (金沢大学医学部病理部保存) について微小血管密度、VEGF発現、nm23-H1蛋白発現を検討した。組織分類、病期分類、手術根治度は肺癌取扱い規約第4版<sup>30)</sup>に従った。203例の内訳は男性139例、女性64例であり、年齢は25歳から89歳 (平均65歳) であった。病理学的病期分類の内訳は、I期110例、II期19例、III A期44例、III B期27例、IV期3例であり、組織型別には腺癌129例、扁平上皮癌60例、腺扁平上皮癌7例、大細胞癌7例であった。

### II. 骨髄中癌細胞の検出

#### 1. 骨髄中細胞のCK免疫組織染色法

骨髄液の採取にあたっては術前、患者に研究の要綱を説明し、承諾を得た。全身麻酔導入後、患者腸骨稜を穿刺し、骨髄液を5ml採取した。10ml テストチューブ内に3mlのMono-Poly Resolving Medium (大日本製薬、大阪) を入れ、その上に5mlの骨髄液を静かに重層し、テストチューブを60分間遠心 (300xg, 室温) し、有核細胞を分離した。次に、10分間遠心沈殿 (300xg, 室温) させ、pH7.2のPBS (日本製薬、東京) を加え洗浄する作業を3回繰り返したのち、PBSを1ml加え細胞浮遊液を作製した。チュルク氏液 (武藤化学、東京) 50  $\mu$ lに細胞浮遊液450  $\mu$ lを加え有核細胞の核染を行い、血球計算盤にて細胞

数を算定し、細胞浮遊液の濃度が $2 \times 10^5$ 個/mlとなるように調製した。さらにオートスマア (サクラ製機、東京) にて細胞浮遊液を5枚のスライドガラス上に塗布 (300xg, 室温, 10分間) し細胞塗抹標本を作製した。細胞塗抹標本は一晩風乾した後、4%パラフォルムアルデヒド-アセトン (40%パラフォルムアルデヒド, 0.02Mリン酸緩衝液, 蒸留水, アセトンを1:1:2:6で混合し塩酸にてpH7.0に調整したもの) にて4℃, 10分間固定した。CKの免疫組織染色は、アルカリフォスファターゼ抗アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase, APAAP) 法<sup>31)32)</sup>キット (ダコジャパン、京都) の手順に従った。pH7.6の0.05Mトリス緩衝液にて5分間、3回の洗浄を行った後、トリス緩衝液にて2  $\mu$ g/mlに希釈した抗CK18抗体 (CK2) (ペーリンガーマンハイム、東京) を4℃にて24時間反応させた。反応終了後、トリス緩衝液にて5分間、3回の洗浄を行い、2次抗体 (抗マウスIgGウサギ抗体) を室温にて30分間反応させた。トリス緩衝液にて3回洗浄した後、標識抗体 (APAAP複合体) を室温にて30分間反応させた。同様に5分間、3回の洗浄後、発色基質 (ナフトールAS-MXリン酸塩及びファーストレッドTR1錠を0.1Mトリス塩緩衝液1mlに溶解したもの) と室温にて20分間反応させた。発色基質にはさらに、骨髄内の内因性アルカリフォスファターゼを阻害する目的で0.7%のレバミゾール (levamisole, Sigma, St. Louis, USA) を1ml加えた。次に10分間流水水洗した後、マイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学) にて1分間核染色を行い、水道水にて5分間色出しを行った。最後に水溶性封入剤、ゲル/マウント (コスモバイオ、東京) にて封入した。染色の陽性対照として、腫瘍摘出時に原発巣の捺印標本を作製し、同様の方法にて染色を行った。

#### 2. 骨髄中CK陽性細胞の判定

各症例につき、陽性対照として作製した原発巣の捺印標本が陽性であることを確認した後、骨髄細胞塗抹標本すべてを鏡検し、核が明瞭でかつ細胞質が均一に赤く染色された細胞が1個でもあれば、陽性と判定した。

### III. 原発巣における免疫組織染色法

ホルマリン固定パラフィン包埋標本を4  $\mu$  mの厚さに薄切片し、シランコーティングスライド (武藤化学) に付着させた。キシレンにて10分間、3回の脱パラフィンを行ったのち、100%, 100%, 100%, 90%, 70%のエタノールにて各20回振盪し、親水処理を行い、水道水にて1分間流水水洗した。nm23-H1蛋白は無処理、von Willbrand因子およびVEGFは0.01Mクエン酸緩衝液 (pH6.0) にて500W, 5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行った後、室温にて0.3%過酸化水素 (和光、大阪) 加PBSで20分間内因性ペルオキシダーゼを阻害し、10分間流水水洗した。次にウシ正常血清 (ダコジャパン) にて10分間のブロッキングを行った後、抗ヒト von Willbrand因子モノクローナル抗体 (ダコジャパン)、抗ヒト VEGFポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)、抗ヒト nm23-H1モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を各々pH7.2のPBSにて100倍に希釈し、4℃にて24時間反応させた。一次抗体反応後、PBSにて5分間、3回洗浄し、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ、ヤギ抗体 (ダコジャパン) を室温下に20分反応させた。PBSにて5分間、3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコジャパン) で室温にて20分間反応させた。発色剤には、四塩酸3, 3'-ジアミノベンチジン (3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (和光、東京)

を用い、光学顕微鏡にて発色状態を確認しながら約5分間反応させた。10分間流水水洗し、マイヤー・ヘマトキシリン(武藤化学)にて1分間の核染色を行い、流水にて10分間色出しを行った。次に100%エタノール3回の脱水を行った後、100%キシレンにて透徹を行い、マリノール(武藤化学)にて封入した。

#### IV. 原発巣における免疫組織染色の判定

##### 1. 微小血管密度の算定

微小血管密度の算定はWeidnerらの方法<sup>33)</sup>に準じて行った。即ち、臨床病理学的背景因子に関する情報を持たずに光学顕微鏡下40倍視野にて切片全体を検索し、腫瘍内および腫瘍隣接組織における血管密度の高い部位を3ヶ所選定した後、各々の部位につき200倍視野にて血管数を算定し、その平均値を微小血管密度とした。

##### 2. VEGF発現の評価

腫瘍細胞の50%以上に染色がみられる場合を強陽性、10-50%に染色がみられる場合を陽性、10%未満にしか染色がみられない場合を陰性と定義した。

##### 3. nm23-H1蛋白発現の評価

同一切片内のマクロファージを染色の陽性対照とし、切片内の全ての腫瘍細胞がこれらと同等、もしくはより強い染色性を持つ場合を陽性、一部でもより弱い染色性を持つ腫瘍細胞を認めた場合を減弱と判定した。

#### V. 統計学的処理

各臨床病理学的因子間の骨髄中CK陽性検出率、nm23-H1蛋白発現率の差の検定には $\chi^2$ 検定を、平均値の差の検定にはMann-WhitneyのU検定を用いた。なお測定値は平均土標準偏差で示した。無再発生存曲線はKaplan-Meier法にて算出し、その検定には一般化Wilcoxon検定を用いた。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判定した。単変量解析および多変量解析はCox比例ハザードモデルを用い、単変量解析にて危険率( $p$ )が5%未満の予後不良因子を多変量解析に供した。

