Expression of Cell Adhesion Molecule CD44 in Primary and Metastatic Lung Tumors : Correlation with p53 Protein Expression and K-ras Point Mutation

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/2297/9296

金沢大学十全医学会雑誌　第106巻　第2号　214－235（1997）

原発性・転移性肺腫瘍における接着分子CD44発現に関する研究
－p53蛋白発現とK-ras点突然変異との関連－

金沢大学医学部医学科外科学第1講座（主任：渡辺洋宇教授）
春　原　哲　之

CD44分子は選択的スプライシング機構により，標準型CD44 (CD44 standard form, CD44s) と変異型 CD44 (CD44 variant form, CD44v6) を発現し，癌転移に関連しているといわれている．原発性非小細胞肺癌116例，転移性肺腫瘍90例を対象にCD44s，CD44v6，p53蛋白発現を免疫組織染色法を用い測定し，また，K-ras 点突然変異（コドン12）の有無をドットブロットハイブリダイゼーション法を行い検索し，各因子間の相関，臨床病理学的因子との関連を検討した．原発性非小細胞肺癌における各因子の陽性率はCD44s，34.5% (腺癌，30.9%，扁平上皮癌，39.6%)，CD44v6，60.3% (腺癌，44.1%，扁平上皮癌，83.3%)，p53蛋白，49.1% (腺癌，38.2%，扁平上皮癌，64.6%)，K-ras 点突然変異33.0% (腺癌，42.6%，扁平上皮癌，20.0%) であった．CD44s 発現は高分化型で有意に高く ($p<0.05$)，CD44v6発現は腺癌に比べ扁平上皮癌で有意に高かった ($p<0.05$)．CD44v6 の発現とリンパ節転移，遠隔転移の有無の相関は認められなかったが，腺癌ではp53蛋白陰性症例，K-ras 野生型症例の両者で，CD44s 発現はリンパ節転移陰性症例，遠隔転移のない症例で有意に高かった ($p<0.05$)．K-ras 点突然変異とCD44s，CD44v6 発現には相関は認められなかった．治癒切除症例74例の検討では，CD44s 発現の低い症例の予後は有意に不良であった ($p<0.05$)．転移性肺腫瘍における各因子の陽性率は CD44s，24.4% (上皮性腫瘍，34.7%，非上皮性腫瘍，12.2%)，CD44v6，35.6% (上皮性腫瘍，49.0%，非上皮性腫瘍，19.5%)，p53蛋白，35.6% (上皮性腫瘍，34.7%，非上皮性腫瘍，36.6%)，K-ras 点突然変異，33.3% (上皮性腫瘍，47.7%，非上皮性腫瘍，16.2%) であった．CD44s，CD44v6 発現ともに非上皮性腫瘍肺転移巣に比べ上皮性腫瘍肺転移巣で有意に高かった ($p<0.05$)．特に大腸・直腸癌，頭頸部癌の肺転移巣で発現が高く，反面，腎癌，軟部組織悪性腫瘍，骨．軟骨悪性腫瘍の肺転移巣で発現が低かった．K-ras 点突然変異の頻度は非上皮性腫瘍腫瘍肺転移巣に比べ上皮性腫瘍肺転移巣で有意に高く ($p<0.05$)，特に大腸・直腸癌肺転移巣で高かった．無再発生存率は，上皮性腫瘍に比べ非上皮性腫瘍で有意に低く ($p<0.05$)，非上皮性腫瘍ではp53蛋白発現陽性例で有意に低かった ($p<0.05$)．原発巣別にみると大腸・直腸癌では，CD44s陽性例で有意に低く ($p<0.05$)，軟部組織悪性腫瘍，骨・軟骨悪性腫瘍ではp53蛋白陽性例で有意に低かった ($p<0.05$)．CD44v6発現と無再発生存率の間に相関はなかった．以上の結果から，原発性肺腺癌においては，p53遺伝子異常，K-ras 点突然変異のない症例では CD44s 発現は転移を抑制する働きをしていることが示唆され，原発性非小細胞肺癌ではCD44s，CD44v6 の発現は予後予測因子になりうることが示唆された．一方，転移性肺腫瘍では，非上皮性腫瘍でp53蛋白の発現が，大腸・直腸癌で CD44s 発現が肺転移の発生に関与している可能性が示唆された．

Key words　non-small cell lung cancer, metastatic lung tumor, CD44, p53 protein, K-ras

悪性腫瘍の大きな特徴のひとつに転移能の獲得があげられる．転移は悪性腫瘍の治療を困難なものにしている大きな要因であり，複雑な生物現象の結果として成立する転移のメカニズムを解明するため，多くの研究が行われてきた．最近では，分子生物学の急激な進歩によりこの分野の研究も大きな進展をみせており，特に，接着分子群と癌転移の関連についてさまざまな知見が集積されつつある．接着分子は構造上の類似性からインテグリンファミリー，カドヘリンファミリー，セレクチンファミリー，イムノグロブリンスパーファミリー，CD44ファミリーの5種類に分類され，その機能は多様である．転移との関連としては，食道癌，胃癌，乳癌におけるカドヘリンの発現減弱およびカテニンの異常[1]，大腸癌，肺癌における糖鎖抗原とセレクチンの関連[2)3)]，肺癌，腎癌，大腸癌におけるインテグリン[4)-6)]，などが報告されている．

CD44は接着分子のひとつであり，その遺伝子には少なくとも20のエクソンが認められる．mRNAの成熟過程で，エクソン1～5 (1s～5s) とエクソン16～20 (6s～10S) が選択的スプライシングにより発現した糖蛋白質が標準型CD44 (CD44 standard form, CD44s) である．CD44sでは発現されないエクソン6～15 (1v～10v) が選択的スプライシングによりエクソン5sと6sの間に挿入され発現した分子が変異型CD44 (CD44 variant form, CD44v) であり，その中でも特にエクソン6vが挿入され発現した分子がCD44v6と呼ばれ，エクソン8v～10vが挿入され発現した分子は上皮型CD44 (CD44 epithelial form, CD44E) と呼ばれる[7)]．1991年ラット膵癌由来細胞株において，転移能を有する細胞株と転移能を有さない細胞株の遺伝子解析にて，転移能を

平成8年12月9日受付，平成9年2月4日受理

Abbreviations：CD44E, CD44 epithelial form; CD44s, CD44 standard form; CD44v, CD44 variant form; CD44v6, CD44 variant form expressed exon v6; DAB, 3,31-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DFS, disease-free survival; PBS, phosphate-buffered saline; 3生率，3年生存率；5生率，5年生存率

有する細胞株にはCD44分子の変異が見られ，この変異型CD44を転移能がない細胞株に導入すると高頻度に肺転移巣を形成することが報告された[8]．以来，CD44分子と転移との関連が注目され，特にエクソン6vの挿入された変異型CD44 (CD44 variant form expressed exon 6, CD44v6) と転移との関連が種々の悪性腫瘍で報告された．しかし，原発性非小細胞肺癌においてはいまだCD44と転移との関係は明白でなく予後に及ぼす影響も未知である．また，細胞株を用いた実験においてCD44の発現を制御している因子として癌遺伝子rasがあげられる[9]．ras 遺伝子は点突然変異により活性化し，さまざまな正常細胞に悪性形質を付与して転移能を獲得させ，悪性腫瘍の転移能を増強する[10)-12)]．また，癌抑制遺伝子p53の不活化によるp53蛋白過剰発現とともに，原発性非小細胞肺癌において発癌機構に重要な役割を担っていると考えられている[13)-17)]．しかしながら，原発性非小細胞肺癌におけるras遺伝子活性化，p53遺伝子不活化とCD44 発現の3者の関連についての報告はない．

悪性腫瘍の転移において，肺に転移しやすい腫瘍，肝に転移しやすい腫瘍，骨に転移しやすい腫瘍，リンパ節に転移しやすい腫瘍など，転移の臓器特異性があることが知られている[18]．マウスを用いた実験では，肺に転移性を有する細胞株とCD44の発現の関連性が報告され[19)-21)]，CD44と臓器特異的転移の関連が示唆されている．臨床的にみると転移性肺腫瘍において，上皮性腫瘍の肺転移に比べ，非上皮性腫瘍の肺転移は２次的な所属リンパ節転移をきたしにくく[22]，切除後の予後も非上皮性腫瘍で不良であるという事実がある[23]．この相違を，生物学的アプローチを用い明らかにした報告は少なく，転移性肺腫瘍について CD44 の発現を検索した報告も極めて少ない[24]．

本研究は，原発性非小細胞肺癌における CD44s と CD44v6 の発現を検索し，臨床病理学的因子，転移および予後との関連を明らかにし，さらにK-ras点突然変異と CD44 発現，p53蛋白発現と CD44 発現に関連があるかどうかを検討した．また，転移性肺腫瘍について同様な検討を行い，これを上皮性腫瘍肺転移巣と非上皮性腫瘍肺転移巣に分け検討を行うことにより，両者の生物学的相違を明らかにし，肺に形成される悪性腫瘍における CD44，p53蛋白，K-ras 点突然変異の役割を明らかにすることを目的とした．

対象および方法

Ⅰ．対象

1988年～1991年の期間に金沢大学医学部第1外科で切除され

Table 1. Clinicopathological findings in 116 primary non-small cell lung cancer cases

Clinicopathological findings	No. (%) of cases		
	All	Adenoca.	Epidermoid ca.
No. of cases examined	116	68 (58.6)	48 (41.4)
Age	66.4±10.4[a)]	64.8±11.3[a)]	68.6±8.3[a)]
Sex			
Male	84 (72.4)	44 (64.7)	40 (83.3)
Female	32 (27.6)	24 (35.3)	8 (16.7)*
Stage			
Ⅰ	32 (27.6)	23 (33.8)	9 (18.8)
Ⅱ	15 (12.9)	8 (11.8)	7 (14.6)
ⅢA	33 (28.4)	15 (22.1)	18 (37.5)
ⅢB	14 (12.1)	8 (11.8)	6 (12.5)
Ⅳ	22 (19.0)	14 (20.6)	8 (16.7)
T facter			
T1	30 (25.9)	24 (35.3)	6 (12.5)*
T2	51 (44.0)	28 (41.2)	23 (47.9)
T3	16 (13.8)	6 (8.8)	10 (20.8)
T4	19 (16.4)	10 (14.7)	9 (18.8)
N facter			
N0	51 (44.0)	30 (44.1)	21 (43.8)
N1～N3	65 (56.0)	38 (55.9)	27 (56.3)
M facter			
M0	96 (82.8)	56 (82.4)	40 (83.3)
M1	20 (17.2)	12 (17.6)	8 (16.7)
Differentiation			
Well	44 (37.9)	35 (51.5)	9 (18.8)*
Moderately	43 (37.1)	18 (26.5)	25 (52.1)*
Poorly	29 (25.0)	15 (22.1)	14 (29.2)

Adenoca., adenocarcinoma ; epidermoid ca., epidermoid carcinoma.
[a)] Years. $\bar{x}$±SD.
* $p<0.05$.

た原発性非小細胞肺癌116例，および1981年～1996年の期間に同施設で切除された転移性肺腫瘍90例を対象とし，ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして金沢大学医学部付属病院中央検査部に保存されているものを用いた．原発性非小細胞肺癌の組織学的内訳は腺癌68例（平均年齢64.8歳，男性44例，女性24例），扁平上皮癌48例（平均年齢68.6歳，男性40例，女性8例）であり，腺癌に比べ扁平上皮癌において女性が有意に少なかった．肺癌取扱い規約[25]による病期分類の内訳は，腺癌ではⅠ期23例，Ⅱ期8例，ⅢA期15例，ⅢB期8例，Ⅳ期14例であり，扁平上皮癌ではⅠ期9例，Ⅱ期7例，ⅢA期18例，ⅢB期6例，Ⅳ期8例であった．TNM分類による各因子のうちT1症例が腺癌に比べ扁平上皮癌で有意に少なかったが，N因子，M因子は各組織間で有意差はなかった．組織分化度では，高分化型および中分化型が腺癌に比べ扁平上皮癌で有意に少なかった（表1）．転移性肺腫瘍90例のうち上皮性腫瘍は49例（平均年齢55.9歳，男性30例，女性19例），非上皮性腫瘍は41例（平均年齢39.0歳，男性23例，女性18例）であり，非上皮性腫瘍で平均年齢が有意に低かった．上皮性腫瘍の原発巣別内訳は，大腸・直腸21例，腎11例，子宮5例，乳腺4例，卵巣1例，精巣3例，頭頸部4例であった．非上皮性腫瘍では，骨13例，軟骨4例，軟部組織23例，子宮1例であた．各原発巣における組織学的内訳を表2に示した．

Ⅱ．CD44s，CD44v6に対する免疫組織化学染色法

ホルマリン固定パラフィン包埋された標本を4μmの厚さに薄切し，シランコーティングスライド（武藤化学，東京）に付着させ，100％キシレン（和光純薬，大阪）にて10分間，3回の脱パラフィンを行った後，99.5％エタノール（和光）にて20回振盪を3回，90％エタノールにて20回振盪を1回，70％エタノールにて20回振盪を1回の脱水を行った．水道水で1分間洗浄後，リン酸緩衝食塩水（phosphate-buffered saline, PBS）（pH7.5）（ダルベッコ PBS(-)，日水製薬，東京）に浸し，0.1Mクエン酸緩衝液（pH6.0）中で500W，5分間，2回のマイクロウェーブ処理を行い，室温まで放置した後，新しい PBS に浸した．次に0.3％過酸化水素加メタノールにて20分間室温で内因性ペルオキシダーゼを阻害し，10分間水道水で洗浄した．続いて，ウシ血清アルブミン（ダコ・ジャパン，京都）にて20分間ブロッキングを行った後，CD44s染色では抗ヒトCD44sモノクローナル抗体（マウスIgG2a，クローンSSF-2；Bender MedSystems CO., LTD., Vienna, Austria）を，CD44v6染色では抗ヒトCD44v6モノクローナル抗体（マウスIgG1，クローンVFF7；Bender MedSystems CO., LTD.）をPBSで100倍に希釈し，4℃で一晩反応させた．次にPBSにて5分間3回洗浄し，ビオチン標識抗マウスおよび抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体（ダコ・ジャパン）を用い室温にて30分間反応させ，PBSにて5分間3回洗浄し，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）にて室温で30分間反応させた．PBSにて5分間3回洗浄後，四塩酸3,31-ジアミノベンチジン（3,31-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB）（和光）にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約5分間室温で反応させた．水道水で10分間洗浄したあと，ヘマトキシリンにて核染色を行った．全過程終了後，脱水，透徹を施行し封入した．判定は，光学顕微鏡を用い定性的に以下のように分類した．すなわち，1) 腫瘍細胞がまったく染色されないもの，2) 腫瘍細胞の10％未満が染色されたもの，3) 腫瘍細胞の10％以上50％未満が染色されたもの，4) 腫瘍細胞の50％以上が染色されたものに分類し，それぞれを0，1，2，3とスコア化した．スコア0，1を陰性，2，3を陽性と判定した．

Table 2. Clinicopathological findings in 90 patients with metastatic lung tumors

Origin	Histology	No. of cases	Age (years)	No. (%) of cases	
				Male	Female
All		90	48.3±19.0	53	37
Epithelial tissues		49	55.9±11.1 *	30	19
Non-epithelial tissues		41	39.0±22.3 *	23	18
Epithelial tumors					
Colon and rectum	Adenoca.	21	60.1± 8.0	14	7
Kidney	Renal cell ca.	11	59.4± 8.0	10	1
Uterus	Squamous cell ca.	4	57.0±10.2	0	4
	Adenoca.	1	57	0	1
Breast	Inversive ductal ca.	4	49.0±12.0	0	4
Ovary	Adenoca.	1	58	0	1
Testis	Embryonal carcinoma	3	33.3± 9.0	3	0
Head and neck	Squamous cell ca.	1	59	1	0
	Adenoid cystic carinoma	3	45.3± 3.5	2	1
Non-epithelial tumors					
Bone	Osteosarcoma	13	24.7±18.6	9	4
Cartilage	Chondrosarcoma	4	40.8±17.3	0	4
Soft tissues	Sarcoma	15	37.5±20.8	7	8
	MFH	6	63.5±14.4	6	0
	Malignant Schwanoma	1	41	0	1
	Malignant melanoma	1	72	1	0
Uterus	Leiomyosarcoma	1	58	0	1

Adenoca., adenocarcinoma ; renal cell ca., reanl cell carcinoma ; squamous cell ca., squamous cell carcinoma ; inversive ductal ca., iversive ductal carcinoma ; MFH, malignant fibrous histiocytoma. * $p<0.05$.

