

原発性非小細胞肺癌におけるトロンボスポンジン1発現の意義について

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/2297/9378

原発性非小細胞肺癌におけるトロンボスポンジン 1発現の意義について

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)

吉 羽 秀 磨

原発性非小細胞肺癌におけるトロンボスポンジン1 (thrombospondin-1, TSP-1)の発現意義を明らかにする目的で、新鮮凍結切除標本 (39例) およびホルマリン固定後パラフィン包埋標本 (346例) を用い、その遺伝子発現ならびに蛋白発現を検討した。逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR) 法にてTSP-1 mRNA発現を検討した結果、陽性率は、全体で41.0% (16/39例) と高率であり、腫瘍組織に発現が確認された。免疫組織学的には、TSP-1蛋白発現率は65.3% (226/346例) と高く、腫瘍組織の間質に発現がみられた。微小血管密度の平均値は、TSP-1蛋白陽性群で 34.5 ± 1.5 、TSP-1蛋白陰性群で 28.3 ± 2.2 であり、前者は後者に比して有意に高値であった ($p < 0.05$)。TSP-1蛋白発現と変異型p53蛋白発現との間に正の相関を認めた ($p < 0.01$)。増殖細胞核抗原標識指数 (proliferating cell nuclear antigen labelling index) の平均値は、TSP-1蛋白陽性群で 57.5 ± 1.5 、TSP-1蛋白陰性群で 42.5 ± 2.1 であり、前者は後者に比して有意に高値であった ($p < 0.0001$)。組織型別には、扁平上皮癌の蛋白陽性率73.2%が、腺癌症例の陽性率56.3%に比し有意に高値であり ($p < 0.0001$)、分化度別には、中および低分化型の蛋白陽性率74.6%および80.0%が、高分化型の陽性率49.2%に比し有意に高値であった (各々 $p < 0.0001$, $p < 0.0001$)。病期別にみると、ⅢAおよびⅢB期の蛋白陽性率76.4%および77.8%が、Ⅰ期の陽性率54.1%に比して有意に高く (各々 $p < 0.0001$, $p < 0.01$)、T2, 3および4の蛋白陽性率68.5%, 78.7%および75.0%が、T1の陽性率52.2%に比して有意に高値であった (各々 $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$)。なお、NおよびM因子による差はなかった。単変量解析にて予後を検討した結果、全症例 (346例) の5年生存率はTSP-1蛋白発現陽性群で32.1%、陰性群で58.8%であり、前者は後者に比し有意に予後不良であった ($p < 0.0005$)。またⅠ期の絶対的治癒切除術例 (148例) の5年生存率はTSP-1蛋白発現陽性群で56.3%、陰性群で85.3%であり、前者は後者に比し有意に予後不良であった ($p < 0.0001$)。さらに、多変量解析により、腫瘍間質部におけるTSP-1蛋白発現は独立した予後不良因子であることが判明した。以上の結果から、原発性非小細胞肺癌において、TSP-1は腫瘍の腫瘍血管新生および増殖に直接的あるいは間接的に関与し、原発性肺癌の進展を促進している可能性が考慮された。

Key words non-small cell lung cancer, thrombospondin, microvessel density, proliferating cell nuclear antigen, long term survival

トロンボスポンジン1 (thrombospondin-1, TSP-1)は、1971年にBaenzigerら¹⁾によって最初に同定された高分子量の糖蛋白である。TSP-1の分子構造は3本の分子鎖が、互いにs-s結合した三量体構造をなしており²⁾、さらに各々の分子鎖は6つのドメインからなっている³⁾。各々のドメインは、それぞれ異なった細胞表面レセプターに作用し、細胞接着、遊走、細胞増殖、分化などの多種多様な細胞過程に関与するとされる⁴⁾。悪性腫瘍におけるTSP-1発現は、乳癌細胞株⁵⁾や、肝細胞癌⁶⁾、胃癌⁷⁾、膀胱癌⁸⁾などで確認されており、その発現性は血行性転移、腫瘍増殖および浸潤、腫瘍血管新生に関わるとする見解⁹⁾と、それとは逆に、血管新生抑制機序を介し腫瘍増殖を抑制するとする見解¹⁰⁾とに分かれ、その発現意義はいまだ不明確である。一

