

原発性非小細胞肺癌患者における骨髄中癌細胞の検出とその臨床的意義

-細胞間接着分子E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白発現との関連も含めて-

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/2297/9405

原発性非小細胞肺癌患者における骨髄中癌細胞の検出と その臨床的意義

—細胞間接着分子E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白発現との関連も含めて—

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

亀 水 忠

現在, 原発性肺癌の進行度はTNM分類に基づく病期により決定されているが, 臨床的にリンパ節転移や遠隔転移のみられないI期症例であっても予後良好なものと不良なものが混在することが明らかとなっている。従来の臨床的あるいは病理組織学的手法では検出できない潜在性の微小転移としては胸膜播種, 骨髄転移, リンパ節転移, 末梢血液播種等の存在の可能性が考慮される。本研究では, 上皮細胞に特異的に発現するサイトケラチン(cytokeratin, CK)をマーカーとした免疫組織染色を行い, 従来の臨床検査では検出しない癌細胞を検出する目的で, 原発性非小細胞肺癌患者131例の骨髄中癌細胞の検出を試みた。さらに, 原発巣の臨床病理学的所見, 及び癌細胞接着分子であるE-カドヘリン, ならびにその裏打ち蛋白である α -カテニン, β -カテニン蛋白の発現との関係も併せて検討した。全体での骨髄中癌細胞検出率は131例中56例(42.7%)であり, 組織型別の陽性率は腺癌40.5%, 扁平上皮癌43.9%, 腺扁平上皮癌40.0%, 大細胞癌66.7%と, 組織型別に有意差はなかった。癌細胞検出率は, 腫瘍径が大きくなるとともに有意に上昇し, 病理病期, T及びN因子の進行とともに有意に上昇した。E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白の発現率は全体でそれぞれ, 77.9%, 82.6%, 88.5%であった。E-カドヘリン, α -カテニンの発現率はいずれも病理病期, T及びN因子の進行とともに有意に低下した。一方, β -カテニンはいずれの臨床病理学的因子とも関連しなかった。骨髄中癌細胞陽性群では, 有意にE-カドヘリン, α -カテニン蛋白の発現率が低下し(それぞれ $p < 0.0001$, $p < 0.0001$), 原発巣から骨髄内への移行の過程で癌細胞間接着分子の破綻が生じていることが示唆された。原発性肺癌症例において, これまで早期癌と定義されていた症例のなかにも既に骨髄内に癌細胞が移行し, 早期に再発をきたす可能性のある危険例が少なからず存在することが明らかとなった。化学療法を含め, 術後補助療法の選択の指標として骨髄内癌細胞の検出は有用な情報を提供しようとする。

Key words non-small cell lung cancer, cytokeratin, E-cadherin, α -catenin, β -catenin.

肺癌は, 現在アメリカでは臓器別癌死亡数の第1位を占め, 日本でもその数は増加し, 近い将来第1位となることが確実視されている¹⁾²⁾。肺癌症例では臨床的に予後が良好と考えられる群においても不良な予後を呈するものが少なからず見られる³⁾⁴⁾。いわゆる病理学的病期I期で治癒切除を受けた症例でもその約30%は再発により癌死する²⁾⁵⁾。再発の約2/3は脳, 肺, 骨などへの血行性遠隔転移様式を呈する⁶⁾。肺癌の再発率が高い原因の一つとして, 手術時すでに存在する潜在性転移すなわち, 胸膜播種, 骨髄転移, リンパ節転移, 末梢血液中癌細胞播種等の存在の可能性が考慮される。最近, 肺癌, 乳癌, 大腸癌, 前立腺癌などで免疫組織学的^{7)~21)}, あるいは分子生物学的手法^{22)~26)}を用いて, 従来の臨床的, 病理組織学的手法では検出できない癌細胞の検出が報告されている。非小細胞肺癌患者を対象にした骨髄中癌細胞検出に関しても, これまでCoteら⁷⁾, Ohgamiら⁸⁾, Pantelら⁹⁾の報告がある。いずれの報告でも, 骨髄に癌細胞が検出された症例の予後は不良であり, 骨髄中癌細胞の存在が肺癌の再発の指標つまり予後因子となる可能

性を示した。

癌細胞が全身に播種する過程において, 原発巣の癌細胞間接着因子が深く関与する。細胞接着因子の中で, 上皮細胞間において最も強力な接着作用を有するE-カドヘリンと, その裏打ち蛋白である α -カテニン, β -カテニンについて検討した。E-カドヘリンは接着斑およびアスモゾームに存在する細胞接着分子で, 上皮由来の分子量約120kDaの細胞膜貫通性蛋白質である²⁷⁾。 α -カテニンはE-カドヘリンの裏打ち蛋白で分子量約102kDaである。 β -カテニンは分子量約95kDaの糖蛋白質で, E-カドヘリンと細胞内で直接結合している。正常上皮細胞ならびに癌細胞では, E-カドヘリンの細胞内ドメインが β -カテニンに結合し, α -カテニンを介して細胞骨格アクチンに結合することによって細胞間接着の主な役割を演じている。癌細胞の癌細胞からの解離は浸潤および転移の第一段階として重要であり, E-カドヘリンが正常に機能する場合, 上皮細胞はその相互の連結から離脱することが困難とされる。実際, E-カドヘリンは培養細胞を用いた実験系から, 癌浸潤抑制機構として機能す

平成10年11月27日受付, 平成11年1月28日受理

Abbreviations: CK, cytokeratin; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; PBS, phosphate-buffered saline; APAAP, alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase; TBS, tris-buffered saline; LSAB, labeled strept-avidin biotin

ることが明らかとなっており^{28)~30)}, E-カドヘリン機能の不活化が癌の浸潤・転移の第1段階に関与するものと注目されている。α-カテニンはE-カドヘリンの裏打ち蛋白としてアクチンに結合することにより, E-カドヘリンを介した接着にとって必須である。それは, E-カドヘリンを発現しているにもかかわらず細胞間の接着がみられないα-カテニンの欠失した細胞に, α-カテニンを発現させることでE-カドヘリンを介した接着が成立したことから実証された³¹⁾。β-カテニンは, α-カテニンとは異なり, 接着そのものに直接携わるのではなく, 接着能の制御に関与していると考えられている。