Ⅲ．p53に対する免疫組織化学染色法

ホルマリン固定パラフィン包埋された標本を4μmの厚さに薄切し，シランコーティングスライドに付着させ，100%キシレンにて10分間，3回の脱パラフィンを行った後，100%エタノールにて20回振盪を3回，90%エタノールにて20回振盪を1回，70%エタノールにて20回振盪を1回の脱水を行った．水道水で1分間洗浄後，PBSに浸した，0.1Mクエン酸緩衝液(pH6.0)中で500W，5分間，4回のマイクロウェーブ処理を行い，室温まで放置した後，新しいPBSに浸した．次に0.3%過酸化水素加メタノールにて20分間室温で内因性ペルオキシダーゼを阻害し，10分間水道水で洗浄した．続いて，ウシ血清アルブミン(ダコ・ジャパン)にて20分間ブロッキングを行った後，抗ヒトp53モノクローナル抗体(マウスIgG2b，クローンDO-7；ダコ・ジャパン)をPBSで100倍に希釈し，室温で1時間反応させた．次にPBSにて5分間3回洗浄し，ビオチン標識抗マウスおよび抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体(ダコ・ジャパン)を用い室温にて20分間反応させ，PBSにて5分間3回洗浄し，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)にて室温で20分間反応させた．PBSにて5分間3回洗浄後，DAB(和光)にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約5分間室温で反応させた．水道水で10分間洗浄したあと，ヘマトキシリンにて核染色を行った．全過程終了後，脱水，透徹を施行し封入した．判定は，光学顕微鏡を用い定性的に以下のように分類した．すなわち，1) 腫瘍細胞がまったく染色されないもの，2) 腫瘍細胞の10%未満が染色されたもの，3) 腫瘍細胞の10%以上50%未満が染色されたもの，4) 腫瘍細胞の50%以上が染色されたものに分類し，それぞれを0，1，2，3とスコア化した．スコア0，1を陰性，2，3を陽性と判定した．

Ⅳ．ホルマリン固定パラフィン包埋組織からのDNA抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋された標本1検体につき10μmの厚さに薄切したものを6枚作製し，3枚づつ1.5mlのマイクロ遠心チューブに入れた．それぞれのチューブにキシレン1mlを加え，10分間振盪攪拌器にて攪拌後，15000回転室温で3分間遠心し上清を捨てる作業を3回繰り返し脱パラフィンを行った．次に99.5%エタノールを1ml加え，5分間振盪攪拌器にて攪拌後，15000回転室温で3分間遠心し上清を捨てる作業を3回繰り返し余分なキシレンを取り除いた．20分間風乾後，10mg/mlのプロテナーゼK(和光)溶液8.4ml，20×SSC(和光)500μl，SDS(和光)1ml，蒸留水8.4mlを混じた溶液を各300μl分注し，48℃で48時間反応させた．この反応中約12時間毎に10mg/mlプロテナーゼK溶液を5μl追加した．次に平衡化した中性フェノール(和光)500μl加え1時間室温で穏やかに攪拌し，15000回転室温で3分間遠心後水層を別のチューブに移し，さらにこの操作をもう一度フェノール，クロロホルム(和光)，イソアミルアルコール(和光)を25：24：1の割合で混合した溶液を用い繰り返しDNAを抽出した．抽出後は0.1Mの酢酸ナトリウム溶液(和光)を加えたエタノールを1ml加え攪拌後，-80℃で2時間エタノール沈殿を行った．次に，4℃，15000回転20分間遠心し，上清を取り除き70%エタノールで洗浄後乾燥させ，1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)に溶解し，4℃で保存した．DNAの濃度は260nmの吸光度を測定し求めた．

Ⅴ．PCR反応

鋳型DNA 0.5μgに対して10×PCR反応緩衝液(100mM Tris-HCl, pH8.8, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 1%トリトロンX-100) 5μl，dATP，dGTP，dCTP，dTTP各10nmol，TaqDNAポリメラーゼ1.25単位(いずれも和光)および，表3に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドプライマー(バイオロジカ，名古屋) 50pmolずつを加え，滅菌蒸留水を加えて計50μlとした．蒸発を防ぐためミネラルオイル(Sigma, St.Louis, USA) 30μlを重層し，PROGRAM TEMP. CONTROL SYSTEM PC-800(アステック，福岡)を使用して，94℃1分間の熱変性，50℃2分間のアニーリング，72℃1分間のDNA伸長反応を1サイクルとし，40サイクルの増幅を行った．PCR反応終了後，1μg/mlのエチジウムブロマイド(ethidium bromide, 和光)を含む，4%アガロースゲル(和光)にて電気泳動を行い，紫外線照射にて増幅されたDNA断片を検出した．DNAサイズマーカーとして，Marker 4 (φX174 / HaeⅢdigest) (和光)を用いた．プライマーは，k-rasの12番目のアミノ酸コドンを含む領域が特異的に増幅できるように設計した．また，鋳型DNAとしてras-Mutant Set, c-Ki-ras codon 12(宝酒造，京都)を用い同一の条件でPCR反応を行い，後述の7本のプローブに対する陽性対照DNAとした．

Ⅵ．ドットブロットハイブリダイゼーション法

PCR産物を95℃で10分間加熱した後，氷中で急速冷却し増幅したDNAを1本鎖とした．次にHybond N+(アマシャム・ジャパン，東京)を適当な大きさに切り1cm角に区切った後，上記DNA 1.25μl，および陽性対照DNA 1μlをマイクロピペッ

Table 3. K-ras (codon12) gene primers and probes used in this study

Primer/probe		Coded protein of codon12	Length (base pairs)	Sequence
Primer			108 (product)	
	Forward		20	GACTGAATATAAACTTGTGG
	Reverse		20	CTATTGTTGGATCATATTCG
Probe				
		Gly (Wild type)	20	GTTGGAGCTGGTGGCGTAGG
		Arg	20	-CGT-
		Cys	20	-TGT-
		Ser	20	-AGT-
		Ala	20	-GCT-
		Val	20	-GTT-
		Asp	20	-GAT-

Arg, arginine ; cys, cysteine ; ser, serine ; ala, alanine ; val, valine ; asp, asparatic acid.

ターで膜上にスポットし，DNA を膜に固定するため紫外線を Stratalinker UV Crosslinker (東洋紡，大阪) にて1200J 照射した．次に，できあがった膜をハイブリダイゼーションバック (Kapak Co., Minneapolis, USA) に入れ，5×Denhardt 液 (和光)，0.1% SDS，5×SSC，100μg /ml 変性サケ精子DNA (和光) を膜6cm²に対し1ml加え，ハイブリダイゼーションオーブン(岩城硝子，千葉) 内で静かに撹拌しながら50℃で5時間保温した．プローブは，7種類全てオリゴヌクレオチドプローブである rasジーンプローブセット，c-Ki-ras/12 (宝酒造) を使用した．塩基配列は表3に示した．各プローブ10pmolに対して，10×リン酸化緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM $MgCl_2$, 5mM ジチオトレイトール, 0.1mM スペルミジン, 0.1mM EDTA) (和光) 1μl，[γ-^{32}P]ATP (アマシャム・ジャパン) 185kBq，T4ポリヌクレオチドキナーゼ (和光) 10単位ずつを加え，37℃で30分間保温後，70℃で10分間加熱し酵素を失活させプローブの5' 末端を^{32}Pで標識した．この標識プローブを前述のハイブリダイゼーションバッファー4mlに対し1μl加え，ハイブリダイゼーションオーブン内で静かに撹拌しながら50℃で1晩保温した．次に，0.3M 塩化ナトリウム (和光)，17.3mMリン酸2水素ナトリウム2水和物 (和光)，2.5mM EDTA (和光)，0.1% SDS中で15分間2回室温で振盪しながら洗浄した．続いて，3M 塩化テトラメチルアンモニウム (和光)，50mM Tris-HCl (pH8.0)，2mM EDTA, 0.1% SDS中で62℃30分間1回，64℃30分間1回振盪しながら洗浄した．その後，膜をイメージングプレート・BAS CASSETTE 2040 (富士フィルム，東京) に30分間露光し，バイオイメージングアナライザー・BAS-1500 (富士フィルム) で画像を読み取り，MacBAS V2.2 (富士フィルム) を用い画像化した．

Ⅵ．統計学的処理

CD44s，CD44v6，p53 のスコアはすべて平均値±標準偏差 ($\bar{x}$±SD) で示した．平均値の有意差検定には，Mann-Whitney のU検定を用いた，離散量に対してはカイ2乗 (χ^2) 検定を用いた．また，多群間の有意差検定には Kruskal-Wallis の検定を用いた．生存率，無再発生存率の算出は Kaplan-Meier法を用い，その有意差検定には，一般化 Wilcoxon 検定を用いた．ただし，原発性肺癌の生存率の検討は，治癒切除[26] の行われた74例のみについて行い，相対的非治癒切除14例 (Ⅰ期4例，ⅢA期5例，ⅢB期1例，Ⅳ期4例) および絶対的非治癒切除28例 (ⅢA期5例，ⅢB期5例，Ⅳ期18例) は検討から除外した．いずれも，危険率

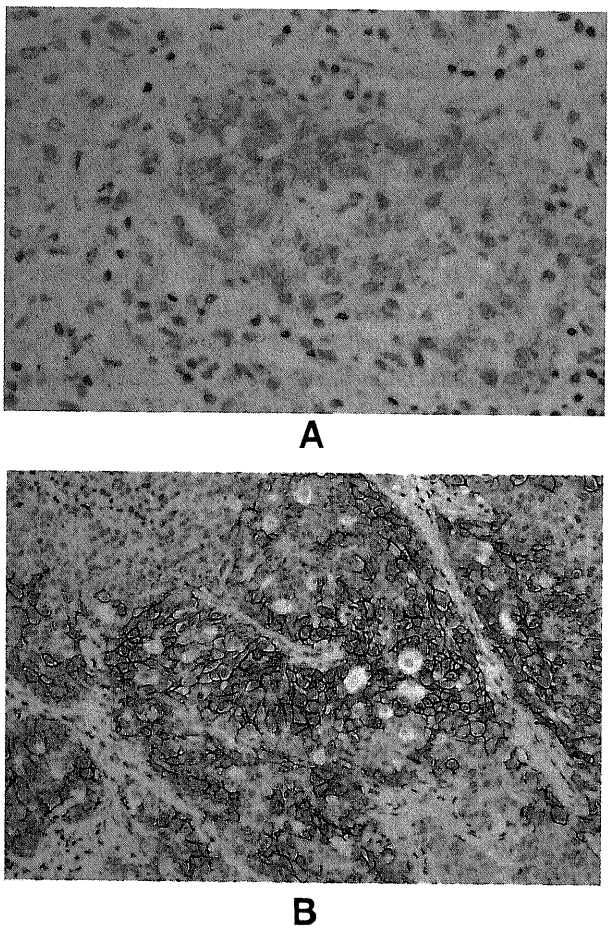

Fig. 1. Immunohistochemical CD44s and CD44v6 staining of cell membrane in primary lung adenosquamous carcinoma. (A) Stained by CD44s monoclonal antibody (×200). (B) Stained by CD44v6 monoclonal antibody (×100).

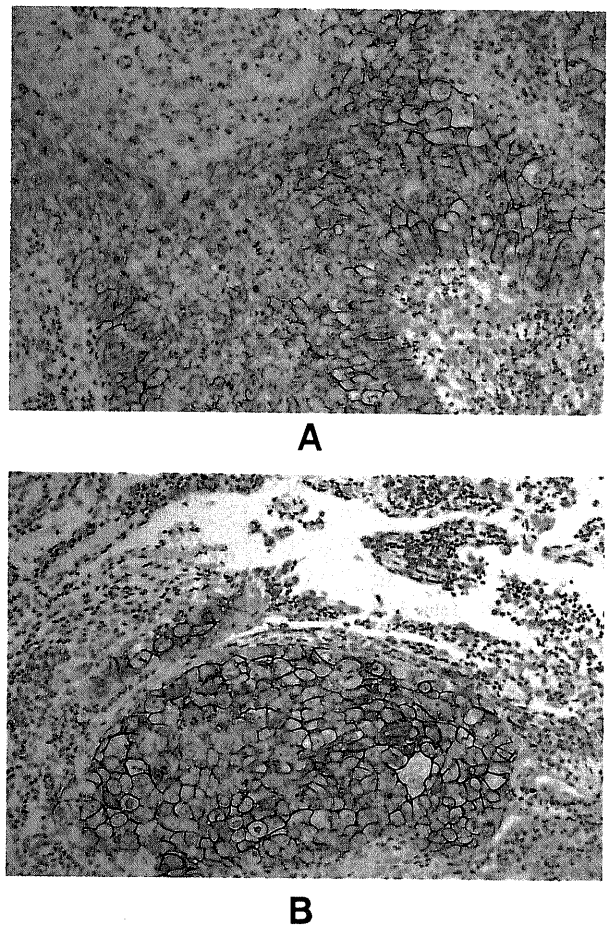

Fig. 2. Immunohistochemical CD44s and CD44v6 staining of cell membrane in primary epidermoid lung cancer. (A) Stained by CD44s monoclonal antibody (×100). (B) Stained by CD44v6 monoclonal antibody (×100).