方、その発現調節機序に関し、野生型p53蛋白はTSP-1の転写を活性化し、p53蛋白の変異によってTSP-1発現が有意に低下する¹¹⁾という興味深い報告がみられる。

本研究では肺癌切除標本を用い、肺癌組織におけるTSP-1発現の実際を確認するとともに、血管新生関連因子である血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 発現、腫瘍内微小血管密度 (microvessel density, MD)、P53蛋白発現、DNAポリメラーゼ α を活性化するDNA複製因子として増殖期細胞に関連する¹²⁾増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 発現を合わせて検討し、TSP-1発現との相関性を追求することにより、原発性肺癌におけるTSP-1発現の意義を検討した。

平成10年9月7日受付, 平成10年11月20日受理

Abbreviations: bFGF, basic fibroblast growth factor; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; MD, microvessel density; PBS, phosphate buffer saline; PCNA LI, proliferating cell nuclear antigen labelling index; RT-PCR, reverse transcribed-PCR; TGF- β 1, transforming growth factor beta 1; TSP-1, thrombospondin-1; VEGF, vascular endothelial growth factor

対象および方法

I. 対象

1987年1月から1991年12月までの5年間に、金沢大学第一外科学教室で切除された原発性非小細胞肺癌346例(男性241例, 女性105例)を対象とした。年齢は32歳から84歳(平均64.6歳)であり、肺癌取り扱い規約13)による病期分類の内訳は、I期148例, II期32例, IIIA期89例, IIIB期45例, IV期32例, 組織型別には、腺癌174例, 扁平上皮癌138例, 腺扁平上皮癌18例, 大細胞癌12例, 腺様嚢胞癌2例, 粘表皮癌2例であった。

凍結標本を用いての実験には、上述の症例から39症例を無作為に選抜し、腫瘍組織および担癌正常肺組織の一部を切除後直ちに -80°C で保存したものをを用いた。組織亜型は、H-E染色標本を腫瘍辺縁部より作成し再確認した。病期別には、I期16例, II期5例, IIIA期13例, IIIB期4例, IV期1例, 組織型別には、腺癌26例, 扁平上皮癌8例, 大細胞癌3例, 腺扁平上皮癌2例であった。

II. 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription-PCR)法

1. 総RNAの抽出

新鮮凍結標本100mgに対し1mlのアイソジェン(ニッポンジーン, 東京)を加えて懸濁させ、室温にて10分間静置した。次に0.2mlのクロロホルム(和光, 大阪)を加えて振とうした後、 4°C で10分間12,000回転遠心後、上清に0.5mlのイソプロパノール(和光)を加えて 4°C 、10分間静置し、10分間12,000回転遠心した。沈殿を1mlの75%エタノール(和光)で洗浄し、 4°C で6分間12,000回転遠心した。沈殿を7分間風乾して総RNAを抽出し、超純水にて $200\mu\text{g/ml}$ に調製した。

2. cDNAの作成

RNA溶液 $5\mu\text{l}$ を、 50pmol のオリゴ-デオキシチミジン(deoxythymidin)プライマー(Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Sweden)とともに、 68°C で15分間RNAの変性とプライマーのアニーリングを行った。氷上で5分間冷却した後、10倍RT緩衝液[50mM トリス(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)-塩酸(pH8.3), 40mM 塩化カリウム, 8mM 塩化マグネシウム] $2\mu\text{l}$, 0.5mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸(deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP) $8\mu\text{l}$, $225\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin) $0.3\mu\text{l}$, 5mM ジチオスレイトール $0.1\mu\text{l}$, 20単位リボヌクレアーゼ抑制剤(RNasin, Promega, Madison, USA) $0.2\mu\text{l}$, さらにトリ骨髄芽球症ウイルス(avian myeloblastosis virus, AMV)逆転写酵素(Life Sciences Inc., St. Petersburg, USA)4単位($0.1\mu\text{l}$)を加え、滅菌蒸留水で総量 $20\mu\text{l}$ とし、 42°C で90分間反応させ、cDNAを合成させた。その後、 95°C で5分間加熱し、逆転写酵素を不活性化した。