## 成 績

### I. 臨床的見地からみた骨髄中微小癌細胞の存在意義の検討

#### 1. 骨髄中微小癌細胞の検出率と臨床病理学的背景因子との相関

骨髄中のCK陽性癌細胞像を図1に示す。原発性非小細胞肺癌患者203例中86例(42.4%)の骨髄中にCK陽性癌細胞が検出された。表1に臨床病理学的因子別の検出率を示した。組織型別には腺癌38.8%、扁平上皮癌48.3%、腺扁平上皮癌28.6%、大細胞癌71.4%であり、組織型間に統計学的有意差は認めなかった( $p=0.21$ )。病期別の検出率では、I期33.6%、II期47.4%、III A期61.4%、III BおよびIV期63.3%で、病期進行とともに有意に検出率は上昇し( $p < 0.001$ )、T因子およびN因子においてもそれぞれ有意に、因子の進行とともに陽性率は上昇し(それぞれ $p < 0.005$ ,  $p < 0.0005$ )、M因子、年齢(65歳以上、65歳未満)による差は認めなかった。性別では男性48.2%、女性29.7%と、男性で有意に高い検出率を示した( $p < 0.05$ )。

#### 2. 原発巣におけるCK発現と非担癌患者における骨髄中CK陽性細胞の検出率

203例中167例について腫瘍捺印標本の作製が可能であったがその全例で腫瘍細胞におけるCK発現が確認された。さらに、非担癌患者56例の骨髄液に対し同様の染色を行い、このうち3

例(5.4%)にCK陽性細胞が検出された。

### 3. 骨髄中微小癌細胞播種と予後との相関

203例中、治癒切除が施行された157例につき再発および予後との関係を検討した。図2にI期からIII A期全症例および病期別の無再発生存曲線を示した。全体として骨髄中微小癌細胞陽性群は陰性群に比し有意に予後不良であった( $p < 0.0001$ )。病期別にみた場合、I期およびIII A期において、陽性群は陰性群に比し有意に予後不良であった(それぞれ $p=0.0003$ ,  $p=0.0133$ )。157例に対する単変量解析では表2に示したようにT因子およびN因子、骨髄中微小播種が有意な予後不良因子であった(すべて $p < 0.0001$ )。さらにこの3者に対し多変量解析を行ったところ、表3に示したように骨髄中微小播種はT因子( $p=0.0466$ )およびN因子( $p=0.0031$ )とともに独立した予後不良因子となる( $p=0.0002$ )ことが示された。表4に骨髄中微小播種と再発形式との関係を示した。骨髄中微小播種陽性例の再発24例に対し、陰性例のそれは10例と陽性例の再発率が有意に高率であった( $p < 0.0001$ )。再発形式別にみた場合にも、局所再発および遠隔転移いずれにおいても骨髄中微小播種陽性例の再発率は陰性例に比し有意に高率であった。病期別には、I期では遠隔転移において骨髄中微小播種陽性群と陰性群との間に有意差を認めただけに対し、III A期では局所再発において2群間に有意差が認められた。

### II. 骨髄中微小播種と腫瘍内微小血管密度(microvessel density, MVD)およびVEGF発現との相関の検討

#### 1. 病理学的病期別にみた骨髄中微小播種とMVDおよびVEGF発現との相関

腫瘍組織内微小血管染色像およびVEGF染色像をそれぞれ図3、図4に示した。VEGF蛋白は腫瘍細胞の細胞質に発現が認められた。病理学的病期別にみた骨髄中微小播種と原発巣におけるMVDおよびVEGF発現との相関を表5に示した。症例全体でのMVDは $39.5 \pm 16.6$ であった。163例のうち骨髄中微小播種陽性例は69例(42.3%)であり、陽性例のMVDは $50.8 \pm 14.4$ と、陰性例の $31.2 \pm 12.6$ に比し有意に高値であった( $p < 0.0001$ )。病期別ではI期において骨髄中微小播種陽性例のMVD $48.3 \pm 13.7$ は陰性例の $28.9 \pm 10.0$ に比し有意に高値であった( $p < 0.0001$ )。II期およびIII B+IV期においても骨髄中微小播種陽性群、陰性群の間でMVDに有意差が認められ(それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ )、III A期においても統計学的有意差は認めないものの、同様の傾向が認められた( $p=0.06$ )。163例全体においてVEGF発現陽性率90.2%、強陽性率は43.6%であった。骨髄中微小播種とVEGFの発現性との検討においては、全体として骨髄中微小播種陽性例では陰性例に比しVEGF陽性率、強陽性率ともに有意に高率であった(それぞれ $p < 0.01$ ,  $p < 0.0001$ )。病期別にみた場合、I期においても同様の結果が得られ、(陽性率、強陽性率それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.0005$ )、II期においてはVEGF強陽性率により評価を行った場合にのみ有意差が認められた( $p < 0.05$ )。III A期、III B+IV期においては陽性群、陰性群間に統計学的有意差は認められなかった。

#### 2. 組織型別にみた骨髄中微小播種とMVD、VEGF発現との相関

組織型別にみた骨髄中微小播種とMVDおよびVEGF発現との関係を表6に示した。腺癌においては102例中37例(36.3%)が骨髄中微小播種陽性であり、そのMVDは $50.3 \pm 13.9$ と陰性例の $29.9 \pm 12.0$ に比し有意に高値であった( $p < 0.0001$ )。扁平

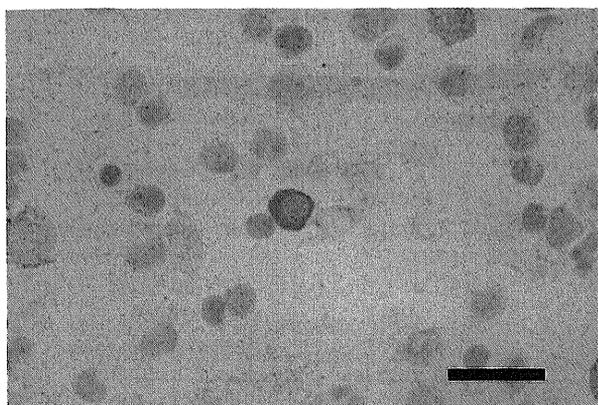


Fig. 1. Immunohistochemical staining for cytokeratin fragment in cytospin preparations for bone marrow material obtained from a patient with primary lung cancer. Scale bar indicates 25  $\mu$ m.

上皮癌48例においても骨髄中微小播種陽性例21例(43.8%)のMVDは $49.7 \pm 13.9$ と、陰性例の $31.8 \pm 12.1$ に比し有意に高値であった( $p < 0.0001$ )。VEGF発現との関係では腺癌、扁平上皮癌において骨髄中微小播種陽性例は陰性例に比し有意差をもって高率にVEGF強陽性であった。(それぞれ $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0005$ )。

### Ⅲ. nm23-H1 蛋白発現の検討

#### 1. nm23-H1 蛋白発現と臨床病理学的諸因子との相関

nm23-H1 蛋白染色像を図5に示した。nm23-H1 蛋白は腫瘍細胞の細胞質に発現が認められた。nm23-H1 蛋白発現と各臨床病理学的諸因子との相関を表7に示した。163例全体の陽性率は44.2%であり、組織型別では腺癌48.0%、扁平上皮癌39.6%、その他30.8%と組織型間における発現率に有意差は認められなかった。病期別ではⅠ期50.0%、Ⅱ期40.0%、ⅢA期37.3%、ⅢB+Ⅳ期33.3%と、病期進行に伴い、陽性率は低下する傾向

Table 1. Relationship between bone marrow microdissemination and clinicopathological factors in 203 non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological factors	No. of cases	No. of cases (%) with bone marrow dissemination	p value
Total	203	86 (42.4)	
Sex			
Male	139	67 (48.2)	$p < 0.05$
Female	64	19 (29.7)	
Age			
< 65	85	35 (41.2)	$p = 0.77$
$\geq 65$	118	50 (42.4)	
Pathological type			
Adenocarcinoma	129	50 (38.3)	$p = 0.21$
Squamous cell carcinoma	60	29 (48.3)	
Adenosquamous carcinoma	7	2 (28.6)	
Large cell carcinoma	7	5 (71.4)	
Pathological stage			
Ⅰ	110	31 (33.6)	$p < 0.001$
Ⅱ	19	9 (47.4)	
Ⅲ	44	27 (61.4)	
Ⅲ B and Ⅳ	30	19 (63.3)	
T factor			
T1	88	25 (28.4)	$p < 0.005$
T2	73	36 (49.3)	
T3	19	11 (57.9)	
T4	23	14 (60.9)	
N factor			
N0	128	40 (31.3)	$p < 0.0005$
N1	18	10 (55.6)	
N2	50	30 (60.0)	
N3	7	6 (85.7)	
M factor			
M0	200	84 (42.0)	$p = 0.39$
M1	3	2 (66.7)	