(p 値) が0.05以下を有意差ありとした．

成　　績

Ⅰ．原発性肺癌

1．CD44s，CD44v6およびp53蛋白免疫組織染色像

腺扁平上皮癌の CD44s，CD44v6 免疫組織染色像 (図1)，扁平上皮癌おける CD44s，CD44v6 (図2)，p53蛋白免疫組織染色像 (図3) を示す．CD44s，CD44v6 染色陽性例は，腫瘍辺縁部では細胞膜に沿って強く染色され，腫瘍中心部に向かうにつれて細胞質が淡く染色される傾向があり，この傾向は扁平上皮癌で強く認められた．また，正常組織でも一部の気管支腺，Ⅱ型肺胞上皮が染色された．一方，p53蛋白免疫組織染色陽性例では，腫瘍細胞の核が染色され非腫瘍部では核染色像は認められなかった．

2．各臨床病理学的因子別にみた CD44s，CD44v6 および p53蛋白の発現 (表4)

原発性非小細胞肺癌116例全体では，各染色スコアはCD44s 1.19±1.00，CD44v6 1.81±1.11，p53蛋白 1.43±1.31であった．組織別にみると，CD44s発現は腺癌と扁平上皮癌で差はなかったが，CD44v6の発現は腺癌1.38±1.09，扁平上皮癌2.42±0.82と扁平上皮癌で有意に高く ($p<0.01$)，p53蛋白発現も腺癌1.18±1.28，扁平上皮癌1.79±1.29と扁平上皮癌で有意に高かった ($p<0.05$)．また，CD44sの発現はT3症例に比べT1症例で有意に高く ($p<0.05$)，分化度では中分化型，低分化型に比べ高分化型で有意に高かった ($p<0.05$)．性別，病期，N因子，M因子によ

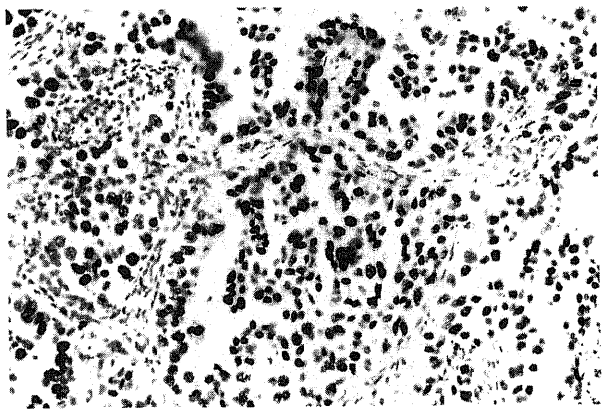

Fig. 3. Immunohistochemical staining of p53 protein using monoclonal antibody. p53 protein positive nuclei were stained homogeneously (×200)

Table 4. Correlations between clinicopathological findings and expressions of CD44s, CD44v6 and p53 protein in 116 primary non-small cell lung cancer cases

Clinico-pathological findings	No. of cases examined	Score ($\bar{x}$±SD)		
		CD44s	CD44v6	p53 protein
All	116	1.19±1.00	1.81±1.11	1.43±1.31
Histology				
Adenoca.	68	1.15±1.03	1.38±1.09 **	1.18±1.28 *
Epidermoid ca.	48	1.25±0.96	2.42±0.82	1.79±1.29
Sex				
Male	84	1.19±0.98	1.86±1.13	1.57±1.35
Female	32	1.19±1.06	1.69±1.06	1.06±1.16
Stage				
Ⅰ	32	1.53±1.08	2.00±1.11	1.34±1.21
Ⅱ	15	1.27±0.88	1.87±0.99	1.80±1.32
ⅢA	33	1.15±1.00	1.73±1.15	1.49±1.44
ⅢB	14	0.79±0.98	1.29±1.14	1.79±1.37
Ⅳ	22	0.96±0.84	1.96±1.09	1.00±1.20
T facter				
T1	30	1.67±1.03 *	1.77±1.19	1.27±1.29
T2	51	1.12±0.93	2.00±1.00	1.55±1.29
T3	16	0.81±0.91	1.44±1.21	1.44±1.41
T4	19	0.95±0.97	1.68±1.16	1.37±1.42
N facter				
N0	51	1.28±1.10	1.77±1.16	1.37±1.26
N1～N3	65	1.12±0.91	1.85±1.08	1.48±1.36
M facter				
M0	96	1.26±1.03	1.77±1.11	1.51±1.32
M1	20	0.85±0.75	2.00±1.12	1.05±1.23
Differentiation				
Well	44	1.57±0.97 * *	1.68±1.10	1.16±1.24
Moderately	43	1.00±0.95	2.09±1.10	1.72±1.37
Poorly	29	0.90±0.94	1.59±1.21	1.41±1.30

Adenoca., adenocarcinoma ; epidermoid ca., epidermoid carcinoma.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$.

る各スコア間の有意差は認めなかった．

3．p53蛋白発現別にみたCD44s，CD44v6の発現（表5，6）

症例全体では，CD44sスコアはp53蛋白陰性例でやや高かったが有意差は認めなかった．CD44v6スコアでは逆にp53蛋白陽性例でやや高かったが有意差は認めなかった．組織別にみると，CD44v6スコアはp53蛋白陽性，陰性に関わらず，腺癌に比べ扁平上皮癌で有意に高かった（$p<0.05$）．また，p53蛋白陰性例ではCD44sスコアはM1症例比べM0症例で有意に高く（$p<0.05$），低分化型に比べ高分型で有意に高かった（$p<0.05$，表5）．次に，腺癌に限ってCD44sとp53蛋白の発現を検討すると，p53蛋白陰性例ではN1～N3症例に比べN0症例でCD44sスコアが有意に高く，M1症例に比べM0症例で，また，低分化型に比べ高分化型でCD44sスコアが有意に高かった（$p<0.05$，表6）．しかし，p53蛋白陽性例，CD44v6スコア，扁平上皮癌症例に関してはこのような関係は認められなかった．

4．K-ras（コドン12）点突然変異の解析

原発性非小細胞肺癌116例のうち，PCR反応後の電気泳動で108塩基対の核酸断片の増幅が認められたのは94例であった（図4）．この94例を対象にドットブロットハイブリダイゼーションを行いK-ras点突然変異の有無，および変異の塩基配列を決定した．ハイブリダイゼーションを行う際に，必ず検体と共に7種類の変異既知陽性対照DNAをナイロン膜上にスポットし，この陽性対照のハイブリダイゼーションの程度と検体のそれを比較し判定した（図5）．K-ras点突然変異を認めたのは，症例全体では94例中31例（33.0%）であり，腺癌では54例中23例（42.6%），扁平上皮癌では40例中8例（20.0%）で腺癌に有意に多かった（$p<0.05$）．次にK-ras点突然変異の種類であるが，K-rasのコドン12の塩基配列は野生型では-GGT-でありグリシンをコードしているのに対し，1番目の塩基がシトシンに変異し-CGT-となりアルギニンをコードするように変異したものが31例の点突然変異中11例（腺癌8例，扁平上皮癌3例）であった．また，2

Table 5 Correlations between clinicopathological findings and expressions of CD44s or CD44v6 divided into p53 (+) group and p53 (−) group in 116 primary non-small cell lung cancer cases

Clinico-pathological findings	No. of cases examined	No. (%) of p53 (+) cases	CD44s score ($\bar{x}\pm SD$)		CD44v6 score ($\bar{x}\pm SD$)	
			p53 (+) cases	p53 (−) cases	p53 (+) cases	p53 (−) cases
All	116	57 (49.1)	1.12±1.04	1.25±0.96	1.93±1.10	1.70±1.12
Histology						
Adenoca.	68	26 (38.2)	1.00±1.01	1.24±0.98	1.23±1.07 *	1.48±1.11 *
Epidermoid ca.	48	31 (64.6)	1.23±0.99	1.29±0.92	2.52±0.72	2.24±0.97
N facter						
N0	51	25 (49.0)	1.04±1.14	1.50±1.03	1.84±1.18	1.69±1.16
N1～N3	65	32 (49.2)	1.19±0.97	1.06±0.86	2.00±1.05	1.70±1.10
M facter						
M0	96	50 (52.1)	1.12±1.06	1.41±0.98 *	1.92±1.09	1.61±1.13
M1	20	7 (35.0)	1.14±0.90	0.69±0.63	2.00±1.29	2.00±1.08
Differentiation						
Well	44	17 (38.6)	1.47±1.07	1.63±0.93 *	1.67±1.00	1.71±1.26
Moderately	43	26 (60.5)	0.96±0.92	1.06±1.03	2.23±0.86	1.88±1.22
Poorly	29	14 (48.3)	1.00±11.8	0.80±0.68	1.64±1.22	1.53±1.25

p53 (+), p53 protein-positive ; p53 (−), p53 protein-negative. Adenoca., adenocarcinoma ; epidermoid ca., epidermoid carcinoma.
* $p<0.05$.

Table 6. Correlations between clinicopathological findings and CD44s expression divided into p53 (+) group, and p53 (−) group in 68 primary lung adenocarcinoma

Clinico-pathological findings	No. of cases examined	No. (%) of p53 (+) cases	CD44s score ($\bar{x}\pm SD$)	
			p53 (+) cases	p53 (−) cases
N facter				
N0	30	12 (40.0)	1.00±1.28	1.61±1.04 *
N1～N3	58	14 (36.8)	1.00±0.96	0.70±0.68
M facter				
M0	56	24 (42.9)	1.00±1.10	1.41±1.01 *
M1	12	2 (16.7)	1.00±1.41	0.70±0.68
Differentiation				
Well	35	12 (34.3)	1.42±1.17	1.61±0.94 *
Moderately	18	8 (44.4)	1.38±0.74	0.80±1.03
Poorly	15	6 (37.5)	1.38±0.74	0.80±1.03

p53 (+), p53 protein-positive ; p53 (−), p53 protein-negative cases. * $p<0.05$.

番目の塩基がチミンに変異し，-GTT- となりバリンをコードするように変異したものが20例（腺癌15例，扁平上皮癌5例）であった．その他の変異は認めなかった．K-ras 点突然変異の頻度と臨床病理学的因子との間には有意な相関は認められなかった（表7）．

5．K-ras（コドン12）点突然変異の有無と CD44s，CD44v6 の発現（表8）

K-ras 点突然変異症例の CD44s はスコアは1.36±1.20，K-ras 野生型症例では1.11±0.94であり K-ras 点突然変異症例でやや高く，また，CD44v6 スコアは K-ras 点突然変異症例で1.61±1.17，K-ras 野生型症例では1.92±1.02と逆に K-ras 野生型症例で高かったが有意差を認めるには至らなかった．組織別ににみると，CD44v6 スコアは K-ras 点突然変異の有無に関わらず腺癌に比べ扁平上皮癌で有意に高かった（$p<0.05$）．また，腺癌に限ってみると，K-ras 野生型症例における CD44s スコアは N1～N3 症例（0.59±0.62）に比べN0症例（1.43±0.94）で有意に高く（$p<0.05$），M1症例（0.50±0.54）に比べM0症例（1.13±0.92）で有意差こそ認めないものの高い傾向を認めた（$p=0.09$）．また，分化度においても中分化型（0.56±0.53），低分化型（0.40±0.55）に比べ高分化型（1.35±0.93）で高い傾向を認めた（$p=0.06$，$p=0.07$）．しかし，K-ras 点突然変異症例，CD44v6 スコア，および扁平上皮癌症例に関してはこのような関係は認められなかった．

6．CD44s，CD44v6 の発現と生存率の検討（表9）

生存率の検討は，治癒切除の行われた74例のみについて行った．腺癌，扁平上皮癌をあわせた74例全体の検討では，CD44s 陰性例は3年生存率（3生率）31.8%，5年生存率（5生率）25.0%で

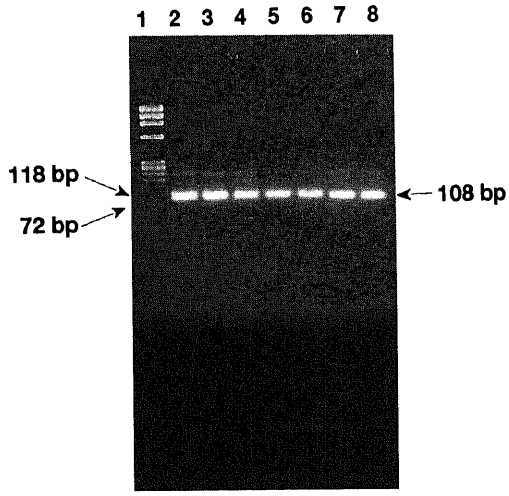

Fig. 4. Photograph of electrophoresis after PCR reaction for dot blot hybridization of K-ras (codon 12). Lane 1 is molecular size marker (φX174/HaeⅢ digest) and lane 2 to 7 are samples. Template DNA was obtained from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Primer used is shown in Table. 3. The 108bp PCR product was detected in 94 cases of 116 primary non-small cell lung cancer cases (arrow).

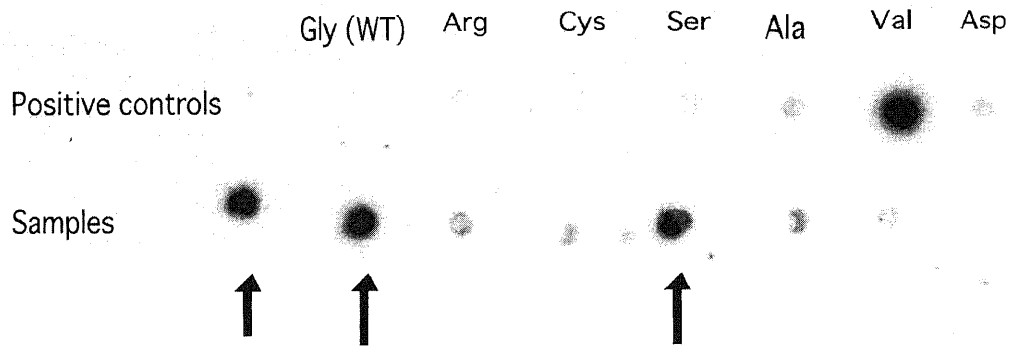

Fig. 5. Dot blot hybridization of K-ras gene (codon 12), using valine encoded probe (containing the -TGT- sequence in codon 12, shown in Table. 3). Dots on the top line indicate 7 positive controls, and dots on the bottom line indicate samples. The positive control of valine hybridized strongly and 3 samples are hybridized as strong as the positive control (arrows).

Table 7. Frequency of K-ras point mutations (codon12) in primary 94 non-small cell lung cancer cases

Groups	No. of cases examined	No. (%) of K-ras mutants	Variations of mutaions (no. of cases)					
			-CGT- (Arg)	-TGT- (Cys)	-AGT- (Ser)	-GCT- (Ala)	-GTT- (Val)	-GAT- (Asp)
All	94	31 (33.0)	11	0	0	0	20	0
Adenoca.	54	23 (42.6) ┐*	8	0	0	0	15	0
Epidermoid ca.	40	8 (20.0) ┘	3	0	0	0	5	0

Arg, arginine ; cys, cysteine ; ser, serine ; ala, alanine ; val, valine ; asp, asparatic acid. * $p<0.05$.