3. PCR法

cDNA浮遊液に、10倍PCR反応緩衝液[50mM トリス(Sigma)-塩酸(pH8.3), 40mM KCl, 8mM MgCl_2] $8\mu\text{l}$, 各 0.5mM dNTP $8\mu\text{l}$, Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造, 京都) 2.5 単位($0.3\mu\text{l}$), さらに各 50pmol のTSP-1 PCR用センスプライマー $5'$ -AATGGACTGTTGATAGCTGCACTGA- $3'$ と、アンチセンスプライマー $5'$ -TGGACAGGCATCCATCAATTGGACA- $3'$ をそれぞれ $2.5\mu\text{l}$ 加え、滅菌蒸留水で総量 $100\mu\text{l}$ とした。 $20\mu\text{l}$ のミネラルオイル(Sigma)を重ねし、 94°C で1分間の熱変性、 58°C で1.5分間のアニーリング、 72°C で2分間の伸長反応を1サイクル

として、28サイクルの増幅を行った。各 $20\mu\text{M}$ β アクチン増幅用センスプライマー $5'$ -TGGACTTCGACGAAGAGATG- $3'$ とアンチセンスプライマー $5'$ -GATCTTCATTGTGCTGGGTG- $3'$ をそれぞれ $2.5\mu\text{l}$ 加えて同様にPCR増幅した。反応終了後、クロロホルム $150\mu\text{l}$ を加えて上層に増幅後のcDNA溶液を得た。

4. 電気泳動

上層を採取し 3M 酢酸ナトリウム加99%エタノール(和光) $300\mu\text{l}$ を加えて洗浄し、 -30°C で一晩静置させた。 4°C で15,000回転15分間遠心した後、沈殿に80%エタノール(和光) $300\mu\text{l}$ を加えさらに 4°C で15,000回転5分間遠心してcDNAを沈殿させた。cDNAを80%エタノール(和光)にて洗浄した後、15分間減圧乾燥させ、0.06%ブロムフェノールブルー0.06%キシレンアルコール、6.7%グリセロールを含むトリス-EDTA緩衝液 $9\mu\text{l}$ に溶解した。各試料は $0.5\mu\text{g/ml}$ エチジウムブロマイドを含んだ泳動緩衝液(4mM トリス(Sigma), 2mM 酢酸ナトリウム, 0.1mM EDTA, pH7.2)を用い、定電圧 100V において1.0%アガロースゲル(Sigma)にて45分間電気泳動を行った。

5. サザンブロット法

泳動終了後のゲルを、アルカリ変性液(0.5M 水酸化ナトリウム, 0.5M 塩化ナトリウム)に浸し、30分間室温にてゆっくり振とうし、cDNAを変性させた後、中和液(3M 塩化ナトリウム, 0.5M トリス(Sigma)-塩酸, pH7.2)に浸し、30分間室温にてゆっくり振とうした。中和操作を2回繰り返した後、ナイロンメンブレンフィルターハイボンド(Hybond)- N^+ (Amersham, Greenwhich, CT, USA)に $20\times\text{SSC}$ (3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム)を用いてトランスファーした。フィルターはハイブリダイズ緩衝液[$6\times\text{SSC}$ (0.9M 塩化ナトリウム, 0.09M クエン酸ナトリウム), デンハート(Denhardt)液(0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% フィコール400), 10% 硫酸デキストラン, 0.1% SDSおよび 0.1mg/ml サケ精子DNA]にて 43°C の恒温水層にて1時間のハイブリダイゼーションを行った。TSP-1オリゴヌクレオチドプローブ($5'$ -ATTGCCACAGCTCGTAGAACAGGAG- $3'$) 13pmol に対し、 $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP 1.85MBq (Amersham), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液[50mM トリス(Sigma)-塩酸pH7.6, 10mM マグネシウム, 5mM ジチオスレイトール, 0.1mM スペルミジンおよび 0.1mM EDTA pH8.0], 10単位T4キナーゼ(宝酒造, 京都)および滅菌蒸留水を加え全量 $20\mu\text{l}$ とし 37°C において30分間反応させて放射標識を行った。その後、 0.1% (v/v) 32P標識プローブを加え、 43°C において16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズさせたフィルターは $2\times\text{SSC}$ および 0.1% SDSを含む溶液中で 45°C 、15分間の洗浄を2回行い、X線フィルム(Kodak, New York, USA)にて -80°C で60分間の感光を試みた。