胃癌³²⁾, 肝癌³³⁾, 食道癌³⁴⁾の手術材料を対象とした免疫組織学的検討をはじめ, 頭頸部癌³⁵⁾, 前立腺癌³⁶⁾, 乳癌³⁷⁾組織における検討でE-カドヘリンの発現性と癌の組織型や浸潤能との強い関連性が明らかになった。一方, E-カドヘリンの強い発現を認めるものの, α-カテニンの発現が低下していたため細胞間接着能が消失する症例が存在し, α-カテニンの発現異常が結果的にカドヘリン機能不全を導いたとの報告もある³⁸⁾。

本研究では, 原発性非小細胞肺癌患者を対象に, 骨髄中の癌細胞の存在をサイトケラチン18 (cytokeratin18, CK18) をマーカーとした免疫組織学的手法により検出すると同時に, 原発巣におけるE-カドヘリン, α-カテニン, β-カテニンの発現を免疫組織学的に検索し, 骨髄中癌細胞の存在との関連性につき検討を加えた。

対象および方法

I. 対象

1996年10月から1997年12月までに金沢大学医学部第一外科学教室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131例の骨髄液, ならびに腫瘍切除後ホルマリン固定しパラフィン包埋した122例の原発巣を対象とした。男性91例, 女性40例であり, 年齢は36歳から89歳(平均66歳)であった。肺癌取り扱い規約³⁹⁾による病期分類の内訳は, I期68例, II期10例, IIIA期37例, IIIB期14例, IV期2例(骨転移例なし)であり, 組織型別では腺癌79例, 扁平上皮癌41例, 腺扁平上皮癌5例, 大細胞癌6例であった。

II. 骨髄液のCK免疫組織染色法

骨髄液の採取にあたっては, 術前に患者に要綱を説明し, 同意を得た。患者が全身麻酔導入された後, 上前腸骨稜より, 骨髄液を5ml採取した。15ml コニカルチューブ (日本ベクトン・デッキンソン, 東京) 内に3mlのMono-Poly Resolving Medium (大日本製薬, 大阪) を入れ, その上に5mlの骨髄液を静かに充填し, コニカルチューブを60分間遠心 (300xg, 室温) した。次に有核細胞層を取りだし, 10分間遠心沈殿 (300xg, 室温) させpH7.2のリン酸生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) を加える作業を3回繰り返して洗浄した。有核細胞にPBSを1ml加え細胞浮遊液を作成した。チュルク氏液 (武藤化学, 東京) 5μlに細胞浮遊液450μlを加え, 有核細胞の核染色を行い, 血球計算盤にて細胞数を数え, 細胞浮遊液の濃度が 2×10^5 個/mlとなるように調整した。さらにオートスメア (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散布 (300xg, 室温, 10分間) し, 塗抹標本を作成した。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) 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⁴⁰⁾⁴¹⁾ (ダコジャパン, 京都) の手順に従った。pH7.6の0.05MTris緩衝液にて5分×3回洗浄し, Tris緩衝液にて2μg/mlに希釈した抗サイトケラチン18抗体 (CK2) (ペーリンガー・マンハイム, 東京) を, 室温にて3時間反応させた。反応終了後, pH7.6の0.05MTris緩衝液にて5分×3回洗浄し, APAAPキット (ダコジャパン, 京都) に従い, 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。Tris緩衝液にて同様に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×3回洗浄後, 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0.1MTris塩緩衝液1mlに溶解したもの) で室温にて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分間水道水で洗浄し, 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。

染色の陽性コントロールとして, 腫瘍摘出時に原発巣の捺印標本を作成し, 同様の方法で染色した。

III. 腫瘍細胞の免疫組織染色法

1. E-カドヘリン

腫瘍標本は15%中性緩衝ホルマリン液 (武藤化学) にて固定し, パラフィン包埋した後, 4μmの厚さに薄切し, シランコートしたスライドガラス (武藤化学) に付着させた。100%キシレン3回, 各10分間の脱パラフィンを行った後, 100%エタノール3回, 90%, 70%エタノール各1回で20回振盪を施行し親水を行った。免疫組織染色は標識ストレプトアビジン・ビオチン (labeled strept-avidin biotin, LSAB) 法に従い, 水道水にて5分間洗浄後, pH7.6の10mM塩化カルシウムを加えた0.1MTris緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) に浸した。次に0.3%過酸化水素水加メタノールにて15分間室温にて内因性ペルオキシダーゼを阻害し, 10分間流水水洗した。続いてウシ血清アルブミン (ダコジャパン) にて10分間ブロッキングを行った後, 抗ヒトE-カドヘリン抗体 (HECD-1) (TaKaRa, 滋賀) をpH7.6の10mM塩化カルシウムを加えたTBS (以下Ca加TBS) で200倍に希釈し, 室温で1時間反応させた。次にCa加TBS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) にて室温で20分間反応させ, Ca加TBS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。Ca加TBSにて5分間3回洗浄後, ゼアミノベンゼジン (3,3-diaminobenzidine, DAB) (和光純薬, 東京) 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分間洗浄した後, マイヤー・ヘマトキシリンにて1分間核染色を行い, 水道水で10分間色出しを行った。次に100%エタノール3回各3分間の脱水を行った後, 100%キシレン3回各3分間の透徹を行い, マリノール (武藤化学) にて封入を行った。

2. α-カテニン

E-カドヘリンの免疫組織染色標本の連続切片を用い, 脱パラフィンおよび親水はE-カドヘリンと同様に行った。水道水にて5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, 3回のマイクロウェーブ処理を行い抗原の賦活

を行った。室温まで放置した後、E-カドヘリンと同様にLSAB法にて免疫組織染色を行った。0.3%過酸化水素水加メタノール、ウシ血清アルブミン(ダコジャパン)によるブロッキングを行った後、1次抗体には抗ヒト α -カテニンポリクローナル抗体(TaKaRa)をPBSで400倍に希釈したものをを用い、室温で1時間反応させた。その後洗浄、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)、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)を反応させ、DABにて発色し、マイヤー・ヘマトキシリンにて核染色を行った後、脱水、透徹、封入を行った。