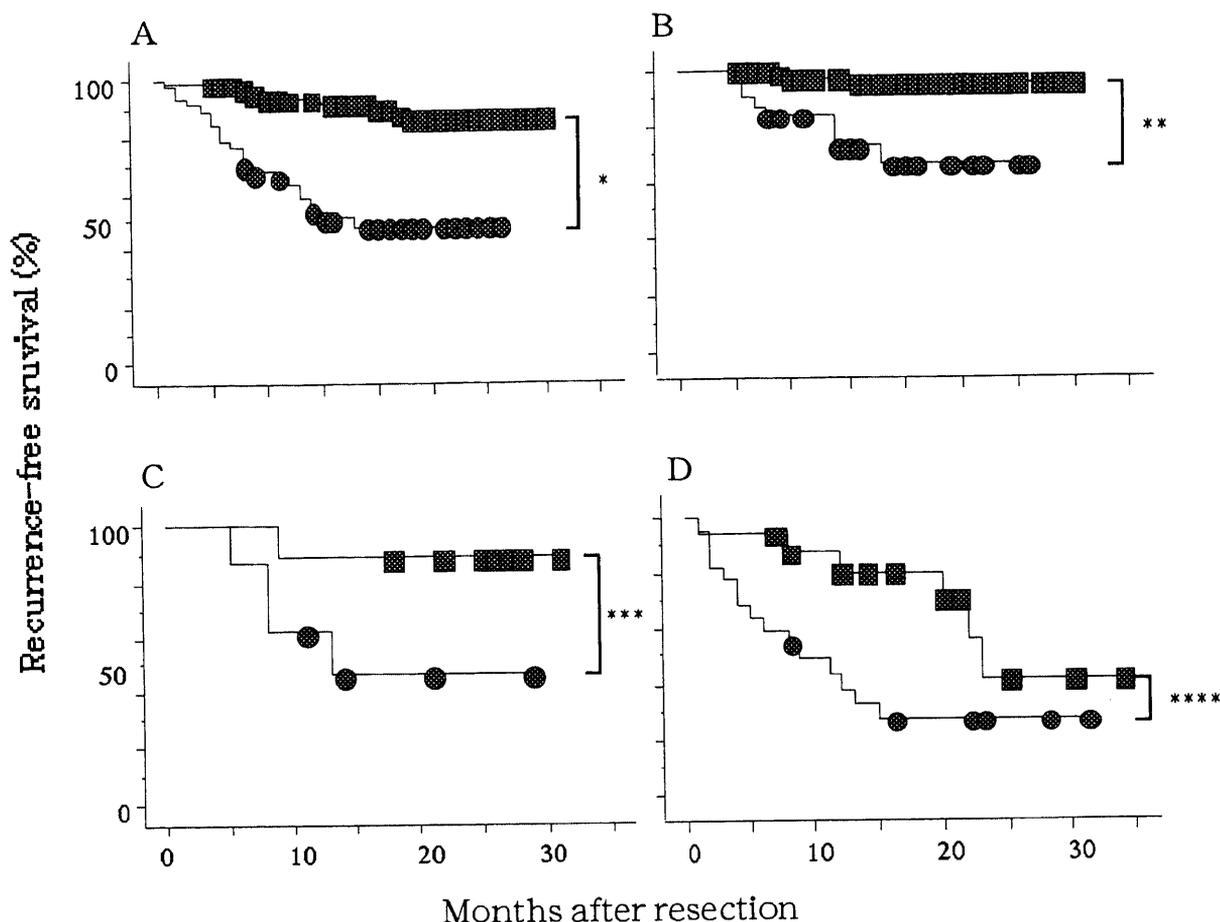


Fig. 2. Recurrence-free survival curves of curatively resected primary non-small cell lung cancer patients. ●, Cases with bone marrow microdissemination; ■, Cases without bone marrow microdissemination. (A) Total cases. \* $p < 0.0001$  (B) Stage I. \*\* $p = 0.0013$  (C) Stage II. \*\*\* $p = 0.0662$  (D) Stage IIIA. \*\*\*\* $p = 0.0133$  Each  $p$  value was defined by the generalized Wilcoxon's test

Table 2. Result of Cox proportional hazard regression analysis (simple variate) of prognostic factors in curatively resected 157 non-small cell lung cancer patients

Variables	Hazard ratio	p value	95%CI <sup>a)</sup>
BMM <sup>b)</sup> (positive)	6.195	<0.0001	2.982–12.871
N factor (N1, 2 and 3)	5.285	<0.0001	2.687–10.394
T factor (T2 and 3)	5.206	<0.0001	2.284–11.865
Sex (Male)	1.816	0.1198	0.856–3.850
Gender ( $\geq 65$ )	1.357	0.3760	0.691–2.665

<sup>a)</sup> CI, Confidence interval.

<sup>b)</sup> BMM, bone marrow microdissemination.

Table 3. Result of multivariate analysis of prognostic factors in curatively resected 157 non-small cell lung cancer patients

Variables	Hazard ratio	p value	95%CI <sup>a)</sup>
BMM <sup>b)</sup> (positive)	4.113	0.0002	1.943–8.707
N factor (N1, 2 and 3)	2.965	0.0031	1.443–6.094
T factor (T2 and 3)	2.452	0.0466	1.014–5.931

<sup>a)</sup> CI, Confidence interval.

<sup>b)</sup> BMM, bone marrow microdissemination.

Table 4. Relationship between bone marrow microdissemination and recurrence in curatively resected 157 non-small cell lung cancer patients

Bone marrow microdissemination	No. of cases (%) with recurrence			
	Locoregional	Distant metastasis	Combined <sup>a)</sup>	Total
Total (n=157)				
Positive (n=60)	10 (16.7)	12 (20.0)	2 (3.3)	24 (40.0)
Negative (n=97)	1 (1.0)	6 (6.2)	3 (3.1)	10 (10.3)
Stage I (n=101)				
Positive (n=30)	2 (6.7)	5 (16.7)	0 (0)	7 (23.4)
Negative (n=71)	1 (1.4)	1 (1.4)	1 (1.4)	3 (4.2)
Stage II (n=17)				
Positive (n=8)	1 (12.5)	3 (37.5)	0 (0)	4 (50.0)
Negative (n=9)	0 (0)	1 (11.1)	0 (0)	1 (11.1)
Stage III A (n=39)				
Positive (n=22)	7 (31.8)	4 (18.2)	2 (9.1)	13 (59.1)
Negative (n=17)	0 (0)	4 (23.5)	2 (11.8)	6 (35.3)

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.0005, \*\*\*\*\*p<0.0001 by the chi-square test.

<sup>a)</sup> Presence of both locoregional recurrence and distant metastasis.

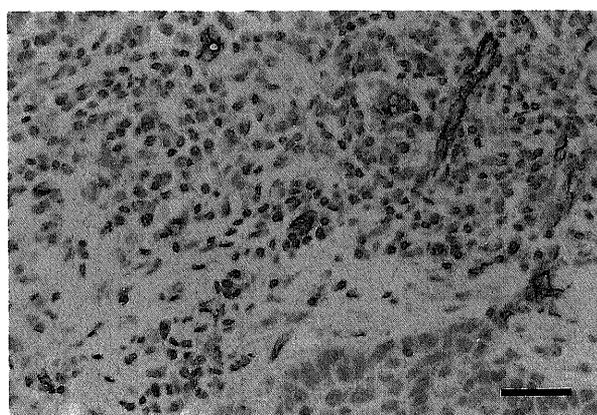


Fig. 3. Immunohistochemical staining for von Willbrand factor in a primary lung squamous cell carcinoma. The endothelial cells of microvessels in tumor tissue are stained. Scale bar indicates 50 μm.