あり，CD44s 陽性例の3生率89.7%，5生率55.3%に比べ有意に予後不良 (p<0.05) であった (図 6 A)．また，CD44v6 陰性例は3生率30.0%，5生率23.4%であり，CD44v6 陽性例の3生率48.8%，5生率34.9%に比べ有意差こそ認めなかったが，予後不良の傾向 (p=0.06) を認めた (図6B)．次に，CD44s と CD44v6 の両者の発現の有無と予後について検討すると，CD44s 陰性かつ CD44v6 陰性例は3生率29.2%，5生率20.8%であり，CD44s 陽性かつ CD44v6陽性例の3生率60.9%，5生率39.1%に比べ有意に予後不良 (p<0.05) であった (図 7)．腺癌に限ってみると，CD44s 陽性例と陰性例の間には有意差は認めなかったが，CD44v6 陰性例は3生率33.4%，5生率29.1%であり，CD44v6 陽性例の3生率57.9%，5生率36.8%に比べ予後不良の傾向 (p=0.06) を認めた．また，

Table 8. Correlations between clinicopathological findings and expressions of CD44s or CD44v6 divided into K-ras mutants group and K-ras wild type group in 94 primary non-small lung cancer cases

Groups	Clinico-pathological findings	No. of cases examined	No. (%) of K-ras mutants	CD44s score ($\bar{x}\pm$SD)		CD44v6 score ($\bar{x}\pm$SD)	
				Mutants	Wild types	Mutants	Wild types
All		94	31 (33.0)	1.36±1.20	1.11±0.94	1.61±1.17	1.92±1.02
Adenoca.		54	23 (42.6)	1.39±1.20	0.97±0.88	1.30±1.15	1.45±0.96
Epidermoid ca.		40	8 (20.0)	1.25±1.28	1.25±0.98	2.50±0.76 *	2.38±0.87 *
Adenoca.							
	N facter						
	N0	23	9 (39.1)	1.67±1.41	1.43±0.94	1.33±1.23	1.36±0.93
	N1～N3	31	14 (45.2)	1.21±1.05	0.59±0.62 *	1.29±1.14	1.53±1.01
	M facter						
	M0	44	21 (47.7)	1.43±1.21	1.13±0.92	1.38±1.26	1.26±0.92
	M1	10	2 (20.0)	1.00±1.41	0.50±0.54 **	0.50±0.71	2.00±0.93
	Differentiation						
	Well	12	3 (25.0)	1.71±1.20	1.35±0.93	1.43±1.16	1.41±0.94
	Moderately	11	6 (54.5)	0.67±0.58	0.56±0.53 **	0.67±0.58	1.67±0.87
	Poorly	31	14 (45.2)	1.00±1.27	0.40±0.55	1.33±1.37	1.20±1.30

Adenoca., adenocarcinoma ; epidermoid ca., epidermoid carcinoma. * p<0.05, ** p<0.10.

Table 9. Correlations between survival rate and expression of CD44s or CD44v6 in 74 curatively resected primary non-small cell lung cancer cases

Groups	Expression of CD44s	Expression of CD44v6	No. of cases examined	% survival in years of 3	% survival in years of 5	p-value*
All						
Total			74	41.4	30.1	
	+[a]		30	89.7	55.2	p<0.05
	−[b]		44	31.8	25.0	
		+[c]	43	48.8	34.9	p=0.06
		−[d]	31	30.0	23.4	
	+	+	23	60.9	39.1	p<0.05
	−	−	24	29.2	20.8	
Adenoca.						
Total			44	44.2	32.6	
	+		15	57.1	35.7	NS
	−		29	37.9	31.0	
		+	19	57.9	36.8	p=0.06
		−	25	33.4	29.1	
	+	+	9	66.7	33.3	p=0.06
	−	−	19	31.6	26.3	
Epidermoid ca.						
Total			30	36.7	26.7	
	+		15	53.3	40.0	p<0.05
	−		15	20.0	13.3	
		+	24	41.7	33.3	NS
		−	6	16.7	0	
	+	+	14	57.1	42.9	p<0.06
	−	−	5	20.1	0	

All cases were underwent curative operation. [a] +, CD44s-positive cases. [b] −, CD44s-negative cases. [c] +, CD44v-positive cases. [d] −, CD44v6-negative cases. Adenoca., adenocarcinoma ; epidermoid ca., epidermoid carcinoma. * Generalized Wilcoxon test. NS, not significant.

CD44s陰性かつ CD44v6 陰性例は3生率31.6%，5生率26.3%であり，CD44s陽性かつ CD44v6 陽性例の3生率66.7%，5生率33.3%に比べ予後不良の傾向 (p=0.06) を認めた．扁平上皮癌では，CD44s 陰性例は3生率20.0%，5生率13.3%であり，CD44s 陽性例の3生率53.3%，5生率40.0%に比べ有意に予後不良であった (p<0.05)．CD44v6 陽性例と陰性例の間には有意差は認めなかったが，CD44s 陰性かつ CD44v6 陰性例は3生率20.0%，5生率0%であり，CD44s 陽性かつ CD44v6 陽性例の3生率57.1%，5生率42.9%に比べ予後不良の傾向 (p=0.06) を認めた．

7．p53蛋白発現，K-ras点突然変異の有無別にみたCD44s，CD44v6 発現と生存率の検討 (表10)

治癒切除症例全74例において，p53蛋白陽性症例では，CD44s 陽性症例と陰性症例の間に生存率に有意差はなく，CD44v6 発現においては，陰性例の3生率25.0%，5生率12.5%に比べ，陽性例では3生率44.0%，5生率32.0%と有意差は認めないものの陰性例で予後不良の傾向を認めた (p=0.08，図 8 A)．CD44s 陽性かつ CD44v6 陽性症例と CD44s 陰性かつ CD44v6 陰性症例の間には生存率に有意差は認めなかった．一方，p53蛋白陰性症例では，CD44s 陰性例の3生率35.3%，5生率29.4%に対し，陽性例では3生率60.0%，5生率46.7%と有意に CD44s 陰性例で予後不良であった (p<0.05，図8B)．CD44v6 発現陽性例，陰性例の間には生存率に有意差は認めなかった．CD44s 陽性かつ CD44v6 陽性症例と CD44s 陰性かつ CD44v6 陰性症例の間には生存率に有意差は認めなかった．K-ras 点突然変異陽性症例，陰性症例の間でも同様の検討を行ったが，各群間で生存率に有意差は認めなかった．

Ⅱ．転移性肺腫瘍

1．CD44s，CD44v6 および p53蛋白免疫組織染色像

転移巣におけるCD44s，CD44v6，p53蛋白の各染色性は，原発性肺癌の場合とほぼ同様であったが，大腸癌肺転移巣では細胞質が染色されるものが多かった．各転移巣の染色像を図 9，図10に示す．

2．原発巣別にみたCD44s，CD44v6，p53蛋白の発現 (表11)

肺転移巣90例全体では，CD44sスコアは0.75±0.96，CD44v6スコアは1.07±1.17，p53蛋白スコアは1.16 ±1.16であった．上皮性腫瘍と非上皮性腫瘍に分けると，CD44sスコアは非上皮性腫瘍の0.42 ±0.84に比べ，上皮性腫瘍は1.02 ±0.96であり上皮性腫瘍で有意に高かった (p<0.05)．また，CD44v6スコアも非上皮性腫瘍の0.63±0.86に比べ，上皮性腫瘍は1.52±1.12であり上皮性腫瘍で有意に高かった (p<0.05)．しかし，p53蛋白では有意差は認めなかった．次に，原発巣別に各スコアを比較して

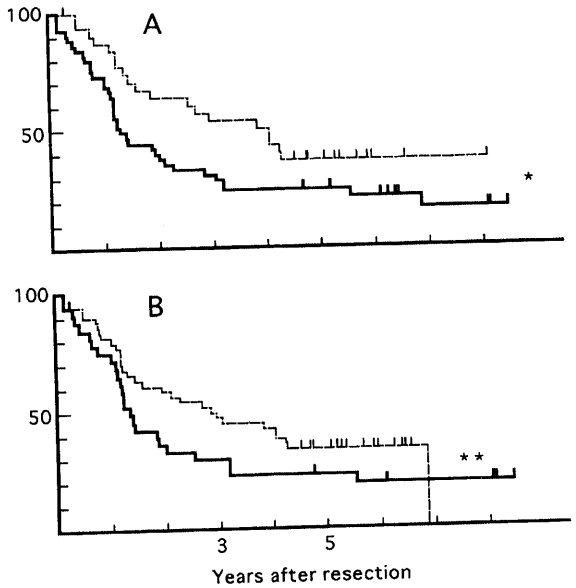

Fig. 6. Survival curves of 74 patients with non-small cell lung cancer after curative resection. (A) Divided into with and without CD44s expression. ……, cases with CD44s expression (n=30); ——, cases without CD44s expression (n=44). (B) Divided into with and without CD44v6 expression. ……, cases with CD44v6 expression (n=43); ——, cases without CD44v6 expressions (n=31). * p < 0. 05, ** p < 0. 10, by generalized Wilcoxon test.

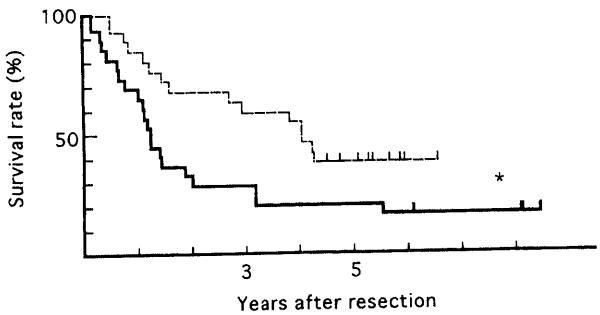

Fig. 7. Survival curves of patients with non-small cell lung cancer after curative resection. ……, both CD44s positive and CD44v6 positive cases (n=23); ——, both CD44s negative and CD44v6 negative cases (n=24). * p < 0. 05, by generalized Wilcoxon test.

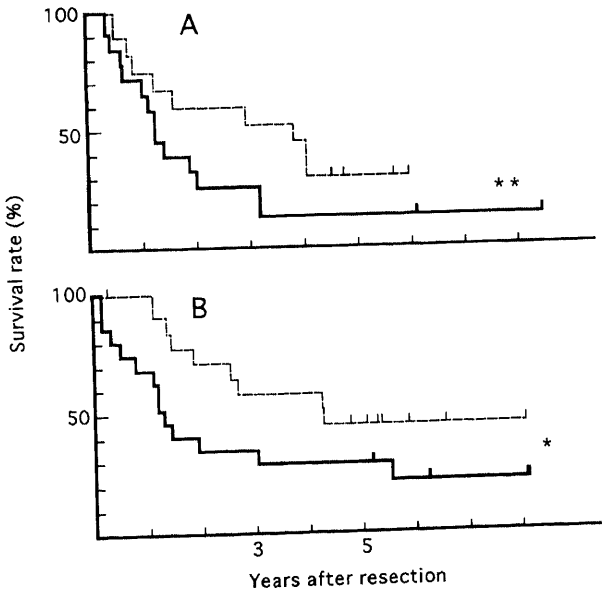

Fig 8. Survival curves of patients with non-small cell lung cancer after curative resection. (A) For p53 protein positive cases. ……, cases with CD44v6 expression (n=25);——, cases without CD44v6 expressions (n=16). (B) For p53 protein negative cases. ……, cases with CD44s expression (n=16); ——, cases without CD44v6 expression (n=17). * p < 0. 05, ** p < 0. 10, by generalized Wilcoxon test.

みると，CD44sスコアは腎癌0.36±0.67，軟部組織悪性腫瘍0.65±0.98，骨・軟骨悪性腫瘍0.12±0.49に対し，大腸・直腸癌1.29±0.96，頭頸部癌1.75±0.50と前3者に対し後2者で有意に高かった(それぞれp<0.05)．CD44v6スコアは，腎癌0.64±1.03，軟部組織悪性腫瘍0.78±0.95，骨・軟骨悪性腫瘍0.47±0.72に対し，大腸・直腸癌が1.52±1.12と有意に高く(それぞれp<0.05)，腎癌，軟部組織悪性腫瘍に対し，子宮癌が2.40±1.34と有意に高く(それぞれp< 0.05)，また，軟部組織悪性腫瘍に対し頭頸部癌2.25±1.50と有意に高かった(p<0.05)．p53蛋白スコアは腎癌0.46±0.52に対し，頭頸部癌1.75±0.96，精巣癌2.33±0.58と有意に高かった(それぞれp<0.05)．

3．p53蛋白発現別にみたCD44s，CD44v6の発現(表12)

肺転移巣90例全体では，CD44sスコアはp53蛋白陽性例では0.81±1.00，p53蛋白陰性例では0.71±0.94であり，両群間に有意差は認めなかった．CD44v6スコアはp53蛋白陽性例では1.16±1.14，p53蛋白陰性例では1.02±1.19であり，こちらも両群間に有意差は認めなかった．これらを上皮性腫瘍，非上皮性腫瘍性にわけて検討するとp53蛋白陰性例でCD44sスコアは上皮性腫瘍1.06±0.98，非上皮性腫瘍0.27±0.67であり上皮性腫瘍で有意に高かった(p<0.01)．また，CD44v6スコアも上皮性腫瘍1.44±1.27，非上皮性腫瘍0.50±0.86であり，上皮性腫瘍で有意に高かった(p<0.01)．原発巣別では，p53蛋白陽性例ではCD44s，CD44v6スコアとも有意差はなく，p53蛋白陰性例では，CD44sスコアは大腸・直腸癌1.42±0.90，頭頸部癌2.00±0.00であり，腎癌0.36±0.67，軟部組織悪性腫瘍0.33±0.27，骨・軟骨悪性腫瘍0.20±0.63に比べ有意に高かった(それぞれp<0.05)．CD44v6スコアは大腸・直腸癌1.42±1.17，子宮癌2.00±1.73であり，腎癌0.64±1.03，軟部組織悪性腫瘍0.73±1.03，骨・軟骨悪性腫瘍0.20±0.42に比べ有意に高く(それぞれp<0.05)，骨・軟骨悪性腫瘍に比べ頭頸部癌3.00±0.00と有意に高かった．

4．K-ras (codon 12) 点突然変異の解析(表13)

肺転移巣90例のうちPCR反応後の電気泳動で増幅の確認できたのは81例であった．この81例を対象にK-ras点突然変異の解析を行った．81例中K-ras点突然変異を認めたのは27例(33.3%)であり，その種類は1番目の塩基がグアニンからシトシンに変異し-CGT-となり，アルギニンをコードするようになったものが8例，1番目の塩基がアデニンに変異し-AGT-となりセリンをコードするようになったものが3例，2番目の塩基が

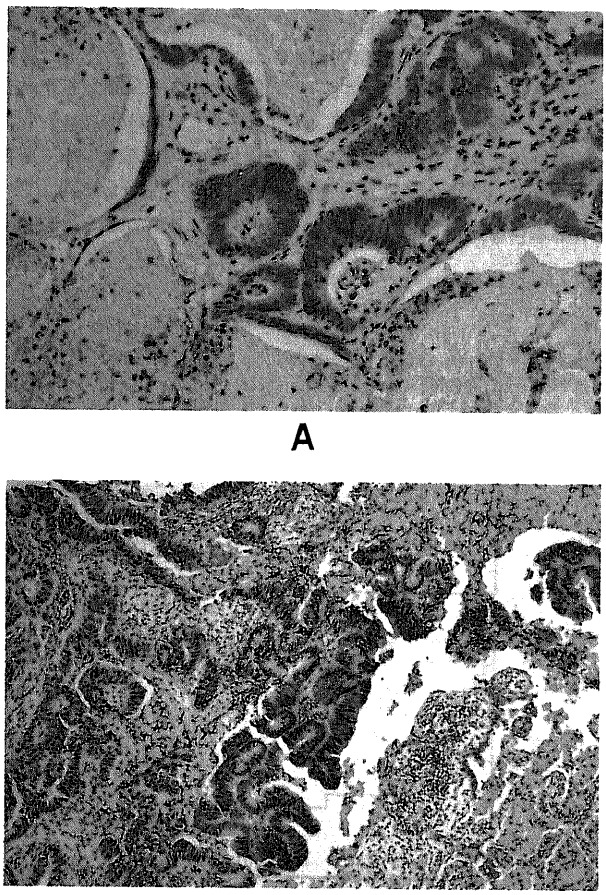

Fig. 9. Immunohistochemical staining of CD44s and CD44v6 in metastatic adenocarcinoma of lung from colon. (A) Both cell membranes and cytoplasm are stained by monoclonal antibody of CD44s (×200). (B) Cytoplasms are stained by monoclonal antibody of CD44v6 (×100).