3. β -カテニン

α -カテニンに対する免疫組織染色と同様LSAB法にて染色し

た。抗体は抗ヒト β -カテニンポリクローナル抗体(TaKaRa)をPBSにて400倍に希釈して用いた。

IV. 免疫組織染色の判定

1. 骨髄中のCK陽性細胞

各症例につき、CKにて免疫組織染色した標本全てを鏡検し、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。また形態学的には、陽性コントロールとして作成した原発巣の捺印標本における陽性細胞と比較し、同一細胞であることを確認した。

2. E-カドヘリン

E-カドヘリンの発現はShiozakiら⁴²⁾の分類に従い、染色性が一様でないものを不均一(heterogenous)、一様であるが減弱し

Table 1. Correlation between the clinicopathological findings and the detection of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow of 131 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	No. of cases	Ratio (%) of cases with CK-positive cells	Chi-square test
All	131	56 (42.7)	
Sex			p<0.05
Male	91	45 (49.5)	
Female	40	11 (27.5)	
Age			N S
Under 60	37	12 (32.4)	
Over 60	94	44 (46.8)	
Histology			N S
Adenocarcinoma	79	32 (40.5)	
Squamous cell carcinoma	41	18 (43.9)	
Adenosquamous carcinoma	5	2 (40.0)	
Large cell carcinoma	6	4 (66.7)	
Size of tumor (cm)			p<0.001
Under 2.0	37	8 (21.6)	
Over 2.0 and under 5.0	75	34 (45.3)	
Over 5.0	19	14 (73.7)	
Pathological Stage			p<0.001
I and II	78	20 (25.6)	
III A	37	24 (64.9)	
III B and IV	16	12 (75.0)	
T factor			p<0.05
T1	54	15 (27.8)	
T2	46	19 (46.3)	
T3	18	12 (66.7)	
T4	13	10 (76.9)	
N factor			p<0.01
N0	79	23 (29.1)	
N1	15	8 (53.3)	
N2 and N3	37	25 (67.6)	
M factor			N S
M0	129	55 (42.6)	
M1	2	1 (50.0)	

Chi-square test was performed. N S, not significant.

ているものを減弱 (weak and homogenous), 全く染まらないものを失活 (lost) とし, 以上3型をまとめて陰性とした. 一様に強く染まるものは陽性と判定した.

3. α -カテニン, β -カテニン

α -カテニン, β -カテニンの発現は, 田村ら³⁴⁾, 塩崎ら⁴³⁾の方法に準じて, 腫瘍細胞の90%以上が染まるものを (+) 症例, 90%未満しか染まらないものを (-) 症例と判定した.

V. 統計学的処理

病理学的因子間における骨髓中CK陽性細胞検出率, 接着分子の発現率の差の検定, 骨髓中CK陽性細胞検出率と接着分子の発現率の差の検定には χ^2 検定あるいはFisher直接確率計算法を用いた. 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.

成 績

I. 骨髓中CK陽性細胞検出率と臨床病理学的因子との相関
骨髓中のCK陽性細胞像を図1に示す. 原発性非小細胞肺癌

患者131例中56例 (42.7%) に骨髓中CK陽性細胞が検出された. 検出された細胞数は1症例あたり1~5個が54例, 5~10個が2例で, それ以上検出された症例はなかった.

表1に各臨床病理学的因子別の陽性率を示した. 組織型別には腺癌40.5%, 扁平上皮癌43.9%, 腺扁平上皮癌40.0%, 大細胞癌66.7%で, 腺癌と扁平上皮癌との間に統計学的有意差は認めなかった ($p=0.87$). 腫瘍径を2.0cm, 5.0cmを境界に3段階に分類すると, 陽性率は腫瘍径2cm以下の群で21.6%, 腫瘍径が2cmを越え5cm以下の群で45.3%, 腫瘍径が5cmを越える群で73.7%と腫瘍径増大とともに有意に上昇した ($p < 0.001$). 病期別の陽性率では, IおよびII期が25.6%, IIIA期64.9%, IIIBおよびIV期75.0%で, 有意に病期進行とともに陽性率が上昇した ($p < 0.001$). T及びN因子との比較でもそれぞれ有意に因子進行とともに陽性率が上昇した (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$). M因子, 年齢 (60歳以上, 60歳未満) による差はなかった. 性別で男性49.5%, 女性27.5%と男性に陽性率が高い傾向を認めた ($p < 0.05$).

Table 2. Correlation between the clinicopathological findings and the detection of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow of adenocarcinoma patients

Clinicopathological findings	No. of cases	Ratio (%) of cases with CK-positive cells	Chi-square test
All	79	32 (40.5)	
Sex			$p < 0.05$
Male	44	23 (52.3)	
Female	35	9 (25.7)	
Age			N S
Under 60	23	8 (34.8)	
Over 60	56	24 (42.9)	
Size of tumor (cm)			$p < 0.05$
Under 2.0	26	6 (23.1)	
Over 2.0	53	26 (49.1)	
Pathological Stage			$p < 0.001$
I and II	52	12 (15.2)	
III A and III B and IV	27	20 (74.1)	
T factor			$p < 0.001$
T1	39	9 (11.4)	
T2	26	11 (42.3)	
T3 and T4	14	12 (85.7)	
N factor			$p < 0.01$
N0	52	12 (15.2)	
N1 and N2 and N3	27	17 (63.0)	
M factor			N S
M0	77	31 (40.3)	
M1	2	1 (50.0)	
Differentiation			N S
Well	41	14 (34.1)	
Moderately	22	9 (40.9)	
Poorly	16	9 (56.3)	

Chi-square test was performed. N S, not significant.