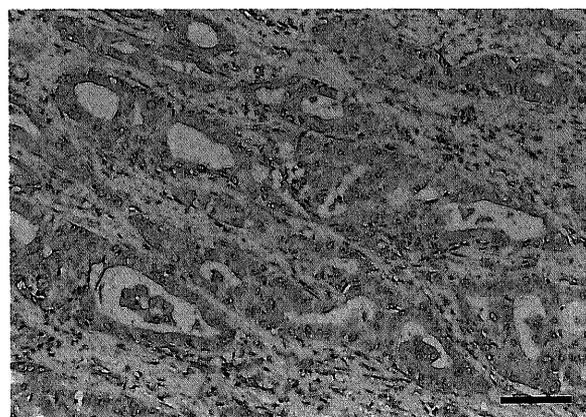


Fig. 5. Immunohistochemical staining for nm23-H1 protein in a primary lung adenocarcinoma. Cytoplasmic staining was positive in tumor cells. Scale bar indicates 100 μm.

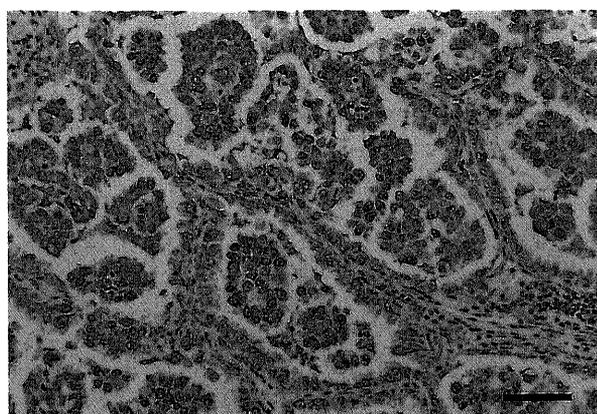


Fig. 4. Immunohistochemical staining for VEGF in a primary lung adenocarcinoma. Cytoplasmic staining was positive in tumor cells. Scale bar indicates 100 μm.

が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。T因子、N因子においても、因子進行とnm23-H1蛋白発現との間に有意差は認められなかった。M因子に関してもM0とM1の発現率に有意差は認められなかった。性別では男性で有意に陽性率が低い結果となった。

### 2. nm23-H1蛋白発現と予後との相関

nm23-H1蛋白発現別の無再発生存曲線を図6に示した。減弱群は陽性群に比し予後不良の傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった (p=0.0937)。nm23-H1蛋白発現と再発形式との相関を表8に示した。減弱群では91例中11例、12.1%が局所およびリンパ節転移による再発、16例17.6%が遠隔転移による再発をきたしていた。局所およびリンパ節転移、遠隔転移いずれにおいても陽性群との間に有意差は認められなかったが減弱群には遠隔転移による再発が多い傾向が認められた。

### 3. nm23-H1蛋白発現と骨髄中微小播種との相関

Table 5. Microvessel density and VEGF expression in tumors with or without bone marrow microdissemination and their correlation with pathological stages in 163 patients

Bone marrow microdissemination	Microvessel density ( $\bar{X} \pm SD$ )	VEGF expression (%)	
		Positive stain	Strongest stain
Total			
Positive <sup>a</sup> BMM (n=69)	50.8 ± 14.4	97.1	68.1
Negative BMM (n=94)	31.2 ± 12.6	85.1	25.5
Total (n=163)	39.5 ± 16.6	90.2	43.6
Stage I (n=86)			
Positive BMM (n=23)	48.3 ± 13.7	95.7	60.9
Negative BMM (n=63)	28.9 ± 10.0	79.4	34.8
Stage II (n=15)			
Positive BMM (n=7)	46.4 ± 12.8	14.3	85.7
Negative BMM (n=8)	28.3 ± 16.0	75.0	25.0
Stage III A (n=35)			
Positive BMM (n=21)	49.0 ± 11.6	100	76.2
Negative BMM (n=14)	40.1 ± 16.4	92.9	50.0
Stage III B and IV (n=27)			
Positive BMM (n=18)	57.9 ± 17.3	94.4	61.1
Negative BMM (n=9)	35.6 ± 14.1	100	44.4

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.0005, \*\*\*\*\*p<0.0001 by the Mann-Whitney's U or the chi-square test.

<sup>a</sup>BMM, Bone marrow microdissemination.

Table 6. Microvessel density and VEGF expression in tumors with or without bone marrow microdissemination stratified by pathological types in 163 patients

Bone marrow microdissemination	Microvessel density ( $\bar{X} \pm SD$ )	VEGF expression (%)	
		Positive stain	Strongest stain
Adenocarcinoma (n=102)			
Positive <sup>a</sup> BMM (n=37)	50.3 ± 13.9	94.6	67.6
Negative BMM (n=65)	29.9 ± 12.0	83.0	24.6
Squamous cell carcinoma (n=48)			
Positive BMM (n=25)	49.7 ± 13.9	100	72.0
Negative BMM (n=23)	31.8 ± 12.1	87.0	26.1
Adenowquamous carcinoma (n=6)			
Positive BMM (n=2)	57.5 ± 3.5	100	50.0
Negative BMM (n=4)	43.1 ± 19.0	100	50.0
Large cell carcinoma (n=7)			
Positive BMM (n=5)	57.9 ± 23.3	100	100
Negative BMM (n=2)	42.8 ± 18.6	100	0

\*p<0.0005, \*\*p<0.0001 by the Mann-Whitney's U or the chi-square test.

<sup>a</sup>BMM, Bone marrow microdissemination.

Table 7. Relationship between nm23-H1 protein expression and clinicopathological factors in 163 non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological factors	No. of cases	Nm23-H1 protein expression		p value
		Reduced	Positive	
Total	163	91 (55.8)	73 (44.2)	
Sex				
Male	114	70 (61.4)	44 (38.6)	p<0.05
Female	49	21 (42.9)	28 (57.1)	
Age				
< 65	63	33 (52.4)	30 (47.6)	p=0.77
≥ 65	100	58 (58.0)	42 (42.4)	
Pathological type				
Adenocarcinoma	102	53 (52.0)	49 (48.0)	p=0.37
Squamous cell carcinoma	48	29 (60.4)	19 (39.6)	
Others	13	9 (69.2)	4 (30.8)	
Pathological stage				
I	86	43 (50.0)	43 (50.0)	p=0.46
II	15	9 (60.0)	6 (40.0)	
III	59	37 (62.7)	22 (37.3)	
III B and IV	3	2 (66.7)	1 (33.3)	
T factor				
T1	71	37 (52.1)	34 (47.9)	p=0.22
T2	53	27 (50.9)	26 (49.1)	
T3	17	13 (76.5)	4 (23.5)	
T4	22	14 (63.6)	8 (36.4)	
N factor				
N0	104	55 (52.9)	49 (47.1)	p=0.79
N1	12	7 (58.3)	5 (41.7)	
N2	42	26 (61.9)	16 (38.1)	
N3	5	3 (60.0)	2 (40.0)	
M factor				
M0	160	89 (55.6)	71 (44.4)	p=0.70
M1	3	2 (66.7)	1 (33.3)	