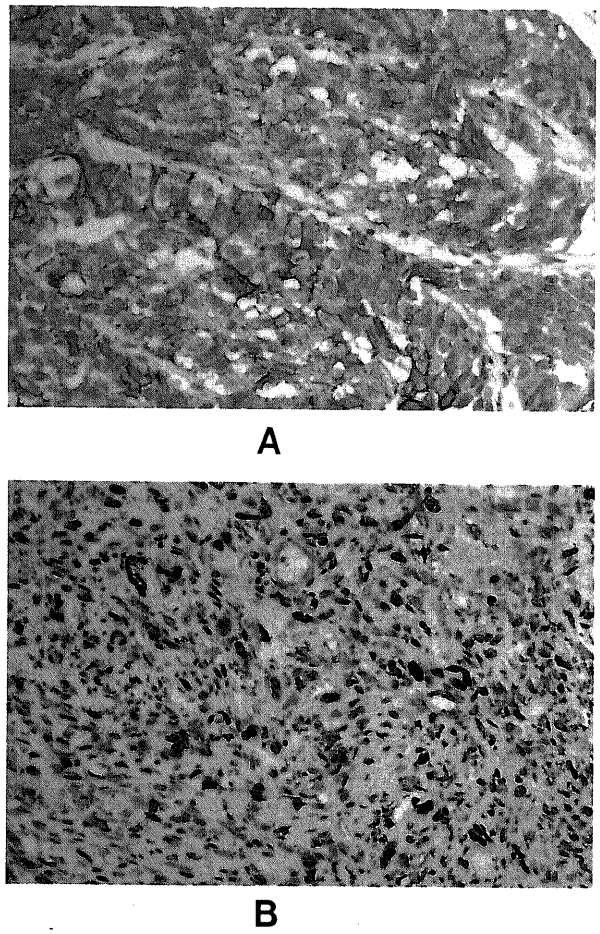

Fig. 10. Immunohistochemical staining of CD44s and p53 protein of metastatic lung tumor. (A) Metastatic lung adenocarcinoma from breast is stained by monoclonal antibody of CD44s(×400). Cell membranes are strongly stained. (B) Metastatic osteosarcoma of lung is stained by monoclonal antibody of p53 protein (×200). p53 protein is present in nuclei.

Table 10. Correlation between survival rate and expressions of CD44s or CD44v6 divided into p53 (+) and p53 (−) cases, K-ras mutants and wild types in 74 curatively resected primary non-small cell lung cancer cases

Groups	Expression of CD44s	Expression of CD44v6	No. of cases examined	% survival in years of 3	% survival in years of 5	p-value*
p53 (+) cases						
Total			41	36.6	24.4	
	+[a]		14	50.0	28.6	NS
	−[b]		27	29.6	22.2	
		+[c]	25	44.0	32.0	p=0.08
		−[d]	16	25.0	12.5	
	+	+	13	53.8	30.8	NS
	−	−	15	26.7	13.3	
p53 (-) cases						
Total			33	47.0	37.6	
	+		16	60.0	46.7	p<0.05
	−		17	35.3	29.4	
		+	18	55.6	38.9	NS
		−	15	35.9	35.9	
	+	+	10	70.0	50.0	p=0.09
	−	−	9	33.3	33.3	
K-ras mutants						
Total			22	43.0	28.6	
	+		10	55.6	22.2	NS
	−		12	33.3	33.3	
		+	12	58.3	33.3	NS
		−	10	22.2	22.2	
	+	+	7	71.4	28.6	NS
	−	−	7	28.6	28.6	
K-ras wild types						
Total			39	41.0	33.3	
	+		14	57.1	50.0	NS
	−		25	32.0	24.0	
		+	23	39.1	34.8	NS
		−	16	43.8	31.2	
	+	+	11	54.5	45.5	NS
	−	−	13	38.5	23.1	

All cases were underwent curative operation. p53 (+), p53 protein-positive ; p53 (−), p53 protein-negative. [a] +, CD44s-positive cases. [b] −, CD44s-negative cases. [c] +, CD44v6-positive cases. [d] −, CD44v6-negative cases. * Generalized Wilcoxon test. NS, not significant.

Table 11. Expressions of CD44s, CD44v6 and p53 protein in 90 metastatic lung tumors

Origin	No. of cases examined	Score ($\bar{x}\pm$SD) CD44s	CD44v6	p53 protein
All	90	0.75±0.96	1.07±1.17	1.16±1.16
Epithelial tissues	49	1.02±0.96 *	1.52±1.12 *	1.25±1.07
Non-epithelial tissues	41	0.42±0.84	0.63±0.86	1.05±1.26
Epithelial tumors				
Colon and rectum	21	1.29±0.96	1.52±1.12	1.38±1.24
Kidney	11	0.36±0.67	0.64±1.03	0.46±0.52
Uterus	5	1.20±1.30	2.40±1.34	1.20±0.84
Breast	4	0.75±0.96	2.00±1.41	1.50±1.00
Head and neck	4	1.71±0.50	2.25±1.50	1.75±0.96
Testis	3	0.33±0.58	0.00±0.00	2.33±0.58
Ovary	1	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00
Non-epithelial tumors				
Soft tissues	23	0.65±0.98	0.78±0.95	1.04±1.19
Bone and cartilage	17	0.12±0.49	0.47±0.72	1.12±1.41
Uterus	1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

* p<0.05.

チミンに変異しバリンをコードするようになったものが16例であった．点突然変異の頻度は上皮性腫瘍21例 (47.7%)，非上皮性腫瘍6例 (16.2%) で上皮性腫瘍で有意に高かった (p<0.05)．原発巣別に点突然変異の頻度をみると，大腸癌が13例 (65.0%) であり，軟部組織悪性腫瘍4例 (19.0%)，骨．軟骨悪性腫瘍2例 (13.3%) に比べ有意に高く (それぞれp<0.05)，骨・軟骨悪性腫瘍に比べ子宮が3例 (60.0%) と有意に高かった (それぞれp<0.05)．

5．K-ras (コドン12) 点突然変異の有無とCD44s，CD44v6の発現 (表14)

肺転移巣81例全体におけるK-ras点突然変異症例のCD44sスコアは1.04±1.02，K-ras野生型症例では0.59±0.84でありK-ras点突然変異症例で高い傾向を認めた (p=0.07)，また，CD44v6スコアはK-ras点突然変異症例で1.30±1.20，K-ras野生型症例では0.93±1.15であり有意差は認めなかった．上皮性腫瘍，非上皮性腫瘍にわけてみると，K-ras野生型症例においてCD44sスコアは上皮性腫瘍0.91±0.85，非上皮性腫瘍0.36±0.76であり上皮性腫瘍で有意に高く (p<0.05)，CD44v6スコアも上皮性腫瘍1.48±1.34，非上皮性腫瘍0.52±0.77と上皮性腫瘍で有意に高かった (p<0.05)．K-ras点突然変異症例ではCD44s，CD44v6ともに上皮性腫瘍群，非上皮性腫瘍群で有意差はなかった．原発

Table 12. Correlations between expressions of CD44s or CD44v6 and expression of p53 protein in 90 metastatic lung tumors

Origin	No. of cases examined	No. (%) of p53 (+) cases	CD44s score ($\bar{x}$±SD)		CD44v6 score ($\bar{x}$±SD)	
			p53 (+) cases	p53 (−) cases	p53 (+) cases	p53 (−) cases
All	90	32 (35.6)	0.81±1.00	0.71±0.94	1.16±1.14	1.02±1.19
Epithelial tissues	49	17 (34.7)	0.94±0.97	1.06±0.98 *	1.41±1.33	1.44±1.27 *
Non-epithelial tissues	41	15 (36.6)	0.67±1.05	0.27±0.67	0.87±0.83	0.50±0.86
Epithelial tumors						
Colon and rectum	21	9 (42.9)	1.11±1.05	1.42±0.90	1.67±1.12	1.42±1.17
Kidney	11	0	0.00±0.00	0.36±0.67	0.00±0.00	0.64±1.03
Uterus	5	2 (40.0)	1.00±1.41	1.33±1.53	3.00±0.00	2.00±1.73
Breast	4	1 (25.0)	0.00±0.00	1.00±1.00	0.00±0.00	2.67±0.58
Head and neck	4	2 (50.0)	1.50±0.71	2.00±0.00	1.50±2.12	3.00±0.00
Testis	3	3 (100)	0.33±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Ovary	1	0	0.00±0.00	2.00±0.00	0.00±0.00	2.00±0.00
Non-epithelial tumors						
Soft tissues	23	8 (34.8)	1.25±1.17	0.33±0.27	0.88±0.84	0.73±1.03
Bone and cartilage	17	7 (41.2)	0.00±0.00	0.20±0.63	0.86±0.90	0.20±0.42
Uterus	1	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

p53 (+), p53 preotein-positive ; p53 (−), p53 protein-negative. * p<0.01.

Table 13. Frequency of K-ras point mutations (codon12) in 81 metastatic lung tumors

Origin	No. of cases examined	No. (%) of K-ras mutants	Variations of mutaions (no. of cases)					
			-CGT- (Arg)	-TGT- (Cys)	-AGT- (Ser)	-GCT- (Ala)	-GTT- (Val)	-GAT- (Asp)
All	81	27 (33.3)	8	0	3	0	16	0
Epithelial tissues	44	21 (47.7)	6	0	3	0	12	0
Non-epithelial tissues	37	6 (16.2)	2	0	0	0	4	0
Epithelial tumors								
Colon and rectum	20	13 (65.0)	4	0	2	0	7	0
Kidney	8	2 (25.0)	1	0	0	0	1	0
Uterus	5	3 (60.0)	0	0	1	0	2	0
Breast	4	2 (50.0)	1	0	0	0	1	0
Head and neck	4	0	0	0	0	0	0	0
Testis	2	1 (50.0)	0	0	0	0	1	0
Ovary	1	0	0	0	0	0	0	0
Non-epithelial tumors								
Soft tissues	21	4 (19.0)	2	0	0	0	2	0
Bone and cartilage	15	2 (13.3)	0	0	0	0	4	0
Uterus	1	0	0	0	0	0	0	0

Arg, arginine ; cys, cysteine ; ser, serine ; ala, alanine ; val, valine ; asp, asparatic acid. * p<0.05.

Table 14. Correlations between expression of CD44s or CD44v6 and K-ras point mutations (codon12) in 81 metastatic lung tumors

Origin	No. of cases examined	No. (%) of K-ras mutants	CD44s score ($\bar{x}\pm$SD)		CD44v6 score ($\bar{x}\pm$SD)	
			Mutants	Wild types	Mutants	Wild types
All	81	27 (33.3)	1.04±1.02	0.59±0.84	1.30±1.20	0.93±1.15
Epithelial tissues	44	21 (47.7)	1.19±1.03	0.91±0.85 *	1.38±1.20	1.48±1.34 *
Non-epithelial tissues	37	6 (16.2)	0.50±0.84	0.36±0.76	1.00±1.27	0.52±0.77
Epithelial tumors						
Colon and rectum	20	13 (65.0)	1.31±0.95	1.00±0.82	1.39±1.04	1.57±1.27
Kidney	8	2 (25.0)	0.50±0.33	0.33±0.82	1.00±1.41	0.17±0.41
Uterus	5	3 (60.0)	1.67±1.53	0.50±0.71	2.00±1.73	3.00±0.00
Breast	4	2 (50.0)	1.00±1.41	0.50±0.71	1.50±2.12	2.50±0.71
Head and neck	4	0	0.00±0.00	1.75±0.50	0.00±0.00	2.25±1.50
Testis	2	1 (50.0)	0.00±0.00	1.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Ovary	1	0	0.00±0.00	2.00±0.00	0.00±0.00	2.00±0.00
Non-epithelial tumors						
Soft tissues	21	4 (19.0)	0.75±0.96	0.53±0.87	1.50±1.30	0.53±0.80
Bone and cartilage	15	2 (13.3)	0.00±0.00	0.15±0.56	0.00±0.00	0.54±0.78
Uterus	1	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

* $p<0.05$, ** $p<0.10$.

Table 15. Comparisons of disease-free survivial rates divided into CD44s (+) and CD44s (−) cases, CD44v6 (+) and CD44v6 (−) cases, p53 (+) and (−) cases, K-ras wild types and mutants in 90 cases metastatic lung tumors

Groups	Parameters	No. of cases examined	% DFS in years of			p-value*
			1	3	5	
All		90	68.3	42.0	23.8	
	CD44s (+)	22	68.2	35.8	29.8	NS
	CD44s (−)	68	67.3	43.5	22.1	
	CD44v6 (+)	32	75.0	42.7	32.2	NS
	CD44v6 (−)	58	63.3	41.0	18.5	
	p53 (+)	32	53.1	23.7	9.0	p<0.01
	p53 (−)	58	75.6	51.5	31.7	
	K-ras mutants	27	74.1	51.6	21.5	NS
	K-ras wild types	54	64.4	33.6	20.4	
Epithelial tissues		49	77.0	49.8	32.4	
	CD44s (+)	17	64.7	40.3	40.3	NS
	CD44s (−)	32	81.1	53.3	28.4	
	CD44v6 (+)	24	79.2	44.3	35.4	NS
	CD44v6 (−)	25	71.8	53.9	27.0	
	p53 (+)	17	70.6	32.7	13.1	NS
	p53 (−)	32	78.1	57.5	42.1	
	K-ras mutants	21	76.7	56.2	28.4	NS
	K-ras wild types	23	78.3	37.2	31.9	
Non-epithelial tissues		41	58.0	32.8	14.0	
	CD44s (+)	5	80.0	20.0	0	NS
	CD44s (−)	36	53.8	34.6	16.2	
	CD44v6 (+)	8	62.5	37.5	25.0	NS
	CD44v6 (−)	33	56.8	31.6	12.6	
	p53 (+)	15	33.3	13.3	0	p<0.01
	p53 (−)	26	72.4	44.2	20.1	
	K-ras mutants	6	66.7	33.3	0	NS
	K-ras wild types	31	54.0	30.4	11.6	

DFS, disease-free survival ; CD44s (+), CD44s-positive cases ; CD44s (−), CD44s-negative cases ; CD44v6 (+), CD44v6-positive cases ; CD44v6 (−), CD44v6-negative cases ; p53 (+), p53 protein-positive cases ; p53 (−), p53 protein-negative cases. * Generalaized Wilcoxon test. NS, not significant.