表2に腺癌79例の各臨床病理学的因子別の骨髄中CK陽性細胞検出率を示した。腫瘍径, 病期, T因子, N因子において有意に癌進行とともに陽性率は上昇した(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$)。年齢(60歳以上, 60歳未満), M因子, 分化度による差はなかった。ここでもやはり性による差が生じた。

表3に扁平上皮癌41例の各臨床病理学的因子別の骨髄中CK陽性細胞検出率を示した。腫瘍径, 病期, N因子において有意に癌進行とともに陽性率は上昇した(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)。性別, 年齢(60歳以上, 60歳未満), T因子, 分化度による差はなかった。

II. E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白陽性率と臨床病理学的因子の相関

1. E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白陽性率

骨髄中CK陽性細胞を検索した症例131例中, 原発巣を新鮮な状態で中性緩衝ホルマリン液にて固定しえた122例の原発性肺癌に対し, E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白の免疫染色を行った。図2にE-カドヘリン, 図3に α -カテニン,

図4に β -カテニン蛋白陽性像を示した。それぞれの陽性率は, 77.9%, 82.6%, 88.5%であった。また表4にE-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白の発現の組み合わせとその症例数の関係を示した。

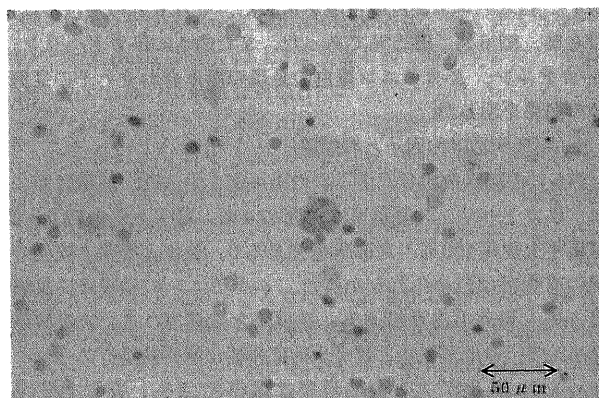
2. 臨床病理学的因子との相関

表5に各臨床病理学的因子別の陽性率を示した。組織型別には, E-カドヘリンの発現率は腺癌82.4%, 扁平上皮癌73.0%, 腺扁平上皮癌100%, 大細胞癌33.3%で, 腺癌と扁平上皮癌の間に有意差は認められなかった。 α -カテニンの発現率は腺癌81.1%, 扁平上皮癌83.8%, 腺扁平上皮癌100%, 大細胞癌66.7%で, やはり腺癌と扁平上皮癌の間に有意差は認められなかった。 β -カテニンの発現率は腺癌87.8%, 扁平上皮癌89.2%, 腺扁平上皮癌100%, 大細胞癌83.3%で, 腺癌と扁平上皮癌の間に有意差は認められなかった。E-カドヘリンは, 病期, T因子, N因子において癌進行とともに発現率が低下した(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$)。性, 年齢(60歳以上, 60歳未満), M因子において差はみられなかった。 α -カテニンも病期, T因子, N因子において癌進行とともに発現率が

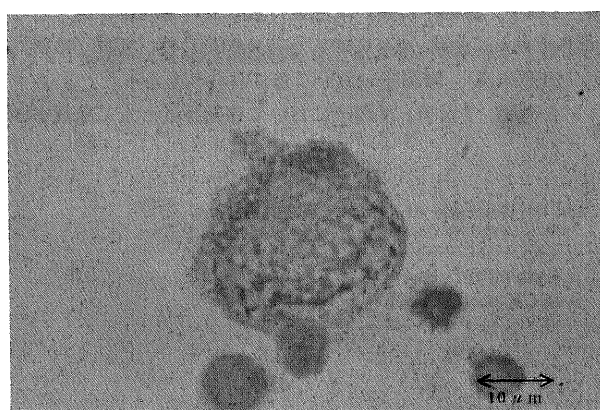
Table 3. Correlation between the clinicopathological findings and the detection of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow of squamous cell carcinoma patients

Clinicopathological findings	No. of cases	Ratio (%) of cases with CK-positive cells	Chi-square test
All	41	18 (43.9)	
Sex			N S
Male	38	16 (42.1)	
Female	3	2 (66.7)	
Age			N S
Under 60	9	4 (44.4)	
Over 60	32	14 (43.8)	
Size of tumor (cm)			$p < 0.05$
Under 2.0	10	1 (10.0)	
Over 2.0	31	17 (54.8)	
Pathological Stage			$p < 0.05$
I and II	24	7 (29.2)	
III A and III B	17	11 (69.5)	
T factor			N S
T1	13	4 (30.8)	
T2	16	7 (43.8)	
T3 and T4	12	7 (50.0)	
N factor			$p < 0.05$
N0	25	15 (28.8)	
N1 and N2	16	17 (63.0)	
M factor			
M0	41	18 (43.9)	
M1	0	0	
Differentiation			N S
Well	10	4 (40.0)	
Moderately	22	10 (45.5)	
Poorly	9	4 (44.4)	

Chi-square test was performed. N S, not significant.



A



B

Fig. 1. Immunohistochemical staining of cytokeratins in cytopsin preparations of bone marrow obtained from a patient with primary lung cancer. $\times 100$ (A), $\times 500$ (B).

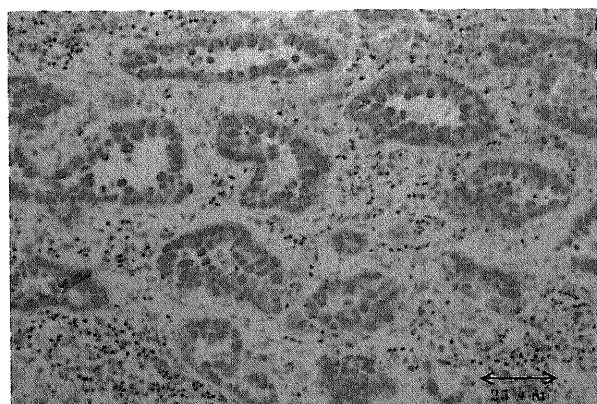


Fig. 2. Immunohistochemical staining of E-cadherin in the primary lung adenocarcinoma ($\times 200$). Cell membranes are strongly stained.

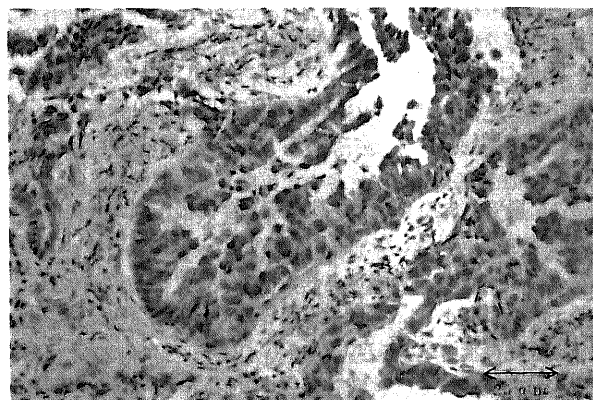


Fig. 3. Immunohistochemical staining of α -catenin in the primary lung squamous cell carcinoma ($\times 200$). Cell membranes are strongly stained.