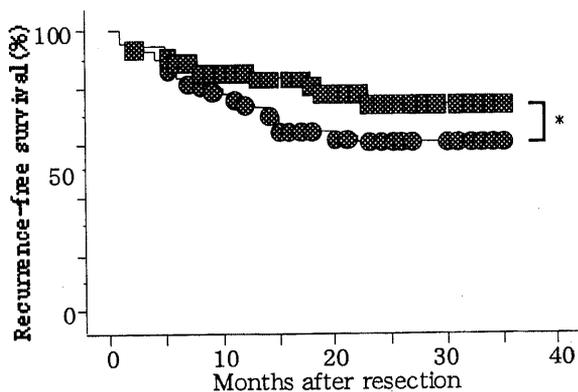


Fig. 6. Recurrence-free survival curves for the 163 primary non-small cell lung cancer patients. ●, Cases with reduced expression of nm23-H1 protein ; ■, Cases with positive nm23-H1 protein expression . \*p=0.0937 by generalized Wilcoxon's test

Table 8. Relationship between nm23-H1 protein expression and recurrence in 163 non-small cell lung cancer patients

Nm23-H1 protein expression	No. of cases (%) with recurrence	
	Locoregional	Distant metastasis
Total	17 (10.4)	23 (14.1)
Reduced (n=91)	11 (12.1)	16 (17.6)
Positive (n=72)	6 (8.3)	7 (9.7)

NS, not significant by the chi-square test.

Table 9. Relationship between nm23-H1 protein expression and bone marrow microdissemination in 163 non-small cell lung cancer patients

Bone marrow microdissemination	No. of cases	nm23-H1 protein expression		p value
		Reduced	Positive	
Positive	69	48 (69.6)	21 (30.4)	p=0.0023
Reduced	94	43 (45.7)	51 (54.3)	
Total	163	91 (55.8)	73 (44.2)	

nm23-H1 蛋白発現と骨髄中微小播種との相関を表9に示した。骨髄中微小播種陽性例における nm23-H1 蛋白発現陽性率は 30.4%であったのに対し、減弱例では 54.3%でありこの間には統計学的有意差が認められた ( $p=0.0023$ )。

### 考 察

上皮系悪性腫瘍は悪性新生物の大部分を占め、我が国においても増加の一途をたどっている<sup>1)</sup>。現在、上皮系悪性腫瘍の進行度は主に TNM 分類に基づく病期により決定されているが、肺癌、乳癌などの一部の癌腫においては、いわゆる早期の段階で十分根治的治療がなされたと考えられる症例であっても少なからず再発をきたし癌死する。その再発のほとんどは転移による再発であり、初回治療時には同定しえなかった潜在性の転移、すなわち骨髄、末梢血液、リンパ節などへの癌細胞の播種が示唆される。1981年、Dearnaleyら<sup>30)</sup>は骨髄細胞塗抹標本に対し、骨髄中には本来存在しない上皮性膜関連抗原 (epithelial membrane antigen, EMA) に対する免疫組織染色を行うことにより乳癌患者の骨髄液中から癌細胞を検出することに成功した。以後、上皮細胞に特異的なマーカーを用いて免疫組織学的に骨髄、末梢血、リンパ節から微量の癌細胞を検出する試みがなされるようになり、これまでに多くの報告がみられる<sup>3)</sup>。肺癌における骨髄中癌細胞検出に関する従来の報告においてはいずれも上皮細胞に特異的な CK をマーカーとする免疫組織学的手法を用いている。CK は上皮系細胞の骨格をなす細胞質内中間系フィラメントの一種で、現在まで 19 種類のサブクラスが確認されている<sup>35)36)</sup>。免疫組織学的に癌細胞を認識する際のマーカーとして CK 以外に報告されているものでは、上皮系細胞に特異的なものとして EMA が、癌細胞に特異的なものとして癌胎児性抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA) が挙げられる<sup>5)</sup>。しかし前者は感受性、特異性ともに CK に比し低く<sup>37)38)</sup>、後者は必ずしもすべての癌細胞で陽性ではない。

微量の癌細胞検出の方法として最近、免疫組織学的手法のほかに逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法を用いて、CK, EMA, CEA などの上皮系細胞あるいは癌細胞に特異的なマーカーを定量的に検出する方法や、p53 遺伝子や K-ras 遺伝子の変異を検出することにより癌細胞の存在を証明する方法が報告されている<sup>5)</sup>。しかしこれらの遺伝子変異はすべての癌細胞に認められる訳ではなく、また RT-PCR 法においては偽遺伝子の存在や微量の上皮細胞の混入による偽陽性も問題となる。微小癌細胞検出における癌細胞マーカーの選択、検出手技には今後改良、検討の余地があると思われるが、骨髄中微小癌細胞の検出においては現在のところ CK をマーカーとした免疫細胞化学的方法が最も確立された手技であると考えられる。Pantelら<sup>39)</sup>の検討では、非小細胞肺癌患者の

原発巣における CK18 の発現率は腺癌で 100%、扁平上皮癌で 90%であったのに加え、非担癌患者の骨髄では 215 例中 6 例 (2.8%) にしか偽陽性は認められず<sup>40)</sup>、本研究に用いた CK18 が骨髄中の癌細胞を検出する際の有用なマーカーであることを示した。本研究においても非担癌患者 56 例の骨髄細胞に対し担癌患者同様に染色を行ったところ、CK 陽性細胞は 3 例 (5.4%) に認められたに過ぎず、さらに腫瘍摘出時に作製した原発巣の捺印標本では全例で陽性であった。

これまでの報告における非小細胞肺癌患者の骨髄微小播種の陽性率は、臨床的に遠隔転移を認めない症例全体において、38.5-59.7%、I 期のみで 27.2-33.3% である<sup>40)-43)</sup>。本研究では I 期から IV 期全体で 42.4%、I 期のみで 33.6% と過去の報告とほぼ同様の結果を得た。さらに腺癌と扁平上皮癌の間に陽性率の差がなかったのも過去の報告同様であった。しかし、病期および T 因子、N 因子と骨髄中癌細胞陽性率の間に有意な相関を認めた報告はないのに対し、本研究では病期、T 因子、N 因子の進行とともに、陽性率は有意に上昇していた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.0005$ )。Maehara ら<sup>40)</sup>は胃癌組織における p53 と RB 蛋白発現を検討し、腫瘍増殖能と骨髄中微小播種との関連を調べた結果、この二者の間に相関は認められなかったと報告している。本研究においては T 因子進行に伴い骨髄微小播種の陽性率は上昇しており、腫瘍の増殖、進展とともに癌細胞の血中移行の確率が上昇することが示唆された。一般的に、血行性およびリンパ行性転移経路との脈絡に関しては解剖学的に末梢レベルでもリンパ管と静脈との吻合が存在し、理論的にはリンパ管-血管ネットワークを通じて癌細胞は全身を循環すると考えられている<sup>41)</sup>。本研究では N 因子進行に伴い骨髄微小転移陽性率は上昇しており、癌細胞の骨髄への移行におけるリンパ経路の関与が示唆された。性別では男性が女性に比べ陽性率が高い結果となったが、これは女性群に比し男性群に進行例が多い傾向を認めた ( $p=0.152$ ) 為と考えられた。

骨髄微小転移の成立には少なくとも癌細胞の原発巣から骨髄までの移行、すなわち原発巣からの離脱、組織への浸潤、脈管内への侵入、血流への移行という多段階過程を経ることが必要となる。このうち癌細胞の脈管内への侵入に関しては詳細な電顕的研究がなされ、大別して癌細胞の浸潤性増殖が主体をなす場合と腫瘍血管と癌細胞の相互作用が主体をなす場合とがあり、後者は主に腫瘍血管新生に依存すると考えられている<sup>42)</sup>。腫瘍組織において既存の血管より無秩序に新たな血管が誘導、増生する現象である血管新生は、腫瘍の増殖および進展を規定する重要な因子であると同時に、上述のごとく転移経路としての重要性も指摘されている。肺癌においては 1992 年に Macchiarini ら<sup>11)</sup>が肺癌組織内の血管密度と遠隔転移との相関性を報告して以来、血管密度と予後との相関を認める複数の報