Table 16. Comparisons of disease-free survival rates divided into CD44s (+) and (−) cases, p53 (+) and (−) cases in metastatic lung tumors from colon and rectum, soft tissues and bone and cartilage

Origin	Parameters	No. of cases examined	% DFS in years of 1	3	5	p-value*
Colon and rectum						
	CD44s (+)	9	62.5	50.0	0	p<0.05
	CD44s (−)	12	91.7	55.0	9.2	
Soft tissues						
	p53 (+)	8	50.0	25.0	0	p=0.08
	p53 (−)	15	80.0	40.0	20.0	
Bone and cartilage						
	p53 (+)	7	14.3	0	0	p<0.05
	p53 (−)	10	56.2	45.0	11.2	

DFS, disease-free survival ; CD44s (+), CD44s-positive cases ; CD44s (−), CD44s-negative cases ; p53 (+), p53 protein-positive cases ; p53 protein (−), p53 protein-negative cases. * Generalaized Wilcoxon test.

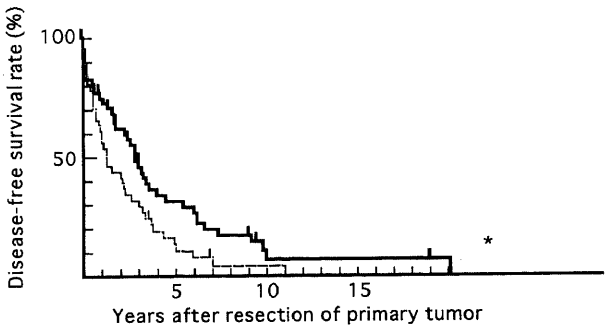

Fig 11. Disease-free survival curves of 90 patients with metastatic lung tumors divided into epithelial and non-epithelial origin. ·····, non-epithelial origin (n=41); ——, epithelial origin (n=49). * p <0. 01, by generalized Wilcoxon test.

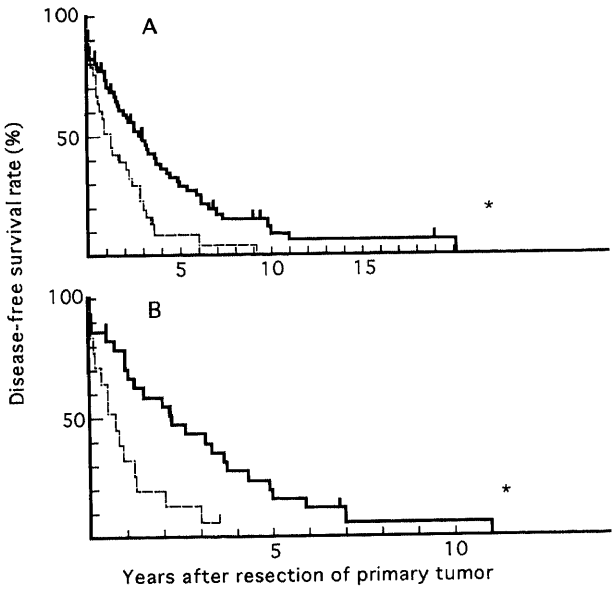

Fig. 12. Disease-free survival curves of patients with metastatic lung tumors divided into cases with and without p53 protein expression. (A) For all cases (n=90). ·····, cases with p53 protein expression (n=32); ——, cases without p53 protein expression (n=58). (B) For non-epithelial tumor cases (n=41). ·····, cases with p53 protein expression (n=15); ——, cases without p53 protein expression (n=26). * p <0. 01, by generalized Wilcoxon test.

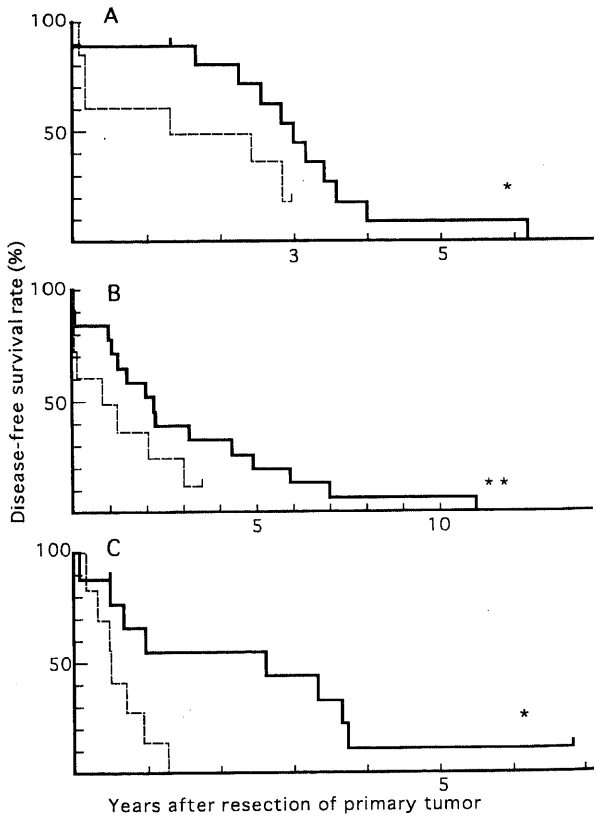

Fig. 13. Disease-free survival curves of patients with metastatic lung tumors. (A) For cases of colon and rectum origin (n=21). ·····, cases with CD44s expression (n=9); ——, cases without CD44s negative cases (n=12). (B) For cases of soft tissues origin(n=23). ·····, cases with p53 protein expression (n=8); ——, cases without p53 protein expression (n=15). (C) For cases of bone and cartilage origin (n=17). ·····, cases with p53 protein expression (n=7); ——, cases without p53 protein expression (n=10). * p < 0. 05, by generalized Wilcoxon test.

巣別にみると，CD44s スコアは K-ras 点突然変異症例，K-ras 野生型症例のどちらも各原発巣間で有意差はなかった．また，CD44v6スコアは K-ras 点突然変異症例では各原発巣間で有意差はなかったが，K-ras 野生型症例では子宮癌3.00±0.00，乳癌2.50±0.71であり，腎癌0.17±0.41，軟部組織悪性腫瘍0.53±0.80，骨・軟骨悪性腫瘍0.54±0.78に比べ有意に高く（それぞれ $p<0.05$），軟部組織悪性腫瘍に比べ，頭頸部癌2.25±1.50と有意に高かった（$p<0.05$）．

6．CD44s，CD44v6，p53蛋白発現およびK-ras点突然変異の有無による無再発生存率の検討

原発巣手術日から，肺転移巣確認日までを無再発生存期間とし，各測定値項目別，原発巣別に無再発生存率を Kaplan-Meier 法にて算出し比較検討した（表15，16）．肺転移巣90例全体の1年無再発生存率は，68.3%，3年無再発生存率は42.0%，5年無再発生存率は23.8%であった．上皮性腫瘍49例の1年無再発生存率は77.0%，3年無再発生存率は49.8%，5年無再発生存率は32.4%であり，非上皮性腫瘍41例では，1年無再発生存率は58.0%，3年無再発生存率は32.8%，5年無再発生存率は14.0%であり，上皮性腫瘍に比べ非上皮性腫瘍で有意に無再発生存率は低かった（$p<0.05$，図11）．次に，各測定項目別にみると，症例全体ではp53蛋白陽性症例が陰性症例より無再発生存率が有意に低く（$p<0.01$，図12A），非上皮性腫瘍性でもp53蛋白陽性例が陰性例より無再発生存率が有意に低かった（$p<0.05$，図12B）．上皮性腫瘍では各測定項目間で無再発生存率に有意差は認めなかった．原発巣別では，大腸・直腸癌で CD44s 陽性例が陰性例に比べ無再発生存率が有意に低く（$p<0.05$，図13A），軟部組織悪性腫瘍ではp53蛋白陽性例が陰性例に比べ無再発生存率が有意に低い傾向を示した（$p=0.08$，図13B）．骨・軟骨悪性腫瘍でもp53蛋白陽性例が陰性例に比べ無再発生存率は有意に低かった（$p<0.05$，図13C）．

考　　察

CD44 は約90kDaの膜貫通型蛋白質であり，細胞間接着および細胞と細胞間基質の接着を司る分子である．CD44s 遺伝子は Seedら[27]，Goldsteinら[28] によりヒトからクローニングされた．分子構造は，細胞外ドメイン341個，膜貫通部21個，細胞質部分72個の計434個のアミノ酸からなり，これから37kDaのコア蛋白が形成される．このコア蛋白質は CD44s 分子の約40%にすぎず，残りの60%はO型およびN型糖鎖であり，糖鎖修飾とリガンドの結合部位の相違によりさまざまな機能がもたらされるといわれている[7]．細胞内領域は類似蛋白キナーゼC，GTP の会合を行う部位やアンキリンを介してアクチンフィラメントに会合する部位が存在している[29]．また，セリン残基の1部はCキナーゼの基質となりうると同時にG蛋白質ファミリーとの相同性を1部に有し，G蛋白質と結合しうることも報告されており，これらを介する情報伝達が，リガンドの1つであるヒアルロン酸との接着に関与すると考えられている[30)~32]．前述のように mRNA の成熟過程で選択的スプライシングによりエクソン 6v がエクソン 5s と 6s の間に挿入され発現した分子が CD44v6 である．現在では変異型 CD44 は20種類以上見出されており[33]，その分子構造はスプライシングにより挿入され発現した部位にコンドロイチン硫酸付着部位が多数認められる．CD44s のリガンドとして現在考えられているのは，ヒアルロン酸[34]，Ⅰ型コラーゲン，Ⅳ型コラーゲン，フィブロネクチン[35]などである．ヒアルロン酸は全身の組織の脈管基底膜や，細胞外マトリックスに含まれ，肺はその発現の最も活発なところとして知られている[36)37]．この事実は原発性肺癌，転移性肺腫瘍の両者，つまり肺に形成される悪性腫瘍における CD44s の役割を考えるときに非常に重要である．また，ヒアルロン酸との接着において活性型と非活性型が存在するといわれており[38]，ヒアルロン酸への接着能の亢進は CD44s の発現量の変化を伴わないといわれている[39]．一方，CD44v6 を含めた変異型 CD44 のリガンドは，選択的スプライシング機構により挿入された遺伝子に応じて CD44s とはリガンドが異なることが示唆されているものの，詳細は今のところ不明である．CD44s の癌関連以外の機能としてリンパ球ホーミングリセプターとしての働き[40)41]，造血に関わる働き[42] が知られている．リンパ球ホーミングとは血液中のリンパ球が血管壁を通過し，輸出リンパ管，胸管から再び血液中に戻り再循環することで[43]，この際，リンパ球がリンパ節の皮質と髄質の間に存在する高内皮細静脈（high endothelial venule, HEV）内皮に接着することが必須である．CD44 はこの接着に関連しているとされる．癌細胞も転移の過程で標的臓器で脈管内皮細胞に接着し，脈管を通過し標的臓器に生着するが，この類似性が CD44 と転移の関連が注目されるようになった1つの要因である．一方，CD44v6 に関しては癌転移に関係すること以外その機能は不明である．

原発性非小細胞肺癌におけるCD44発現に関する報告は現在までいくつかなされている．大神ら[44] は，腺癌18例，扁平上皮癌12例において CD44 の mRNA 発現を検討している．その結果 CD44s 発現は癌組織，正常組織共に全例で認められたが，上皮型 CD44 である CD44E は癌組織全例で認められたものの正常組織では2例にしか認められず，臨床病期および他の背景因子とこれらの発現との間には相関を認めなかったとしている．Arizaら[45]は，免疫組織染色を用い非小細胞癌と小細胞癌におけるCD44s，CD44v3，CD44v6 蛋白発現を検討し，非小細胞癌では32例中28で3者のうち少なくとも1つが発現しており，小細胞癌では3者とも全く発現がなく，小細胞癌では転移のメカニズムは CD44 に依存しないとしている．Givehchianら[46] は，正常肺組織，肺癌組織，所属転移リンパ節を対象とし逆転写 PCR（reverse transcription PCR, RT-PCR），免疫組織染色を用い CD44s，変異型 CD44 の発現を検討した結果，mRNAレベル，蛋白レベルの両者で CD44s および CD44v5，CD44v6 の発現は正常肺組織，扁平上皮癌で高く，転移能の高い小細胞癌では CD44 の発現はみられなかったとしている．また，腺癌においては CD44s の発現は他組織に比べ低く，これらの結果から呼吸器系の組織では，変異型 CD44 は気管上皮への分化に重要な役割を果たし，転移とは無関係であるとしている．

今回の検討では，原発性非小細胞肺癌臨床検体を対象として免疫組織染色を用い CD44s，CD44v6 蛋白発現を検討した．腫瘍細胞の10%以上が染色されたものを陽性とすると，陽性率は CD44s, 34.5%（腺癌30.9%，扁平上皮癌39.6%），CD44v6, 60.3%（腺癌44.1%，扁平上皮癌83.3%）であった．CD44s 発現は高分化型で有意に高く，CD44v6 発現は扁平上皮癌で有意に高かったが，それ以外の臨床病理学的因子との関連はなく従来の報告とほぼ同様であった．しかしながら，治癒切除症例において腫瘍組織の CD44s 発現，CD44v6 発現の低い症例はともに予後不良であり，これは本研究で得られた新しい知見である．従来の CD44についての研究は CD44v6 を含む変異型 CD44 と転移と