III. 免疫組織染色法

腫瘍辺縁部および担癌正常肺組織の両方が含まれるホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックを選択し、厚さ $4\mu\text{m}$ の切片標本を作成した。

切片をシランコーティングスライド(武藤化学, 東京)に付着させた後、キシレン(和光)およびエタノール(和光)にて脱パラフィンと親水処理を行った後に、流水水洗した。一次抗体反応までの操作は、以下の如く行った。

1. TSP-1染色

0.1M トリス(Sigma)-塩酸緩衝液 12.1g を滅菌蒸留水 800ml

に溶かし、約35%塩酸にてpH2.0に調製したもの)にて500W、5分間、4回のマイクロウェーブ処理を行った。その後室温にて0.3%過酸化水素(和光)加メタノール(和光)で20分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した。次にウシ正常血清(ダコジャパン, 京都)を用いてブロッキングを行った。抗ヒトTSP-1モノクローナル抗体(Oncogene research products, USA)を、pH7.2のリン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)(日水製薬, 東京)にて100倍に希釈し、4℃にて24時間反応させた。

2. VEGF, p53, von Willebrand 因子およびPCNA染色

0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)にて500W、5分間のマイクロウェーブ処理を、p53は4回、他は3回行った。その後室温にて0.3%過酸化水素(和光)加PBS(日水製薬)で20分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した。次にウシ正常血清(ダコジャパン)を用いてブロッキングを行った。抗ヒトVEGFポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)、抗ヒトp53モノクローナル抗体(DAKO, Denmark)、抗ヒトvon Willebrand 因子モノクローナル抗体(DAKO, Denmark)、抗ヒトPCNAモノクローナル抗体(DAKO, Denmark)を、各々pH7.2のPBSにて100倍に希釈し、4℃にて24時間反応させた。

以上1, 2, の各一次抗体反応後、PBS(日水製薬)にて5分間、3回洗浄し、ビオチン標識抗マウス、抗ウサギ、ヤギ抗体(ダコジャパン)で、室温下に20分間反応させた。PBS(日水製薬)にて5分間、3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ダコジャパン)で室温にて20分間反応させた。発色剤は、四塩酸3, 3-ジアミノベンチジン(3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 和光, 東京)20mgを、100mlのPBS(日水製薬)に溶解し、10 μ l 130%過酸化水素水(和光)を加え、作製した。PBSにて5分間、3回洗浄後、この発色剤を用い室温にて顕微鏡で発色状態を確認しながら2~3分間反応させた。10分間流水水洗し、マイヤー・ヘマトキシリン(武藤化学)にTSP-1染色では2分間、それ以外では1分間核染色を行い、流水水洗にて10分間色出しを行った。エタノール(和光)にて脱水、キシレン(和光)にて透徹を行った後に、封入を行った。

なお、5種類の抗体全てにおいて、一次抗体の代わりにPBSを用い、4℃下24時間反応させたものを陰性コントロールとして用いた。

IV. 免疫組織染色の判定

1. TSP-1 蛋白

染色の都度作成した陰性コントロールとの比較のもとにTSP-1染色性を評価し、染色のみられた場合を陽性と判定した。

2. VEGF

間質部分を除いた腫瘍細胞500個につき検討を行い、50%以上に染色のみられる場合を強陽性、10~50%に染色のみられる場合を陽性、10%未満に染色のみられる場合を弱陽性、全く染色のみられない場合を陰性とした。また染色強度のスコア化に際し、強陽性を3点、陽性を2点、弱陽性を1点、陰性を0点として定量化し統計学的検討を行った。

3. p53 蛋白

腫瘍細胞500個につき検討を行い、その10%以上に染色のみられた場合を陽性と判定した。

4. MD

臨床病理学的背景因子、血管新生因子群の発現性に関する情

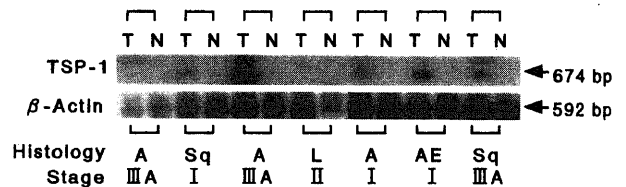


Fig.1. TSP-1 mRNA expression in non-small cell lung cancers. The 674 bp PCR product was detected only in the tumor tissue. T, tumor tissue; N, normal lung tissue near the cancer site; A, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma; L, large cell carcinoma; AE, adenosquamous cell carcinoma.