告<sup>12)~14)</sup>がなされ、肺癌組織における新生血管が重要な転移経路となっている可能性が指摘されている。骨髄中微小播種と腫瘍血管密度との相関を検討した報告には、胃癌におけるMaeharaら<sup>43)</sup>、乳癌におけるFoxら<sup>44)</sup>の報告があるがいずれも骨髄中微小播種陽性例は陰性例に比し有意に高い微小血管密度を有していたと報告している。本研究は肺癌においてはじめて骨髄中微小播種成立における腫瘍血管新生の関与を示した。

腫瘍組織での血管新生を誘導する因子のうち、VEGFは現在最も強力な血管内皮増殖作用を有するとされ、血管新生を介して癌の生物学的悪性を反映している可能性が示されている。非小細胞肺癌においてもVEGF発現は微小血管密度と正の相関を示し<sup>15)16)</sup>、強発現例は予後不良であることが知られている<sup>17)</sup>。本研究においても原発巣におけるVEGF発現強陽性例の微小血管密度は陰性例に比べ有意に高値であった。さらに骨髄中微小播種陽性例では組織型、病期を問わずVEGF強陽性率が高い傾向を示し、骨髄微小播種成立におけるVEGFの関与が示唆された。

実験的に流血中に播種された癌細胞が実際に遠隔転移巣を形成する確率は0.01%以下と低く、その大部分は48時間以内に変性、死滅することが確認されている<sup>45)46)</sup>。血中癌細胞の自然消滅の要因として生体の液性免疫機構や細胞性免疫機構による細胞障害、血球や血管内皮細胞との衝突などの物理的障害に加え、血液に対する腫瘍細胞の親和性の低さが考えられる。最近Putzら<sup>47)</sup>は肺癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌患者の骨髄中癌細胞から9種類の細胞株を樹立し、骨髄中癌細胞の生物学的形質について報告している。それによると興味深いことに全細胞株においてCKやE-カドヘリンなどの上皮細胞特異的な抗原に加え、通常間葉系細胞に特異的な抗原であるはずのビメンチンの発現が確認された。生体外実験系においては上皮細胞の間葉系細胞への形質転化は細胞の増殖能、運動能亢進をもたらすことが報告されており、骨髄中癌細胞におけるビメンチン発現は、骨髄中癌細胞が潜在的に悪性形質を保持していることを示唆するとともに、微小レベルでの播種細胞が骨髄に対する親和性を有する原因となる可能性が示された。

一方Pantelら<sup>48)</sup>は細胞増殖能のマーカーであるKi-67およびp120とCKに対する二重免疫染色を行い、骨髄中癌細胞の増殖能を検討した結果、Ki-67、p120ともに標識率は低く、骨髄中癌細胞の自律的な増殖能は低いと報告した。これらのことから骨髄中癌細胞は潜在的転移能を有するものの、いわゆる休眠状態にあることが推測される。骨髄中癌細胞がいかんして休眠状態から離脱し、増殖能を獲得し、転移巣を形成するかの詳細な機序に関しては今後の検討を待たなければならない。しかし過去の報告において、乳癌<sup>49)50)</sup>、胃癌<sup>38)</sup>、大腸癌<sup>51)</sup>など多くの癌で骨髄中微小播種陽性例の予後が陰性例に比し有意に不良であることが確認されており、骨髄中微小播種は遠隔転移の前段階ないし転移細胞をプールするリザーバーととらえることができる。原発性非小細胞肺癌における予後に関する検討では、Pantelら<sup>48)</sup>は139例の検討から、リンパ節転移陰性例において、骨髄中微小播種陽性例は陰性例より無再発生存期間において有意差を生じ、骨髄中微小播種の有無はT因子とともに独立した予後規定因子となることを示した。さらにCoteら<sup>7)</sup>は病理病期Ⅰ期からⅢ期までの43例の検討で、生存率においては骨髄中微小播種陽性例と陰性例との間に統計学的有意差は認められないものの、無再発生存期間においては2群間に有意差が認めら

れ、Ⅰ期とⅡ期に限った場合、その差はより明確であったと報告した。Ohgamiら<sup>8)</sup>も39例の検討からCoteら<sup>7)</sup>とはほぼ同様の結果を報告している。本研究では治癒切除例を対象に予後との関係を検討したが、全症例、Ⅰ期およびⅢA期いずれの母集団においても骨髄中微小播種陽性例は陰性例に比べ予後不良であった。さらに多変量解析の結果、骨髄中微小播種はT因子およびN因子とともに独立した予後因子となることが明らかとなった。骨髄中微小播種と術後再発形式について、Pantelら<sup>48)</sup>はリンパ節転移陰性で骨髄中癌細胞陽性の12例中、4例が遠隔再発、3例が局所再発、2例が遠隔および局所再発をきたしたと報告している。一方Ohgamiら<sup>8)</sup>は、病理病期がⅠ期およびⅡ期の骨髄中微小播種陽性例8例のうち、再発をきたした4例は全て遠隔再発であったと報告している。本研究においては骨髄中微小播種陽性例のうち再発をきたした24例中12例(局所再発と遠隔再発も含めると14例)が遠隔再発であったが、Ⅰ期においては遠隔転移による再発が多く、ⅢA期においてはむしろ局所およびリンパ節再発を多くきたしており、病期により骨髄中微小播種陽性例の再発形式が異なる点は興味深い結果と思われた。本研究の結果から、骨髄中微小播種は遠隔転移による再発の指標であるだけでなく、局所進行癌においては局所再発の指標とも成りうることを示唆された。

Nm23はK-1735マウスメラノーマ細胞株よりディファレンシャルスクリーニング法により単離された遺伝子<sup>19)</sup>で、低転移性K-1735株に比べ、高転移株において発現減弱を示し、さらにK-1735高転移細胞株<sup>20)</sup>やB16マウスメラノーマ高転移細胞株<sup>21)</sup>への遺伝子導入により、転移能が抑制されることが報告されている。さらにnm23遺伝子産物はヌクレオチド二リン酸キナーゼと同一であることが確認される<sup>52)</sup>とともにNDPキナーゼ活性だけでなく、形態形成<sup>52)</sup>、転写調節<sup>53)54)</sup>などの活性を持つことが報告されている。これらの分子機能と転移抑制機序との関係は未だ不明確だが、シグナル伝達<sup>20)</sup>、運動能<sup>55)</sup>、基底膜形成を介した増殖能<sup>56)</sup>などへの影響が指摘されている。nm23にはnm23-H1とnm23-H2の2つのアイソフォームが存在する。ヒト乳癌高転移性細胞を用いた実験系では、nm23-H1は転移能を抑制するが、nm23-H2にはその作用はなく<sup>22)</sup>、nm23の転移抑制におけるアイソフォームの特異性が示されている。ヒト癌における転移能とnm23発現との関係については、これまでに多くの報告がなされてきた。Nm23発現と癌転移能との間に負の相関関係が認められるものとして悪性黒色腫<sup>23)</sup>、乳癌<sup>24)~26)</sup>、大腸癌<sup>27)28)</sup>、肝細胞癌<sup>29)</sup>が報告されている。非小細胞肺癌に関して、Laiら<sup>57)</sup>は病理病期Ⅰ期症例を対象にした免疫組織学的検討で、nm23-H1蛋白発現と遠隔再発と間に負の相関が認められたと報告した。しかし腺癌<sup>58)</sup>、扁平上皮癌<sup>59)~61)</sup>においてnm23-H1蛋白発現は腫瘍の進展と正の相関を示すとする報告もみられ、非小細胞肺癌におけるnm23-H1の転移抑制遺伝子としての発現意義は未だ明らかではない。本研究においてはT因子、N因子、病理病期のいずれの因子間においてもnm23-H1蛋白発現レベルに差を認めず、nm23-H1の腫瘍進展やリンパ節転移への直接的関与は否定的と思われた。一方、統計学的有意差は得られなかったもののnm23-H1蛋白発現減弱例は遠隔再発をきたしやすい傾向が示され、この点はLaiら<sup>57)</sup>の結果と同様であった。しかし、無再発生存期間で評価した場合、有意差を得るには至らず、nm23-H1の予後因子としての意義は確認できなかった。ただし、本研究における経過観察期間は最長35ヶ月と短く、