の関連が中心であり，変異型 CD44 の発現は転移と相関し予後不良であるという報告が中心であった．しかし，肺に関しては上述のように変異型 CD44 発現そのものは癌に特異的ではなく，必ずしも癌の進展や転移に関与しているとはいえない．むしろ，正常細胞の分化など生理学的な役割を担っている可能性が考えられる．最近，喉頭癌において CD44s，CD44v6 の発現減弱は予後不良因子であるという本知見と同様の報告[47] がなされたことを考えると，この結果は呼吸器系組織の特徴といえるかもしれない．

p53遺伝子は癌抑制遺伝子であり，その異常は細胞の癌化において重要な役割をしており，多くの癌で高頻度に変異を起こしていることが知られている[48]．その生理機能は DNA が損傷を受けたとき細胞周期を G1 期に一時的に停止させることとされている．p53遺伝子に変異が生じるとp53蛋白の半減期が長くなり，モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色によってp53蛋白を染色することが可能になりp53遺伝子異常を有する細胞を検出できるようになる．p53蛋白発現と CD44 発現に関する報告は肺癌に関しては極めて少ないが，大腸癌においては良性腺腫からの癌化 (adenoma-carcinoma sequence) との関連でいくつか報告されている．Mulderら[49] は，初期の腺腫，晩期の腺腫，Dukes 分類A, Bの癌および Dukes 分類C, Dの癌においてp53蛋白発現および CD44v6 発現を免疫組織染色にて調べ正常大腸粘膜と比較したところ，p53蛋白発現，CD44v6 発現ともに正常粘膜に比べ有意に高く，腫瘍が悪性化するにしたがって増加したことよりp53蛋白，CD44v6 発現は大腸癌の良性腺腫からの癌化に重要な役割をしていると報告している．Jacksonら[50]，Kimら[51] もほぼ同様の報告であり大腸癌においては両者は発癌機構に重要な役割を果たしているようである．肺癌においては臨床的に良性腫瘍検体を得ることが難しく，本研究においても上記のような検討は行えなかった．原発性非小細胞肺癌と予後との関連について教室の家接[52] は腺癌治癒切除症例においてp53蛋白陽性例の予後が有意に不良であったと報告している．今回の検討では，p53蛋白陽性群，陰性群にわけ，それぞれの群でCD44s，CD44v6 発現と予後を比較検討した結果からp53蛋白陽性群では CD44v6 陽性例の予後が良好である傾向を示し，p53蛋白陰性群では CD44s 陽性例の予後が有意に良好であった．肺癌患者の予後はさまざまな因子によって左右されその予測は難しいが，CD44s，CD44v6，p53蛋白発現を組み合わせることにより，従来より細かく予後の予測をしうることが示唆された．

ras遺伝子は，H-ras，K-ras，N-rasの３種が知られており，その遺伝子産物は GTP を介した細胞内伝達に関与すると考えられている． ras 遺伝子の点突然変異はコドン12，コドン61に起こり，12番目，61番目のアミノ酸が置換される場合が圧倒的に多いが，低頻度ではあるがコドン13にも変異が起こることが知られている[53]．ヒト原発性非小細胞肺癌では15～50% の頻度で腺癌にかなり特異的に ras 点突然変異が認められ，H-, K-, N-３種の ras 遺伝子のうち K-ras のコドン12の点突然変異が圧倒的に多い[54)~60]．それゆえ本研究では，K-ras コドン12にしぼって点突然変異を検索し，原発性肺癌において点突然変異発生率33.0% (腺癌42.6%，扁平上皮癌20%) の結果を得た．

点突然変異の検索手法としてホルマリン固定パラフィン包埋標本から DNA を抽出し，PCR 反応で K-ras コドン12を含む領域を増幅後，塩化テトラメチルアンモニウムを洗浄に用いたドットブロットハイブリダイゼーション法を行った[54]．本法は点突然変異の有無と同時にその変異塩基配列を決定できることが特徴であるが，１塩基対の違いを検出するには，点突然変異がプローブの中央に位置するように設計したアレル特異的オリゴヌクレオチド (allele specific oligonucleotide, ASO) プローブを使用し，塩化テトラメチルアンモニウムによる厳しい洗浄条件の設定が必要となる[61]．この洗浄条件の設定に時間を要す点が難点であるが，DNAの1本鎖高次構造多型 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) を用いた点突然変異解析法ではそのままでは変異塩基配列が決定できないこと，直接シークエンス法では大量の検体を処理するには費用と時間がかかることを考えると良い方法であると思われる．また，ホルマリン固定パラフィン包埋標本から DNA を抽出し検索をおこなったことにより，同一標本の免疫組織染色とあわせ各因子と長期予後との関連を検討しえたことは特記されるべきである．

ras 遺伝子は点突然変異により活性化し，活性化した ras 遺伝子の導入発現はある種の正常細胞に悪性形質を付与し，種々の癌細胞の転移能を実験的に増強させることが知られている．現在までに，活性化 H-ras 導入 NIH3T3 継代培養マウス線維芽細胞の転移能獲得[10)12]，活性化 H-ras 導入 REF 初代培養ラット胎児線維芽細胞の転移能獲[11]，活性化 K-ras 導入 BALB/c3T3マウス線維芽細胞[12] の転移能獲得などが報告されている．また，活性化 ras 導入 REF 細胞では CD44s と CD44v の異常発現がみられ[9]，これらの事実から本研究において臨床検体で K-ras 点突然変異を調べ検討したが，CD44s，CD44v6 発現の両者ともに K-ras 点突然変異と有意な相関がみられなかった．これは ras 活性化による CD44 発現の制御は悪性形質を獲得した細胞に普遍的なものでなく，個々の細胞の性質によるものであることを示唆している．K-ras 点突然変異の有無と予後の関連については，治癒切除，非治癒切除に関わらず K-ras 点突然変異症例の予後が不良であるという報告[58]，治癒切除症例に限ると K-ras 点突然変異症例の予後が不良であるとする報告[59]，リンパ節転移のない治癒切除症例に限るとK-ras点突然変異症例の予後が不良であるという報告[54]，ⅢA期症例に限ると K-ras 点突然変異症例の予後が不良であるとする報告[62]，Ⅰ期に限ると K-ras点突然変異症例の予後が不良であるという報告[63]などがあり一定した見解はない．今回の検討では，治癒切除症例において K-ras点突然変異の有無で予後に有意差は認めなかった．

原発性非小細胞肺癌において，CD44s，CD44v6 発現をp53蛋白の発現別，K-ras 点突然変異の有無別に検討した結果から，特に腺癌においてp53蛋白陰性症例および K-ras 野生型症例では，リンパ節転移の有無および遠隔転移の有無と CD44s の発現の間に有意な相関を認め，これらの症例では CD44s 発現はリンパ節転移，遠隔転移を抑制していることが示された．癌細胞の転移は，1) 癌細胞の原発巣からの離脱，2) 原発巣付近の脈管 (血管・リンパ管) 基底膜への浸潤と脈管内への侵入，3) 標的臓器内脈管内皮への接着と脈管外への脱出，4) 標的臓器内での生着と多くの段階を経て成立する．従来，CD44は各段階の中で3) におけるヒアルロン酸の発現の認められる血管内皮との接着に関する部分への関与が有力視されてきた[29]．しかし，今回の検討の結果は CD44s 発現が減少すると転移が生じやすいというものであり，従来の見解では説明できない．もともと，CD44s の機能は前述のように細胞間接着および細胞と細胞間基質の接着である．この働きは肺癌細胞においてもp53遺伝子異

常，K-ras 点突然変異のない症例では正常に機能していると仮定するとこの結果を理解しやすい．すなわちp53遺伝子異常，K-ras点突然変異のない症例においては CD44s は癌細胞間，あるいは癌細胞と基質間の接着に重要な働きをし，その発現の減弱は癌細胞の原発巣からの離脱を容易にし転移が成立しやすくなる，という仮説が考えられる．しかしp53遺伝子異常，K-ras 点突然変異のある症例では，この CD44s の接着能が保存されているのかどうかは今回の研究からは明らかにできなかった．

次に，転移性肺腫瘍における外科的問題の１つとして転移巣からの２次的な肺所属リンパ節転移がある．上皮性腫瘍肺転移巣はリンパ節転移を伴いやすく，それゆえ手術時にリンパ節郭清が必要であるが，非上皮性腫瘍肺転移巣からのリンパ節転移はまれでリンパ節転移はあまり考慮せず部分切除で十分であるといわれている[22)64)]．また，肺転移巣術後の非上皮性腫瘍の予後は上皮性腫瘍に比べて不良であるなど[23)]，両者の間には臨床面にさまざまな相違がある．本研究においては，この相違を生物学的に明らかにすることも大きな目的の１つであった．結果はCD44s，CD44v6 発現，K-ras 点突然変異の頻度ともに上皮性腫瘍肺転移巣に比べ非上皮性腫瘍肺転移巣で有意に低く，転移巣における各因子の発現を原発巣別に見ると，CD44s 発現は大腸・直腸癌，頭頸部癌で高く，腎癌，軟部組織悪性腫瘍，骨・軟骨悪性腫瘍で低かった．CD44v6 発現は大腸・直腸，子宮，頭頸部で高く腎，軟部組織，骨・軟骨低かった．p53蛋白発現は腎のみ低かった，K-ras 点突然変異の頻度は大腸・直腸で高く軟部組織骨・軟骨で低かった．各原発巣における CD44s および CD44v6 の発現と転移の関係を検討した報告をみると，大腸癌では，CD44v6 の mRNA 発現が肝転移のある原発巣で有意に高かったという報告[29)]，蛋白発現を免疫組織染色を行い検討し大腸癌原発巣において CD44v6 を発現する症例ほど予後不良であるという報告がある[65)]．腎癌では，CD44v6 の発現は全く認められず，CD44v10 の発現が悪性度と相関するといわれている[66)]．腎癌は本研究においても，上皮性腫瘍でありながら非上皮性腫瘍性に近い発現パターンを全測定因子において示した．頭頸部癌では前述のようにCD44s，CD44v6 の発現減弱は予後不良因子であるという報告[67)]がある一方で，CD44v6 の発現している症例は予後不良であるという報告もある[68)]．しかし，軟部組織，骨・軟骨悪性腫瘍ではCD44s，CD44v6 発現に関するまとまった報告はされていない．

癌の転移は，癌の種類によってそれぞれ転移しやすい臓器が存在することが知られている．この癌転移の臓器特異性を説明するものに，以前から機械説及び，種と土壌 (seed and soil) 説の２つが知られている．機械説は，原発巣と標的臓器の解剖学的位置関係，動静脈シャントの存在，標的臓器と脈管系の位置関係など，主に物理的因子に着目して癌転移の臓器特異性を説明しようとしたものである．これに対し，種と土壌 (seed and soil) 説は1989年に Paget[69)]によって提唱された説であり，標的となる臓器，組織には特異的な微小環境があり，その環境に適する癌細胞がその臓器，組織で転移巣を形成するというものである．熊谷ら[19)~21)]は，マウス，ラットを用いた実験的転移モデルで，ヒト CD44s に相当する CD44 は Colon26，3LL などの代表的な血行性転移を示す腫瘍群で認められ，ヒトCD44E に相当すると思われる分子は，皮下接種によってリンパ節ならびに肺に転移を形成する腫瘍群で発現がみられたとしている．また，血行性，リンパ行性両経路で肺に転移を形成する腫瘍では CD44s，CD44E の両者の発現が認められ，肺に転移形成を認めない細胞株では CD44 の発現を全く認めなかったと述べ[69)70)]，CD44s のリガンドであるヒアルロン酸の発現が肺において最も活発であることから，ヒアルロン酸分布の臓器特異性が CD44s を発現する癌細胞の肺転移に関与していると報告している．

今回の検討では，転移性肺腫瘍の無再発生存率の検討において非上皮性腫瘍は上皮性腫瘍に比べ有意に低く，さらに非上皮性腫瘍性の中ではp53蛋白陽性例が有意に低かった．原発巣別では，軟部組織悪性腫瘍，骨・軟骨悪性腫瘍でp53蛋白が無再発生存率と有意な相関を認めた．CD44s 発現と無再発生存率の間に有意差を認めたのは大腸・直腸癌のみであり，CD44v6，K-rasは無再発生存率とは関係がなかった．今回の検討では原発巣における検索は行っていないので，各因子と転移巣形成について詳しい考察を行うことはできないが，非上皮性腫瘍ではp53蛋白発現が肺転移巣形成に関与している可能性があり，大腸・直腸癌では前述の熊谷らの説のごとくCD44s 発現が肺転移巣形成に関与している可能性が示唆された．また，90例というまとまった症例数を対象に肺転移巣においてCD44s，CD44v6 発現を検討し，p53蛋白発現とK-ras点突然変異の有無を含め検討した報告は他になく特記されるべきであり，本研究により上皮性腫瘍と非上皮性腫瘍の生物学的特徴の１部が明らかにできたと考える．

悪性腫瘍の転移は複雑な生物現象の結果として成立するものであり，また，１つの腫瘍でも癌細胞は部位によって形態学的にも生化学的にも異なっている．それゆえ，ある幾つかの因子のみをとってこの複雑な現象を簡潔に説明することは不可能である．しかし，近年続々と癌転移に関係する分子が同定されており，各々の分子が癌転移のプロセスのどこにどのように働いているのか１つづつ解明していくことが重要である．本研究では，原発性肺腺癌においてp53遺伝子異常，K-ras点突然変異のない症例では CD44s 発現は転移を抑制すること，原発性非小細胞肺癌において CD44s は予後因子となること，CD44v6 は転移と関係はなく，K-ras 点突然変異は CD44 発現調節とは関係ないことが示された．また，転移性肺腫瘍においては非上皮性腫瘍ではp53蛋白発現が，大腸・直腸癌では CD44s 発現が肺転移巣形成に関与している可能性が示唆された．

結　　論

原発性非小細胞肺癌116例，転移性肺腫瘍90例を対象に CD44s，CD44v6，p53蛋白発現を免疫組織染色法を用い測定し，また，同一検体でDNAを抽出しK-ras点突然変異の有無を検索し，以下の結論を得た．

原発性非小細胞肺癌では，

１．CD44s の発現は高分化型で有意に高く，CD44v6，p53蛋白の発現は腺癌に比べ扁平上皮癌で有意に高かった．逆に K-ras点突然変異 (コドン12) は扁平上皮癌に比べ腺癌で有意に多くみられた．CD44v6 の発現とリンパ節転移，遠隔転移の有無の相関は認められなかった．

２．腺癌ではp53蛋白陰性例，K-ras 野生型症例の両者で，CD44s 発現はリンパ節転移陰性例，遠隔転移のある症例で有意に高かった．

３．K-ras 点突然変異によるK-ras遺伝子活性化とCD44s，CD44v6発現には相関は認められなかった．

４．治癒切除症例74例の検討では，CD44s 発現の低い症例の

予後は有意に不良であり，CD44v6 発現においても同様の傾向であった．また，CD44s，CD44v6 の両者ともに発現していない症例の予後は有意に不良であった．

5．p53蛋白陽性例では，CD44v6 発現の低い症例は予後不良の傾向を認め，p53蛋白陰性症例では，CD44s 発現の低い症例で予後が有意に不良であった．

転移性肺腫瘍では，

6．CD44s，CD44v6 発現ともに非上皮性腫瘍肺転移巣に比べ上皮性腫瘍肺転移巣で有意に高かった．特に大腸・直腸，頭頸部原発の肺転移巣で発現が高く，腎，軟部組織，骨．軟骨原発の肺転移巣で発現が低かった．