Table 1. Correlation between histology or pathological stage and TSP-1 mRNA expression in 39 primary non-small cell lung cancer cases

Groups	No. (%) of cases	No. (%) of TSP-1 mRNA expression cases
All	39	16 (41.0)
Histology		
Adenoca.	26 (66.7)	9 (34.6)
Squamous cell ca.	8 (20.5)	5 (62.5)
Adenosquamous cell ca.	2 (5.1)	1 (50.0)
Large cell ca.	3 (7.7)	1 (33.3)
Stage		
I	16 (41.0)	6 (37.5)
II	5 (12.8)	3 (60.0)
III A	13 (33.3)	4 (30.8)
III B	4 (10.3)	2 (50.0)
IV	1 (2.6)	1 (100)

報を持たずに、腫瘍組織中任意の3カ所の微小血管数を各々200倍の視野にて算定し、その平均値を微小血管密度とした。

5. PCNA 発現 (PCNA Labelling index, PCNA LI)

MDと同じく、他の情報を持たずに、腫瘍組織中任意の3カ所から、各々腫瘍細胞500個中の陽性細胞数を算定し、それらの比率の平均値をもってPCNA LIとした。

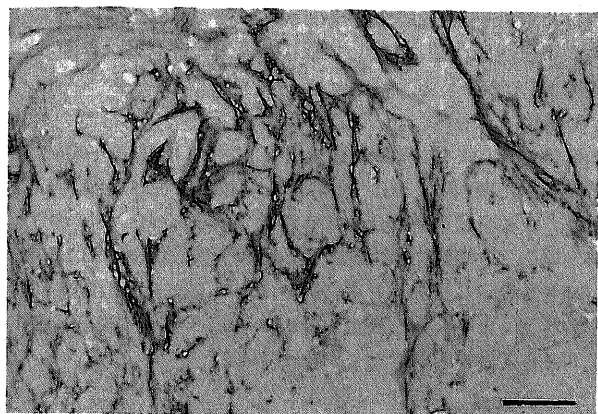
V. 予後因子としての検討

TSP-1との相関性は、VEGF発現、MD、p53蛋白発現、PCNA発現、さらに臨床病理学的背景因子として性別、年齢(65歳以上、未満)、組織型、分化度、病変部位(肺門型、肺野

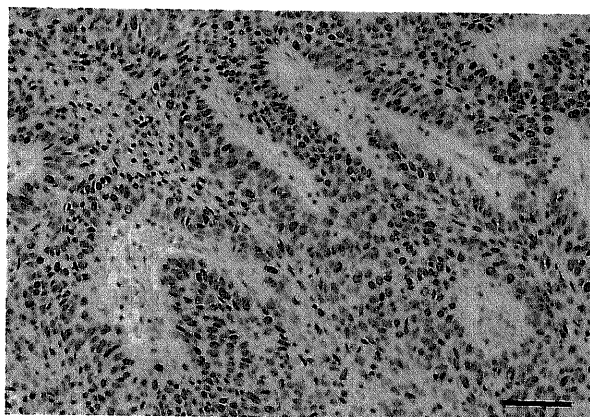
型)、病期、腫瘍径(T因子)、リンパ節転移(N因子)および遠隔転移(M因子)につき検討した。各因子の予後に及ぼす影響を検討するに際し、MD、PCNA LIについては、各々の平均値を基準として高値群、低値群を設定し、2群間の生存率をもって比較した。単変量解析では、N因子、M因子、根治度などの予後への影響を除外するため、I期の絶対的治療切除例148例についても、各因子と長期予後との相関を検討した。