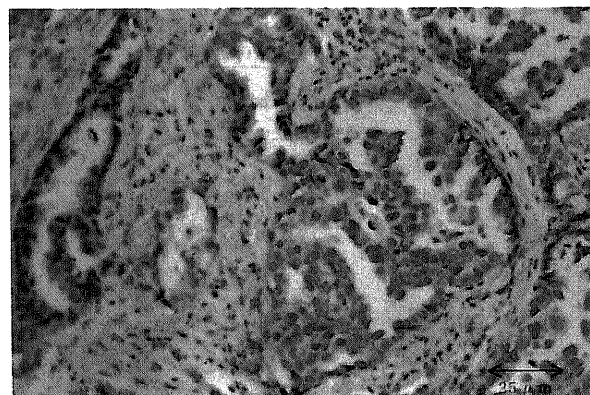


Fig. 4. Immunohistochemical staining of β -catenin in the primary lung squamous cell carcinoma ($\times 200$). Cell membranes are strongly stained.

Table 4. The correlation between the number of cases and the expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin in 122 non-small cell lung cancer patients

E-cadherin	Expression of		No. of cases
	α -catenin	β -catenin	
+	+	+	75
+	+	-	6
+	-	+	12
+	-	-	2
-	+	+	14
-	+	-	5
-	-	+	7
-	-	-	1

低下していた (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) が、性、年齢 (60歳以上, 60歳未満), M因子においては差はみられなかった。β-カテニンは性、年齢 (60歳以上, 60歳未満), 病期, T因子, N因子, M因子すべてに統計学的有意差は認め

られなかった。

Ⅲ. 骨髄中CK陽性細胞検出率とE-カドヘリン, α-カテニン, β-カテニン蛋白発現率との相関

表6に非小細胞肺癌患者122例の骨髄中CK陽性細胞検出率と

Table 5. Correlation between the clinicopathological findings and the expressions of E-cadherin, α-catenin and β-catenin proteins in 122 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	No. of cases	Positive ratio (%) of		
		E-cadherin	α-catenin	β-catenin
All	122	95 (77.9)	100 (82.6)	108 (88.5)
Sex				
Male	86	63 (73.3)	69 (80.2)	77 (89.5)
Female	36	32 (88.9)	31 (86.1)	31 (86.1)
] ^{a)} N S] ^{a)} N S] ^{a)} N S
Age				
Under 60	34	27 (79.4)	29 (85.3)	29 (85.3)
Over 60	88	68 (77.3)	71 (80.7)	79 (89.8)
] ^{a)} N S] ^{a)} N S] ^{a)} N S
Histology				
Adeno	74	61 (82.4)	60 (81.1)	65 (87.8)
Squamous	37	27 (73.0)	31 (83.8)	33 (89.2)
Adenosquamous	5	5 (100.0)	5 (100.0)	5 (100.0)
Large cell	6	2 (33.3)	4 (66.7)	5 (83.3)
] ^{a)} N S] ^{a)} N S] ^{a)} N S
Pathological Stage				
I and II	71	63 (88.7)	66 (93.0)	64 (90.1)
Ⅲ A and Ⅲ B and IV	51	32 (62.7)	34 (66.7)	44 (86.3)
] ^{a)} $p < 0.01$] ^{a)} $p < 0.001$] ^{a)} N S
T factor				
T1	47	44 (93.6)	44 (93.6)	41 (87.2)
T2	45	34 (75.6)	39 (86.7)	40 (88.9)
T3 and T4	30	17 (56.7)	17 (56.7)	27 (90.0)
] ^{a)} $p < 0.001$] ^{a)} $p < 0.001$] ^{a)} N S
N factor				
N0	72	64 (90.1)	66 (91.7)	65 (90.3)
N1 and N2 and N3	50	31 (62.0)	35 (70.0)	43 (86.0)
] ^{a)} $p < 0.001$] ^{a)} $p < 0.001$] ^{a)} N S
M factor				
M0	120	93 (77.5)	99 (82.5)	106 (88.3)
M1	2	2 (100.0)	1 (50.0)	2 (100.0)
] ^{a)} N S] ^{a)} N S] ^{a)} N S

^{a)} Chi-square test was performed. N S, not significant.

Table 6. Correlation between the detection of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow and the expressions of E-cadherin, α-catenin and β-catenin proteins in 122 non-small cell lung cancer patients

Cytokeratin staining of bone marrow	No. of cases	Positive ratio (%) of		
		E-cadherin	α-catenin	β-catenin
All	122	95 (77.9)	100 (82.0)	108 (88.5)
Cases with CK-positive cells	52	31 (59.6)	35 (67.3)	46 (88.5)
Cases with CK-negative cells	70	64 (91.4)	65 (92.9)	62 (88.6)
] ^{a)} $p < 0.0001$] ^{a)} $p < 0.0001$] ^{a)} N S

Chi-square test was performed. N S, not significant.

E-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白発現率の相関を示す。骨髄中CK陽性細胞が検出された症例では有意に原発巣のE-カドヘリン, α -カテニン発現率は低下していた(それぞれ $p < 0.0001$, $p < 0.0001$)。しかし, β -カテニン発現率との間には有意な差は認めなかった。