今後さらなる検討が必要と考えられた。

Nm23-H1 蛋白発現と骨髄中微小播種との相関を検討した報告はまだなく、本研究における nm23-H1 蛋白の発現性と骨髄中微小播種との相関性は新たな知見といえる。前述のごとく nm23-H1 の転移抑制機序については不明な点が多いが、横崎ら<sup>18)</sup>は、腫瘍組織における同蛋白発現の不均一性に着目し、転移を起こす細胞は nm23-H1 発現レベルが减弱したクローンである可能性が高いと考察している。本研究の結果からも、このような細胞が選択的に比較的早期に原発巣から離脱し、浸潤および血管内侵入を果たし、骨髄中に播種する可能性が考慮された。Nm23-H1 の発現性に関する今回の結果は、骨髄中微小癌細胞の存在が単なる癌細胞の捕捉ではなく、原発巣における腫瘍新生血管を経路とした転移初期段階である可能性を支持するものであると考える。

### 結 論

原発性非小細胞肺癌患者の203例を対象に、骨髄中微小癌細胞の検出を行い、このうち治癒切除例157例に対し再発、予後との関係を検討した。また163例の原発巣における微小血管密度、VEGF発現、nm23-H1蛋白発現を免疫組織学的に検討し、骨髄中微小播種との相関を探り、以下の結論を得た。

1. 全症例での骨髄中微小癌細胞検出率は、203例中86例(42.4%)であった。
2. 骨髄中微小癌細胞検出率と組織型の間に相関は認めなかった。
3. 骨髄中微小癌細胞検出率は、T因子、N因子および病理病期の進行とともに有意に上昇していた。
4. 骨髄微小播種陽性例の腫瘍内微小血管密度は陰性例に比し有意に高値であった。
5. 骨髄中微小播種陽性例におけるVEGF発現率は陰性例に比し有意に高率であった。
6. 無再発生存期間を用いた検討では、骨髄中微小播種陽性例の予後は陰性例に比し有意に不良であり、骨髄中微小播種は独立した予後不良因子となることが示された。とくに病理学的病期I期においては骨髄中微小播種は遠隔再発の指標となる可能性が示唆された。
7. Nm23-H1蛋白発現の陽性率は全体として163例中73例(44.2%)で、性別を除く各臨床病理学的諸因子との有意な相関は確認できなかった。
8. Nm23-H1蛋白発現減弱例は陽性例に比し予後不良の傾向があり、遠隔再発が多い傾向が認められた。
9. Nm23-H1蛋白発現減弱例においては骨髄中微小播種陽性率が有意に高かった。

以上の結果より、原発性非小細胞肺癌においては、臨床的に遠隔転移を認めない場合でも、遠隔転移の前段階として骨髄中微小播種を少なからず生じていることが明らかとなった。従来の臨床的、病理組織学的診断による進行度評価に加え、本研究で示された骨髄微小播種診断の結果を加味することで、より正確な予後判定が可能になると考えられた。

### 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邊洋宇教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に際し、終始直接の御指導を賜りました太田安彦博士に深謝致します。さらに病理標本作製にご協力を惜しまれなかった田中洋子氏に深謝致します。また、

本研究の遂行に際し、御協力を頂きました金沢大学外科学第一講座の皆様、石川県立中央病院呼吸器外科佐藤日出夫先生、同病理検査部および病歴管理部の皆様にご心から感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第99回日本外科学会総会(福岡, 1999)、第40回日本肺癌学会総会(札幌, 1999)において発表した。

### 文 献

- 1) 財団法人厚生統計協会編. 国民衛生の動向. 厚生指標臨時増刊号 46: 48-52, 429-430
- 2) Naruke T, Goya T, Tsuchiya R, Suemasu K. Prognosis and survival in resected lung carcinoma based on the new international staging system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 96: 440-447, 1988
- 3) Little AG, DeMeester TR, Ferguson MK, Skinner DB, Hoffman PC, Consuelo Skosey RN, Blough RR, Golomb HM. Modified stage I (T1N0M0, T2N0M0), non-small cell lung cancer: treatment results, recurrence patterns, and adjuvant immunotherapy. *Surgery* 100: 621-627, 1986
- 4) Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, Ginsberg RJ. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109: 120-129, 1995
- 5) Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91: 1113-1124, 1999
- 6) Pantel K, Izbicki JR, Passilick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347: 649-653, 1996
- 7) Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SR, Harvey J, Chen SC, Sherrod AE, Groshen S, Taylor CR. Detection of occult bone marrow micrometastasis in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 222: 415-425, 1995
- 8) Ohgami A, Mitudomi T, Sugio M, Tsuda T, Oyama T, Nishida K, Osaki T, Yasumoto K. Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 64: 363-367, 1997
- 9) Folkman J. Tumor angiogenesis; Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971
- 10) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6, 1990
- 11) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340: 145-146, 1992
- 12) Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, Nakajima I, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 74: 2245-2250, 1994
- 13) Matsuyama K, Chiba Y, Sasaki M, Tanaka H, Muraoka R, Tanigawa N. Tumor angiogenesis as a prognostic marker in operable non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 65: 1405-1409, 1998
- 14) Shibusa T, Shijubo N, Abe S. Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung

- adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 4: 1483-1487, 1998
- 15) Mattern J, Koomagi R, Volm M. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 6: 1059-1062, 1995
- 16) Ohta Y, Watanabe Y, Murakami S, Oda M, Hayashi Y, Nonomura A, Endo Y, Sasaki T. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2: 1411-6, 1996
- 17) Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M, Mussi A, Angeletti CA, Bevilacqua G. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 3: 861-865, 1997
- 18) 横崎 宏, 田原榮一. 転移能に関与する遺伝子とその制御. 癌化のメカニズムを解く (横田淳編), 第1版, 96-102頁, 羊土社, 東京, 1998
- 19) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge J, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 80: 200-204, 1988
- 20) Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IMK, Liotta LA, Steeg PS. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 65: 25-35, 1991
- 21) Baba H, Urano T, Okada K, Furukawa K, Nakayama E, Takana H, Iwasaki K, Shiku H. Two isotypes of murine nm23/nucleoside diphosphate kinase, nm23-M1 and nm23-M2, are involved in metastatic suppression of a murine melanoma line. *Cancer Res* 55: 1977-1981, 1995
- 22) Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effect on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene*, 8: 2325-2333, 1993
- 23) Florenes VA, Aamdal S, Myklebost O, Madelandsmo GM, Bruland OS, Fodstad O. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progression. *Cancer Res* 52: 6088-6091, 1992
- 24) Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating duct breast carcinoma with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 49: 5185-5190, 1989
- 25) Hirayama R, Sawai S, Takagi Y, Mishima Y, Kimura N, Shimada N, Esaki Y, Kurashima C, Utsuyama M, Hirokawa K. Positive relationship between expression of anti-metastatic factor (nm23 gene product or nucleotide diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 83: 1249-1250, 1991
- 26) Hennessy C, Henry J, May F, Westly B, Angus B, Lennard T. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: An association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 83: 281-285, 1991
- 27) Yamaguchi A, Urano T, Fushida S. Inverse association of nm23-H1 expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer* 68: 1020-1024, 1993
- 28) Haut M, Steeg PS, Willson JKV, Markowitz SD. Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasmas and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 83: 712-716, 1991
- 29) Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K. Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleotide diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Natl Cancer Inst* 84: 1349-1354, 1992
- 30) 日本肺癌学会編. 臨床・病理 肺癌取り扱い規約, 改訂第4版. 23-30頁, 金原出版, 東京, 1995
- 31) Ponder BA, Wilkinson MM. Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29: 981-984, 1981
- 32) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32: 219-229, 1984
- 33) Weidner N, Semple JP, Welch WR. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 34) Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clinck HM. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 44: 85-90, 1981
- 35) Moll R, Frank WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982
- 36) Debus E, Weber K, Osborn M. Monoclonal antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues. *EMBO J* 1: 1641-1647, 1982
- 37) Ghosh AK, Erber WN, Hatton CSR, O'Connor NTJ, Falini B, Osborn M, Mason DY. Detection of metastatic tumor cells in routine bone marrow smears by immuno-alkaline phosphatase labeling with monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 61: 21-30, 1985
- 38) Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmuller G. Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 27: 1461-1465, 1991
- 39) Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlik B, Karg O, Thetter O, Riethmuller G. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 53: 1027-1031, 1993
- 40) Maehara Y, Yamamoto M, Oda S, Baba H, Kusumoto T, Ohno S. Cytokeratin-positive cells in bone marrow for identifying distant metastasis of gastric cancer. *Br J Cancer* 73: 83-87, 1996
- 41) 川口隆憲, 杉野 隆, 五十嵐誠治. 概説ーリンパ系癌進展ー. 図説臨床 癌シリーズ No. 30. 癌転移の診断と治療 (末舛恵一編), 第1版, 30-33頁, メジカルビュー, 東京, 1990