VI. 統計学的処理

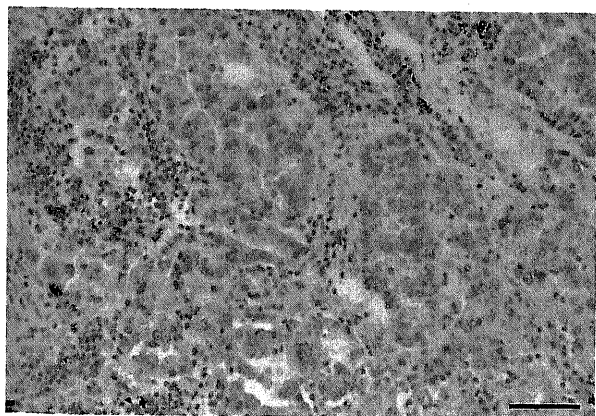
TSP-1発現と各因子群との相関性の検討には χ^2 検定を、平均値の差の検定にはMann-WhitneyのU検定を用いた。なお測



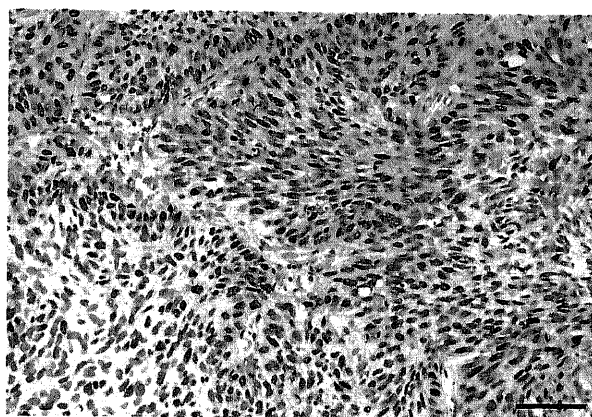
A



D



B



E



C

Fig.2. Immunohistochemical staining of TPS-1, VEGF, von Willebrand factor, p53 protein and PCNA. (A) TSP-1. The expression was found only in tumor stroma. (B) VEGF. The cytoplasm of VEGF positive cells were stained. (C) von Willebrand factor. The endothelial cells of the microvessels in the tumor tissue were stained. (D) p53 protein. The nuclei of p53 protein-positive cells were stained. (E) PCNA. The nuclei of PCNA-positive cells were stained. Scale bar indicates 100 μ m.

定値は平均±標準誤差で示した。生存率はKaplan-Meier法にて算出し、その有意差検定は全般化Wilcoxonテストにて行った。また、多変量解析は、単変量解析における全ての予後不良因子につきCox比例ハザードモデルを用いて行い、危険率(p)が5%未満の因子を最終モデルに供した。本研究における統計学的な有意差判定の基準は $p < 0.05$ とした。

成 績

I. TSP-1 mRNA発現

TSP-1 mRNAは、担癌正常肺に比し腫瘍組織に強い発現性がみられた(図1)。発現率は、全例で41.0% (16/39例)であった。組織型別には、腺癌34.6% (9/26)、扁平上皮癌62.5% (5/8)、大細胞癌33.3% (1/3)、腺扁平上皮癌50.0% (1/2)であり、組織型別による発現率に有意な差は認めなかった(表1)。病期別には、I期37.5% (6/16)、II期60.0% (3/5)、III A期30.8% (4/13)、III B期50.0% (2/4)、IV期100% (1/1)であり、病期別

Table 2. TSP-1 expression and VEGF score in non-small cell lung cancers

Expression of TSP-1	No. of cases	VEGF score
Positive	226	1.12 ± 0.07
Negative	120	1.11 ± 0.10

Table 3. VEGF score and TSP-1 positive ratio in non-small cell lung cancers

VEGF score	No. of cases	No. (%) of TSP-1-positive cases
High	153	99 (64.7)
Low	193	127 (65.8)