考 察

最近, 免疫組織学的手法や分子生物学的手法により, 各種癌症例の骨髄, 末梢血およびリンパ節中の微少な癌細胞の検出が可能となり, その発現意義が問題となっている。肺癌患者の骨髄中の癌細胞検出の報告は, Coteら⁷⁾はI, II期例で17例中5例(29.4%), III期例で26例中12例(46.2%), 全体で43例中17例(39.5%)に癌細胞を検出した。ごく最近の報告ではOhgamiら⁸⁾もI, II期例で26例中8例(30.8%), III期例で13例中7例(53.8%), 全体で39例中15例(38.5%)と同様の頻度で検出している。またPantelら⁹⁾の報告では, N0肺癌で70例中38例(54.3%), N1/N2肺癌で69例中45例(65.2%), 全体で139例中83例(59.7%)と極めて高率である。これらは, いずれも免疫組織学的手法を用いており, マーカーとしてCKを用いている。CKは, 上皮細胞に特異的に存在する細胞質内中間系フィラメントの一種で, 少なくとも19種類の亜型が確認されている^{40,45)}。CK以外にこれまで報告された癌細胞を認識するマーカーとして, 胎児性癌抗原(carcino-embryonic antigen), P53蛋白, 上皮性膜関連抗原(epithelial membrane antigen)などが利用されているが, いずれのマーカーも癌細胞における陽性率はCKに比し低く¹⁵⁾, また非癌患者の骨髄では赤芽球系細胞が陽性を示す場合があり⁴⁶⁾, CKが最も高感度かつ特異性の高いマーカーと考えられる。肺癌領域ではPantelら⁴⁷⁾が非小細胞肺癌患者に対し抗CK18抗体を用いた免疫染色を行い, 腺癌で100%, 扁平上皮癌で90%の陽性率を報告した。一方, その特異性に関し非担癌患者215例の骨髄ではわずか2.8%にしか偽陽性は認めず⁹⁾, CK18の骨髄中の癌細胞を検出する上での有用性を報告した。本研究では, CK18に対するモノクローナル抗体を用いて非肺癌患者33例の骨髄細胞を染色しその特異性を検討した。陽性細胞は2例(6.1%)にのみ認め, また腫瘍摘出時に作成した原発巣の捺印標本では全例で陽性であった。非肺癌患者でCK陽性細胞を検出した2例は, 従来の臨床検査では検出しない癌細胞を有していた可能性も否定できない。

これまでの報告をみると, 臨床的に遠隔転移のない症例の骨髄中における陽性率は, 胃癌で31.2%¹⁰⁾, 大腸癌で27.2%¹¹⁾, 肺癌で26.4-36.7%^{10),12),14),16)}等となっており, 骨転移を比較的きたしにくい胃癌や大腸癌でも肺癌と同様高率にCK陽性細胞が検出されている。非小細胞肺癌患者の骨髄では, 38.5-59.7%と他臓器癌に比し高率な陽性率が報告されている⁷⁻⁹⁾。本実験では全体で42.7%と, これまでの報告を支持する結果を得た。組織学的に腺癌と扁平上皮癌との間に陽性率の差がなかった点も従来の報告⁷⁻⁹⁾と一致していた。ただし, 従来の報告例の多くはT及びN因子による骨髄中CK陽性細胞の陽性率に有意差を認めていないが, 本研究ではT及びN因子の進行とともに, 陽性率は上昇した($p < 0.05$, $p < 0.01$)。この点に関し, Ohgamiら⁸⁾, Pantelら⁹⁾の報告は我々と同様の傾向を指摘しており, これは腫瘍の増殖とともに血中に移行する癌細胞が出現する確率が高くなる可能性を示す。一般にリンパ行性転移と血行性転移は独立した転移機構と考えられているが, 本研究では

リンパ節転移陽性症例のほうが癌細胞が骨髄中へ移行する確率が高い結果が得られ, 骨髄への転移経路として, 両者の密接な関わりが示唆された。男性が女性に比べ陽性率が高い結果は女性群に比し男性群に進行例が多かった為と考えられる。

骨髄中に癌細胞が存在することは必ずしも全てが転移の成立を意味するものではないが, それは少なくとも原発巣から骨髄までの癌細胞の移行過程, つまり原発巣の血管への浸潤, 癌細胞の原発巣からの解離, 血流による移行までの過程を完了したことを意味する。癌細胞が原発腫瘍から離脱する機序として, 同種の細胞同士をつなぎ止めている細胞接着機構の変化が指摘されている。同種細胞間の接着因子であるカドヘリンの発現低下や, 細胞内のカドヘリンの調節因子であるカテニンの異常が浸潤性増殖をする胃癌細胞で同定され³⁸⁾, 癌細胞の原発巣離脱過程が接着機構から明らかになりつつある。これまで胃癌³²⁾, 肝癌³³⁾, 食道癌³⁴⁾, 頭頸部癌³⁵⁾, 前立腺癌³⁶⁾, 肺癌³⁷⁾などの手術材料を対象とした免疫組織化学的検討で, 高分化で正常に近い細胞間接着を示す癌にE-カドヘリンの強い発現性が認められる一方, 低分化で接着能を失い浸潤傾向の著明な癌ではE-カドヘリンの発現は癌組織全域, あるいはその一部において減弱または消失していることが確認され, E-カドヘリンの発現性が癌の組織型や浸潤能と強い関連性を有することが判明している。本実験では, 肺腺癌および肺扁平上皮癌ともに分化度とE-カドヘリンの発現性との間に相関性は認められなかった。しかしT及びN因子の進行とともにE-カドヘリンの発現性が低下していた。肺癌では, 高分化癌であってもE-カドヘリンの発現が低下しており, 転移浸潤をきたしやすい性質があることが示唆された。

α -カテニンはカドヘリンを介した接着に必須であり, E-カドヘリンが正常に発現しても α -カテニンが欠失している場合, 細胞間接着は機能しないことが示されている³¹⁾。これまで手術材料を用いた α -カテニンの発現性を検討したものは少ないが, 田村ら³⁴⁾は食道表在癌において α -カテニンの発現が低下した症例では有意にリンパ節転移をきたしやすいと報告している。本研究では, E-カドヘリンと同様に, 病期の進行とともに有意に α -カテニンの発現低下を認めた。分化度との関係では, 統計学的有意差を得るには到らなかったものの, 肺腺癌において低分化癌ほど α -カテニンの発現が低下する傾向を認めた。

癌の血行性転移は, 原発巣からの癌細胞の離脱, 血管内侵入, 運搬, 定着, 血管外脱出, 初期増殖を経て段階的に成立する。Fidler⁴⁸⁾は¹²⁵I-5-ヨード-2'-デオキシウリジンで放射ラベルしたB16メラノーマ細胞をマウスの静脈内に投与し血流中および各臓器における腫瘍細胞数の経時的変化を検討している。それによると転移が成立しない場合の臓器に捕捉された腫瘍細胞の停留時間は極めて短いことが予測された。本研究で骨髄内に検出された癌細胞が, 骨髄内に一時的に捕捉されたものにすぎないのか, 骨転移成立の初期段階としての癌細胞を意味するものかは今後明確にされなければならない。いずれにしても, 周囲組織環境の違いがあるとはいえ, 原発巣を離脱し骨髄に達した癌細胞が, 仮眠状態を脱し将来的に浸潤過程を遂行する能力を獲得している危険性は否定しえない。骨髄中癌細胞検出例の予後が不良であるとする従来の報告はこの危険性を基本的に支持するものといえる。また, 表6の結果から骨髄内癌細胞検出率とE-カドヘリン及び α -カテニンの発現性との間に強い相関性が認められたことから, 原発巣からの離脱の過程において腫瘍細胞