- 42) 川口隆憲, 五十嵐誠治, 杉野 隆. 癌転移のメカニズム: 電顕的研究. 日本臨床 45: 1395-1407, 1987
- 43) Maehara Y, Hasuda S, Abe T, Oki E, Kakeji Y, Ohno S, Sugimachi K. Tumor angiogenesis and micrometastasis in bone marrow of patients with early gastric cancer. *Clin Cancer Res* 4: 2129-2134, 1998
- 44) Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastasis in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 89: 1044-1049, 1997
- 45) Fidler IJ. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-782, 1970
- 46) Reid GH, Gibbins JR. Fate of cultured cells after injection into the circulation of syngeneic animals. *Cancer Res* 39: 4724-4731, 1979
- 47) Putz E, Witter K, Offner S, Stasiak P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmuller G, Pantel K. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 59: 241-248, 1999
- 48) Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindermann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85: 1419-1424, 1993
- 49) Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastasis. *J Clin Oncol* 9: 1749-1756, 1991
- 50) Mansi JL, Berger U, Easton D, McDonnell T, Redding WH, Gazet JC, McKinna A, Powles TJ, Coombes RC. Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as early predictor of bone metastasis. *Br Med J* 295: 1093-1096, 1987
- 51) Limdemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340: 685-688, 1992
- 52) Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 60: 933-940, 1990
- 53) Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA. Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* 261: 478-480, 1993
- 54) Postel EH, Ferrone CA. Nucleoside diphosphate kinase enzyme activity of nm23-H2/PuF is not required for its DNA binding and in vitro transcriptional functions. *J Biol Chem* 269: 8627-8630, 1994
- 55) Kantor JD, McCormic B, Steeg PS, Zetter BR. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res* 53: 1971-1973, 1993
- 56) Hsu S, Huang F, Wang L, Banerjee S, Winawer S, Friedman E. The role of nm23 in transforming growth factor beta 1-mediated adherence and growth arrest. *Cell Growth Differ* 5: 909-917, 1994
- 57) Lai WW, Wu MH, Yan JJ, Chen FF. Immunohistochemical analysis of nm23-H1 in stage I non-small cell lung cancer: a useful marker in prediction of metastases. *Ann Thorac Surg* 62: 1500-1504, 1996
- 58) Ozeki Y, Takishima K, Mamiya G. Immunohistochemical analysis of nm23/NDP kinase expression in human lung adenocarcinoma: association with tumor progression in clara cell type. *Jpn J Cancer Res* 85: 840-846, 1994
- 59) Bosner MH, Pavelic K, Krizanac S, Slobodnjak Z, Pavelic J. Squamous cell lung carcinomas: the role of nm23-H1 gene. *J Mol Med* 75: 609-613, 1997
- 60) Gazzeri S, Brambilla E, Negoescu A, Thoraval D, Veron M, Moro D, Brambilla C. Overexpression of Nucleoside diphosphate/kinase A/nm23-H1 protein in human lung tumors: association with tumor progression in squamous carcinoma. *Lab Invest* 74: 158-167, 1996
- 61) Huwer H, Engel M, Welter C, Dooley S, Kalweit G, Feindt P, Gams E. Squamous cell carcinoma of the lung Does the nm23 gene expression correlate to the tumor stage? *Thorac Cardiovasc Surg* 42: 298-301, 1994

**Bone Marrow Microdissemination in Patients with Primary Non-small Cell Lung Cancer — its Significance as an Indicator of Metastasis and Discussions on Pathway of Dissemination —** Zensei Nozaki, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 654 — 667 (1999)

**Key words** non-small cell lung cancer, bone marrow micrometastasis, microvessel density, vascular endothelial growth factor, nm23-H1 protein

#### Abstract

To evaluate the significance of bone marrow microdissemination in primary non-small cell lung cancer patients, 203 bone marrow specimens from cancer patients were studied with immunocytochemical staining for cytokeratin, a specific marker for epithelial cells. In addition, to evaluate the correlation between tumor angiogenesis and bone marrow microdissemination, microvessel density (MVD), and VEGF expression in the primary tumors were examined. Furthermore, to evaluate nm23-H1 as an antimetastatic gene in non-small cell lung cancer, nm23-H1 protein expression in the primary tumors was examined immunohistochemically. The incidence of bone marrow microdissemination was 42.4% in total. There was no difference in the ratio of bone marrow microdissemination according to the histopathological type of carcinoma. The positivity of bone marrow microdissemination was correlated to T factor ( $p < 0.005$ ), N factor ( $p < 0.0005$ ), and pathological stage ( $p < 0.001$ ). In 157 patients who underwent curative resection, the recurrence-free survival rate of a bone marrow microdissemination-positive group was significantly lower than that of a bone marrow microdissemination-negative group in total, in the subset of stage I patients and in that of stage III A patients ( $p < 0.0001$ ,  $p=0.0003$ ,  $p=0.0133$ , respectively). Furthermore, patients with bone marrow microdissemination had tendency to have distant metastases. The MVD and the positivity of VEGF expression of patients with bone marrow microdissemination was significantly higher than those of patients without bone marrow microdissemination (both  $p < 0.0001$ ). These results suggest that tumor angiogenesis mediated by VEGF is closely related to the establishment of bone marrow microdissemination. Expression of nm23-H1 protein was detected in 44.2% of the 163 patients examined. There appeared to be no correlation between the positivity of nm23-H1 protein and the pathological types of carcinoma, pathological stage, T factor, N factor, and M factor. However, the patients with reduced expression of nm23-H1 protein frequently exhibited bone marrow microdissemination with statistical significance ( $p=0.0023$ ). The significance of nm23-H1 protein expression as a prognostic factor was not defined in this study, but patients with reduced expression of nm23-H1 protein have a tendency to experience recurrence by distant metastasis. These results indicate that bone marrow microdissemination is useful in predicting the recurrence after surgery, especially hematogenous distant metastasis, and that tumor angiogenesis mediated by VEGF and reduction of nm23-H1 protein expression in primary lesions might be involved in the establishment of bone marrow microdissemination.