7．K-ras 点突然変異の頻度は非上皮性腫瘍腫瘍肺転移巣に比べ上皮性腫瘍肺転移巣で有意に高く，特に大腸・直腸癌肺転移巣で高かった．

8．無再発生存率は，上皮性腫瘍に比べ非上皮性腫瘍で有意に低く，非上皮性腫瘍ではp53蛋白発現陽性例で有意に低かった．原発巣別にみると大腸・直腸癌では，CD44s 陽性例で有意に低く，軟部組織，骨・軟骨ではp53蛋白陽性例で有意に低かった．CD44v6 発現と無再発生存率の間に相関はなかった．

以上の結果から，原発性非小細胞肺癌では CD44s，CD44v6 の発現は予後予測因子になりうることが示唆され，腺癌においては，p53遺伝子異常，K-ras 点突然変異のない症例では CD44s発現は転移を抑制する働きをしていることが示唆された．転移性肺腫瘍では，非上皮性腫瘍ではp53蛋白の発現の有無が，大腸・直腸癌では CD44s が転移成立に関係していることが示唆された．

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辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます．また，終始，直接実験の御指導を賜りました川上和之博士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頂きました金沢大学医学部第1外科教室員の皆様に感謝いたします．

文　　献

1） 塩崎均．細胞接着ー特にカドヘリンについて．外科治療 71 : 160-164, 1994

2） Ohmori K. A distinct type of sialyl Lewis X antigen defined by a novel monoclonal antibody is selectively expressed on helper memory T cell. Blood 82 : 2797-2805, 1993

3） Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuka, K, Hasegawa A, Kiso M. Contribution of carbohydrate antigens sialyl lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. Cancer Res 53 : 354-361, 1993

4） Hirasawa M. Integrin expression and ability to extracellular matrix proteins and endothelial cells in lung cancer cell lines. Br J Cancer 70 : 466-473, 1994

5） 富田善彦．ヒト腎癌におけるインテグリン $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) / VCAMの役割．日本臨床 53 : 1666-1671, 1995

6） Liotta L. Tumor invasion and metastasis-role of the extra cellular matrix : Rhoads Memorial Award Recture. Cancer Res 46 : 1-7, 1986

7） 田中良哉，江藤澄哉．接着分子ハンドブック．CD44 update 構造と機能の多様性 (宮坂昌之編)，第1版，301-306頁，秀潤社，東京，1994

8） Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 65 : 13-24, 1991

9） Hofmann M, Rudy W, Gunthert U, Zimmer SG, Zawadzki V, Zoller M, Lichtner RB, Herrlich P, Ponta H. A link between ras and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. Cancer Res 53 : 1516-1521, 1993

10) Egan SE, Wright JA, Jarolim L, Yanagihara K, Bassin RH, Greenberg AH. Transformation by oncogenes encoding protein kinases induces the metastatic phenotype. Science 238 : 202-205, 1987

11) Pozzatti R, Muschel R, Williams J, Padmanabhan R, Howard B, Liotta L, Khoury G. Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. Science 232 : 223-227, 1986

12) Takiguchi Y, Takahashi Y, Kuriyama T, Miyamoto T. NIH3T3 transfectant containing human K-ras oncogene shows enhanced metastatic activity after in vivo tumor growth or co-culture with fibroblasts. Clin Exp Metastasis 10 : 351-360, 1992

13) Li ZH, Zheng J, Weiss LM, Shibata D. c-K-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung. Am J Pathol 144 : 303-309, 1994

14) Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. Environ Health Perspect 98 : 13-24, 1992

15) 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

16) Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D' Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. Oncogene 5 : 1603-1610, 1990

17) Sameshima Y, Matsuno Y, Hirohashi S, Shimosato Y, Mizoguchi H, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Alterations of the p53 gene are common and critical events for the maintenance of malignant phenotypes in small-cell lung carcinoma. Oncogene 7 : 451-457, 1992

18) Nicolson G. Organ specificity of tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev 1 : 5-9, 1988

19) 熊谷勝男，樗木俊聡．腫瘍の転移と接着分子．最新医学 46 : 2389-2394, 1991

20) 樗木俊聡，中村雅典，転移の臓器親和性を決定する接着分子と増殖因子．実験医学 10 : 236-241, 1992

21) 熊谷勝男，中山勝敏．癌細胞におけるサイトカインと接着分子の発現と転移能．Biothrapy 6 : 1829-1834, 1992

22) Putnam J, Roth J, Wesley M. Analysis of prognostic factors in patients undergoing resection of pulmonary metastasis from soft tissues sarcomas. J Thorac Cardiovasc Surg 87 : 260-265, 1984

23) Shimizu J, Hayashi Y, Morita K, Arano Y, Matsumoto I, Go T, Murakami S, Watanabe Y. Results of surgical treatment of pulmonary metastasis. J Sur Oncol 58 : 58-62, 1995
24) Resnick N. CD44 expression in human lung and brain cancers. AACR proceedings 36 : 1995, 1995
25) 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
26) 日本肺癌学会編．臨床・病理，肺癌取り扱い規約．改訂第4版，73-87頁，金原出版，東京，1995
27) Stamenkovic I, Seed B. A lymphocyte molecule in node homing is a member of the cartilage link protein family. Cell 56 : 1057-1062, 1989
28) Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ, Minty CN, Bargatze RF, Ding JF, Butcher EC. A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. Cell 56 : 1063-1072, 1989
29) 五井孝憲，山口明夫，中川原儀三，古川鋼一．接着分子CD44の発現，分子構造，機能と癌の浸潤転移における役割．日本臨床 53 : 1688-1693, 1995
30) Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. Adv Immunol 54 : 271-335, 1993
31) Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. Immunol Today 14 (8) : 395-399, 1993
32) Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 12160-12164, 1992
33) Hofmann M, Rudy W, Zoller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P, Gunthert U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. Cancer Res 51 : 5292-5297, 1991
34) Culty M, Miyake K, Kincade PW, Sikorski E, Butcher EC, Underhill C, Silorski E. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. J Cell Biol 111 : 2765-2774, 1990
35) Turley E, Moore D. Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. Biochem Biophys Res Commun 121 : 808-814, 1984
36) Green SJ, Tarone G, Underhill CB. Distribution of hyaluronate and hyaluronate receptors in the adult lung. J Cell Sci 90 : 145-156, 1988
37) Underhill CB. The interaction of hyaluronate with the cell surface: the hyaluronate receptor and the core protein. Ciba Found Symp 143 : 87-99, 1989
38) Lesley J, He Q, Miyake K, Hamann A, Hyman R, Kincade PW. Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. J Exp Med 175 : 257-266, 1992
39) 反町典子，宮坂昌之．リガンド結合におけるCD44分子の機能的調節とその生理学的意義．実験医学 10 : 1420-1425, 1992
40) Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 61 : 1303-1313, 1990
41) Jalkanen S. Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95 kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal or synovial endothelium cells. J Cell Biol 105 : 983-990, 1987
42) Miyake K, Medina KL, Hayashi S, Ono S, Hamaoka T, Kincade PW. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. J Exp Med 171 : 477-488, 1990
43) Berg E. Homing receptor and vascular adhesions : cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. Immunol Rev 108 : 5-18, 1989
44) 大神明，光富徹哉，津田徹，安元公正．肺癌における variant CD44の発現．日本臨床 53 : 1704-1709, 1995
45) Ariza A, Mate JL, Isamat M, Lopez D, Von Uexkull Guldeband C, Rosell R, Fernandez Vasalo A, Navas Palacios JJ. Standard and variant CD44 isoforms are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. J Pathol 177 : 363-368, 1995
46) Givehchian M, Woerner SM, Lacroix J, Zoller M, Drings P, Becker H, Kayser K, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and bronchial carcinomas: no evidence for altered CD44 splicing in metastasis. Oncogene 12 : 1137-1144, 1996
47) Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122 : 627-632, 1996
48) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 253 : 49-53, 1991
49) Mulder JW, Wielenga VJ, Polak MM, van den Berg FM, Adolf GR, Herrlich P, Pals ST, Offerhaus GJ. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. Gut 36 : 76-80, 1995
50) Jackson PA, Green MA, Pouli A, Hubbard R, Marks CG, Cook MG. Relation between stage, grade, proliferation, and expression of p53 and CD44 in adenomas and carcinomas of the colorectum. J Clin Pathol 48 : 1098-1101, 1995
51) Kim H, Yang XL, Rosada C, Hamilton SR, August JT. CD44 expression in colorectal adenomas is an early event occurring prior to K-ras and p53 gene mutation. Arch Biochem Biophys 310 : 504-507, 1994
52) 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
53) Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 49 : 4682-4689, 1989
54) Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T. Ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. Cancer Res 52 : 2903-2906, 1992
55) Rodenhuis S, van de Wetering ML, Mooi WJ, Evers SG, van Zandwijk N, Bos JL. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. N

Engl J Med 317 : 929-935, 1987
56) Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, Bos JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. Cancer Res 48 : 5738-5741, 1988
57) Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene 5 : 1037-1043, 1990
58) Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL, Linnoila RI, Minna JD, Gazdar AF. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. Oncogene 6 : 1353-1362, 1991
59) Slebos SJ. The ras oncogenes in human lung cancer. Am Rev Respir Dis 142 : 27-30, 1990
60) Kobayashi T, Tsuda H, Noguchi M, Hirohashi S, Shimosato Y, Goya T, Hayata Y. Association of point mutation in c-Ki-ras oncogene in lung adenocarcinoma with particular reference to cytological subtypes. Cancer 66 : 289-294, 1990
61) 嶌田雅光．増幅産物の検出と標識，３．ドットハイブリダイゼーション．蛋白質・核酸・酵素 41 : 483-485, 1996
62) Rosell R, Molina F, Martinez E, Pifarre A, Moreno I, MateJL, de Anta JM, Sanchez M, Font A. K-ras genotypes and prognosis in non-small-cell lung cancer. Ann Oncol 6 : 7529-7534, 1995
63) Silini EM, Pellegata NS, Volpato G, Romano A, Nazari S, Tinelli C, Ranzani GN, Solcia E, Fiocca R. K-ras gene mutations: an unfavorable prognostic marker in stage I lung adenocarcinoma. Virchows Arch 424 : 367-373, 1994
64) 中川健．転移性肺腫瘍に対する手術例43例の検討．KARKINOS 3 : 271-274, 1989
65) Mulder JW, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, Offerhaus GJ, Pals ST. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. Lancet 344 : 1470-1472, 1994
66) 金山博臣，管政治，安芸雅史，香川征．腎細胞癌におけるCD44変異型の発現について．日本臨床 53 : 1710-1715, 1995
67) Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122 : 627-632, 1996
68) Kainz C, Kohlberger P, Sliutz G, Tempfer C, Heinzl H, Reinthaller A, Breitenecker G, Koelbl H. Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. Gynecol Oncol 57 : 383-387, 1995
69) Paget S. Distribution if secondary growth in cancer of the breast. Lancet 1 : 571-573, 1989
70) 熊谷勝男．癌の悪性化と転移．癌転移の臓器特異性を決める因子：接着分子とサイトカイン（清木元治編），第１版，49-59頁，中外医学社，東京，1993

Expression of Cell Adhesion Molecule CD44 in Primary and Metastatic Lung Tumors -Correlation with p53 Protein Expression and K-ras Point Mutation-

Tetsuyuki Sunohara, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
－J. Juzen Med Soc., **106,** 214－235 (1997)

Key words non-small cell lung cancer, metastatic lung tumor, CD44, p53 protein, K-ras

Abstract

The standard form of CD44 (CD44s) and its isoforms (CD44v) are generated by alternative splicing of the CD44 gene. It has been reported that CD44v6 expression is correlated with metastasis. This study examined CD44s, CD44v6 and p53 protein expression immunohistochemically and the presence of K-ras point mutation (codon 12) by dot blot hybridization in 116 patients with primary non-small cell lung cancer (NSCLC) and 90 patients with metastatic lung tumors. In NSCLC patients, the expression was as follows: CD44s, 34.5% (adenocarcinomas, 30.9%; epidermoid carcinomas, 39.6%), CD44v6, 60.3% (adenocarcinomas, 44.1%; epidermoid carcinomas, 83.3%) p53 protein, 49.1% (adenocarcinomas, 38.2%; epidermoid carcinomas, 64.6%), K-ras point mutation, 33.0% (adenocarcinomas, 42.6%; epidermoid carcinomas, 20.0%). CD44s expression in well-differentiated adenocarcinoma was significantly higher than in other differentiated types ($p < 0.05$). CD44v6 expression of epidermoid carcinomas was significantly higher than that of adenocarcinomas ($p < 0.05$). However, there was no correlation between CD44v6 expression and lymph node or distant metastasis, in adenocarcinomas without p53 protein expression or K-ras point mutation, while CD44s expression was significantly higher in the patients without lymph node or distant metastasis ($p < 0.05$). The K-ras point mutation was not correlated with CD44s expression or CD44v6 expression. Among 74 patients who underwent curative resection, the prognosis was more unfavorable for patients without CD44s expression ($p < 0.05$). In metastatic lung tumor patients, the expression was as follows; CD44s, 24.4% (epithelial tumors, 34.7%; non-epithelial tumors, 12.2%), CD44v6, 35.6% (epithelial tumors, 49.0%; non-epithelial tumors, 19.5%), p53 protein, 35.6% (epithelial tumors, 34.7%; non-epithelial tumors, 36.6%), K-ras point mutation, 33.3% (epithelial tumors,

47.7%; non-epithelial tumors, 16.2%). Expression of both CD44s and CD44v6 was significantly higher in metastatic epithelial lung tumors than in metastatic non-epithelial lung tumors ($p < 0.05$, respectively). Among various origins, expression of both CD44s and CD44v6 was higher in metastatic tumors from colon, rectum, head and neck than in those from kidneys, soft tissues, bone and cartilage. K-ras point mutations were more frequent in metastatic epithelial lung tumors than in metastatic non-epithelial lung tumors, and noticeably more frequent from colon and rectum origin. The disease-free survival (DFS) was significantly lower in patients with metastatic non-epithelial lung tumors than in patients with metastatic epithelial lung tumors ($p <0.05$). In patients with metastatic non-epithelial lung tumors, the DFS was significantly lower in patients with p53 protein expression than in those without p53 protein expression ($p <0.05$). As fan the colorectal origin, the DFS was significantly lower in patients with CD44s expression than in those without CD44s expression ($p <0.05$). In soft tissues, bone and cartilage origin, the DFS was significantly lower in patients with p53 protein expression than in those without p53 protein expression ($p <0.05$). No correlation was found between CD44v6 expression and DFS. These findings suggest that expression of both CD44s and CD44v6 is useful as a prognostic factor for patients with NSCLC, and that in primary lung adenocarcinomas without p53 protein expression or K-ras point mutation, CD44s expression inhibits lymph node metastasis and distant metastasis, and that CD44s expression correlated with lung metastasis in colorectal cancer, while in non-epithelial tumors, p53 protein expression correlated with lung metastasis.