間の接着分子であるE-カドヘリン, α -カテニンの不活または消失が重要な役割をもつことが推測された。Pantelら⁹⁾の報告ではリンパ節転移陰性で骨髄中に癌細胞が検出され, その後再発をきたした12例中骨転移で再発したものは2例のみと報告し, Ohgamiら⁸⁾は病理病期がI及びII期で骨髄中癌細胞が検出され, 早期再発した4例は全て血行性転移であったが骨転移は1例のみであったと報告している。従って, 骨髄中での癌細胞の集積は必ずしも骨転移の指標ではなく, 骨以外の遠隔臓器をも含めた転移再発の指標となる可能性がある。遠隔転移再発の潜在状態の指標としての本法の意義は今後再発様式をも含めて検討される必要がある。

肺癌患者の骨髄中のCK陽性細胞の存在が, 術後の再発率や生存率に影響を及ぼすか否かを見極めるには, 術後長期間の観察が必要となる。これまでの報告では肺癌のみならず^{7)~9)}, 乳癌¹²⁾¹⁴⁾, 胃癌¹⁶⁾, 大腸癌¹¹⁾でも骨髄中の癌細胞検出症例の予後が非検出例に比し有意に予後不良とされている。I期の非小細胞肺癌患者に対し外科的治療がなされた場合, 一般に術後補助療法は行われない。しかし, その予後は他臓器癌に比し良好とは言い難く, その一因として本研究の結果は病理病期I期の肺癌であっても少なからず(本研究では16/68例, 23.5%), 癌細胞の全身への播種の一環として骨髄での潜在的転移の可能性があることを明確にした。

本研究は検出方法にまだ改善の余地が残されているものの, 肺癌転移再発予知マーカーとしての意義は高いと考えられる。また, リンパ節内や循環血液中の癌細胞の検出結果も併用することにより, 術後補助療法の選択に本法は有用な情報を提供しうるものと考えられる。

結 論

原発性非小細胞肺癌患者の骨髄131例を対象に, 上皮細胞に特異的なCKに対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色法を行い, 骨髄内の癌細胞の有無を検索した。同症例の内122例の原発巣組織を対象にE-カドヘリン, α -カテニン, β -カテニン蛋白発現を免疫組織染色法を用いて測定し以下の結論を得た。

1. 全体での骨髄内癌細胞検出率は131例中56例(42.7%)であった。
2. 骨髄内癌細胞検出率と組織型の間に相関は認められなかった。
3. 骨髄内癌細胞検出率は腫瘍径の増大, T及びN因子, 病理病期の進行とともに有意に上昇した。
4. E-カドヘリン蛋白の発現は全体で122例中95例(77.9%)で, T及びN因子, 病理病期の進行とともに発現率が低下する傾向を認めた。
5. α -カテニン蛋白の発現は全体で122例中100例(82.6%)で, T及びN因子, 病理病期の進行とともに発現率が低下する傾向を認めた。
6. β -カテニン蛋白の発現は全体で122例中108例(88.5%)で, いずれの臨床病理学的因子との相関は認めなかった。
7. 骨髄内微小癌細胞検出陽性群は陰性群に比べ, 有意にE-カドヘリン, α -カテニン蛋白の発現率が低下しており, 癌細胞の全身播種の過程においてE-カドヘリン, α -カテニン蛋白の発現低下による腫瘍細胞間接着機構の破綻が重要な役割をもつことが示唆された。

以上の結果から, 原発性非小細胞肺癌症例では, 従来の臨床検査で遠隔転移を検知しえなくとも, 既に癌細胞が全身へ播種している状態, すなわち遠隔転移の潜在状態となっている可能性が示された。そのような癌細胞を検出するうえで本法は極めて有効と考えられた。現在行われている病理組織学的診断による進行度に加えて, 免疫組織学的診断や遺伝子診断による癌細胞の検出結果を加味することで, 患者の予後, すなわち再発危険群を見極めることが可能であり, 今後, 術後補助療法の一つの選択基準になることも予想される。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 終始, 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表します。また, 直接の御指導, 御協力を頂きました太田安彦助手, 田中洋子技師に心から感謝致します。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, 同病理検査部の皆様に心から感謝致します。

なお, 本論文の要旨の一部は第38回日本肺癌学会(仙台, 1997), 第15回日本呼吸器外科学会(東京, 1998)において発表した。

文 献

- 1) 平成7年人口動態統計(厚生省大臣官房統計情報部編), 下巻, 138-139頁, 財団法人厚生統計協会, 東京, 1995
- 2) Minna JD, Pass H, Glastein E, Ihde DC. Cancer of the lung, In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds)Cancer: Principles and practice of oncology, 3rd ed, p591-705, JB Lippincott, Philadelphia, 1989
- 3) 渡辺洋宇. 肺癌の予後因子. 日胸 54 : 535-546, 1995
- 4) 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
- 5) Little AG, DeMeester TR, Ferguson MK, Skinner DB, Hoffman PC, Consuleo Skosey RN, Blough RR, Golomb HM. Modified stage I (T1N0M0, T2N0M0), nonsmall cell lung cancer: treatment results, recurrence patterns, and adjuvant immunotherapy. Surgery 100: 621-627, 1986
- 6) 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
- 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, Mitsudomi 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) 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
- 10) Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindermann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential

- expression of proliferation-associated molculus in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85: 1419-1424, 1993
- 11) Lindemann 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
 - 12) 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
 - 13) Osborne MP, Asina S, Wong GY, Old LJ, Cote RJ. Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in a model system. *Cancer Res* 49: 2510-2513, 1989
 - 14) 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 M J* 295: 1093-1096, 1987
 - 15) 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
 - 16) Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, Neville AM. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* ii: 1271-1274, 1983
 - 17) Maruyama R, Sugio K, Mitsudomi T, Saitoh G, Ishida T, Sugimachi K. Relationship between early recurrence and micrometastases in the lymph node of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114: 535-543, 1997
 - 18) Dobashi K, Sugio K, Osaki T, Oka T, Yasumoto K. Micrometastatic p53-positive cells in the non-small-cell lung cancer: prognostic significance. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114: 339-346, 1997
 - 19) Izbicki JR, Passilik B, Hosch SB, Kubuschock B, Schneider C, Busch C, Knoefel WT, Thetter O, Pantel K. Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non-small-cell lung cancer: significance of nodal micrometastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 623-631, 1996
 - 20) Chen ZL, Perez S, Holmes EC, Wang HJ, Coulson WF, Wen DR, Cochran AJ. Frequency and distribution of occult micrometastases in lymph nodes of patients with non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85: 493-497, 1993
 - 21) Wells CA, Heryet J, Brochier J, Gatter KC, Mason DY. The immunocytochemical detection of axillary micrometastases in breast cancer. *Br J Cancer* 50: 193-197, 1984
 - 22) Klismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller DG, Seeber S, Shutte J. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 13: 2769-2775, 1995
 - 23) 横内秀起, 土井 修, 東山聖彦, 児玉 憲. 原発性肺癌切除症例におけるRT-PCR法を用いた血液中の癌細胞の検出. *肺癌* 4: 401-406, 1995
 - 24) Wood DP, Banks ER, Humphreys S, McRoberts JW, Rangnekar VM. Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer* 74: 2533-2540, 1994
 - 25) Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 74: 1595-1600, 1994
 - 26) Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG, Gomella LG. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6110-6112, 1992
 - 27) 小池晃彦, 浜口道成. カドヘリン・ファミリーの分子構造, 機能とその病態生理機能. *日本臨床* 59: 22-28, 1995
 - 28) Behrens J, Mareel M, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108: 2435-2447, 1989
 - 29) Vleminckx K, Vakaet Jr. L, Mareel M, Friers W, Van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasive suppressor role. *Cell* 66: 107-119, 1991
 - 30) Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Dorothea L, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113: 173-185, 1991
 - 31) Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M. Identification of neural α -catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 70: 293-301, 1992
 - 32) Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E-and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 51: 2185-2192, 1991
 - 33) Shimoyama Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 57: 131-135, 1991
 - 34) 田村茂行, 塩崎 均, 門脇隆敏, 井上雅智, 岡 博史, 松井成生, 森 武貞. 食道表在癌のリンパ節転移に対する臨床病理学的, 免疫組織学的検討—E型カドヘリンおよび α カテニンの発現について—. *日外会誌* 96: 550-556, 1995
 - 35) Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: invasive correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51: 6328-6337, 1991
 - 36) Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HFM, Sharrfisma HE, Debryne FMJ, Jsaacs WB. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 52: 5104-5109, 1992
 - 37) Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, Walsh FS, Millis

- RR. Epithelial(E-) and placental(P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. *J Pathol* 169: 245-250, 1993
- 38) Ochiai A, Akimoto S, Shimoyama Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Hirohashi S. Frequent loss of α catenin expression in scirrhous carcinomas with scattered cell growth. *Jpn J Cancer Res* 85: 266-273, 1994
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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). *Histochem Cytochem* 32: 219-229, 1984
- 42) Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Expression of immuno-reactive E-cadherin adhesive molecules in human cancers. *Am J Pathol* 139: 17-23, 1991
- 43) 塩崎 均, 五福淳二, 井上雅智, 田村茂行. 細胞間接着分子カドヘリンー臨床例におけるカドヘリン発現と転移の相関. 消化器系癌 (食道癌, 胃癌, 大腸癌). *日本臨床* 53: 1602-1606, 1995
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) 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
- 48) Fidler IJ. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled ^{125}I -5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-782, 1970

Detection of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer -Correlation with the Expression of E-Cadherin, α - Catenin, β -Catenin Proteins — Tadashi Kamesui, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 137 — 147 (1999)

Key words non-small cell lung cancer, cytokeratin, E-cadherin, α -catenin, β -catenin

Abstract

Using monoclonal antibodies against cytokeratin (CK) and a novel immuno-histochemical method for the detection of CK positive tumor cells, we examined disseminated tumor cells in the bone marrow of 131 patients with non-small cell lung cancer. Variable levels of E-cadherin, α -catenin and β -catenin protein expression were assessed in 122 primary lung cancers of these patients. The percentage of CK-positive cells in bone marrow was 42.7% (56/131); 40.5% (32/79) for adenocarcinoma, 43.9% (18/41) for squamous cell carcinoma, 40% (2/5) for adenosquamous carcinoma, and 66.7% (4/6) for large cell carcinoma. No relationship was found between the percentage of CK-positive cells and the pathological type of the carcinoma. Dissemination of tumor cells in the bone marrow did correlate to the size of the tumor ($p < 0.001$), T-factor ($p < 0.05$), N-factor ($p < 0.01$) and the pathological stage ($p < 0.001$). The number of disseminated tumor cells in the bone marrow was significantly higher in male than in female patients ($p < 0.05$), which may have been due to the fact that the ratio of females in stage I of the disease (62.5%) was greater than that of males (47.3%). Expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin proteins was detected in 77.9%, 82.6% and 88.5% of the patients, respectively. The degree of E-cadherin protein expression strongly correlated to T-factor ($p < 0.001$), N-factor ($p < 0.001$), and the pathological stage ($p < 0.01$). The degree of α -catenin protein expression also correlated with T-factor ($p < 0.001$), N-factor ($p < 0.001$), and pathological stage ($p < 0.001$). There appeared no correlation between the degree of β -catenin protein expression and the clinicopathological findings. A significant correlation was found between the reduced expression of E-cadherin/ α -catenin and dissemination of tumor cells in the bone marrow ($p < 0.0001$, $p = 0.0003$). This suggests that the loss of cell adhesion molecules such as E-cadherin and α -catenin plays an important role in the hematogenous dissemination of non-small cell lung cancer. This further results in the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow in patients with non-small cell lung cancer at the time of the initial operation. Detection of these CK-positive cells in the bone marrow may help in selection of subsequent systemic treatments, such as adjuvant chemotherapy.