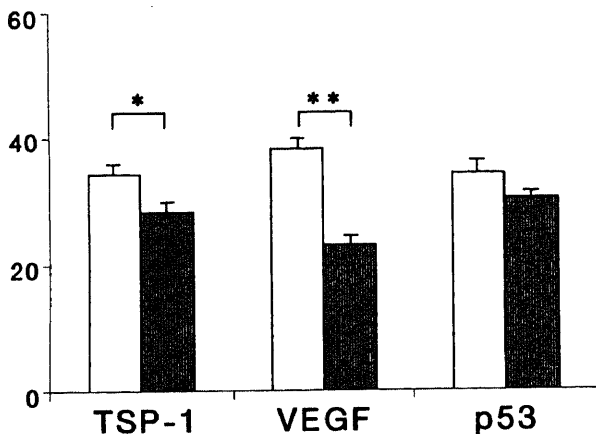


Fig. 3. Correlation between MD and TSP-1, VEGF or p53 protein expression. $\bar{X} \pm SE$ of microvessel density in the TSP-1-positive group (34.5 ± 1.5) was significantly higher than in TSP-1-negative group (28.3 ± 2.2) ($p < 0.05$), and that in the VEGF-positive group (38.5 ± 1.7) was significantly higher than in VEGF-negative group (23.1 ± 1.5) ($p < 0.0001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$, by Mann-Whitney's U-test. □ Positive cases, ■ Negative cases.

による発現率の有意差は認めなかった(表1)。

II. TSP-1 蛋白発現

1. TSP-1 蛋白発現部位および発現率

TSP-1 蛋白発現は、腫瘍組織の間質部分に認められた(図2A)。TSP-1 蛋白発現率は、全体として65.3% (226/346)であった。

2. VEGF 発現との相関

VEGF 抗原は、腫瘍細胞の細胞質に顆粒状の染まりとしてみられ(図2B)、発現率は全体として60.1% (208/346)であった。

VEGF 発現スコアの平均値は、TSP-1 陽性群で 1.12 ± 0.07 、TSP-1 陰性群で 1.11 ± 0.10 であり、両者に有意差はなかった($P = 0.84$) (表2)。

また、VEGF スコア高値群(2および3点)と低値群(0および1点)とでTSP-1 陽性率を比較した場合、前者が64.7% (99/153)、後者が65.8% (127/193)であり、両者に有意差はなかった($P = 0.83$) (表3)。

3. MD との相関

腫瘍組織内微小血管染色像を図2Cに示す。MDの平均値は、TSP-1 蛋白陽性群で 34.5 ± 1.5 、TSP-1 蛋白陰性群で 28.3 ± 2.2 であり、前者は後者に比して有意に高値であった($p < 0.05$)。また同値は、VEGF 陽性群 38.5 ± 1.7 、VEGF 陰性群 23.1 ± 1.5 で前者は後者に比して有意に高値であり($p < 0.0001$)、VEGF 高値群 40.4 ± 2.1 、VEGF 低値群 25.9 ± 1.3 で前者は後者に比して有意に高値であった($p < 0.0001$) (図3)。

Table 4. TSP-1 and p53 expression in non-small cell lung cancers

Expression of TSP-1	No. of cases	No. (%) of p53 protein-positive cases
Positive	226	121 (53.5)
Negative	120	44 (36.7)

* $p < 0.01$. The χ^2 test showed the difference was significant.

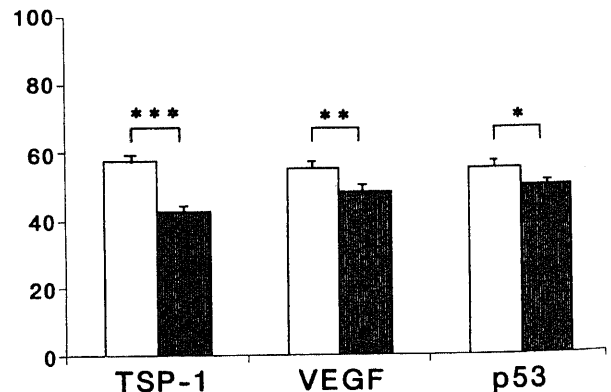


Fig. 4. Correlation between PCNA LI and TSP-1, VEGF or p53 protein expression. $\bar{X} \pm E$ of PCNA LI in the TSP-1-positive group (57.5 ± 1.5) was significantly higher than in TSP-1-negative group (42.5 ± 2.1) ($p < 0.0001$), that in the VEGF-positive group (55.1 ± 1.7) was significantly higher than in the VEGF-negative group (48.2 ± 2.0) ($p < 0.01$), and that in the p53 protein-positive group (55.1 ± 1.8) was significantly higher than in the p53 protein-negative group (49.8 ± 1.8) ($p < 0.05$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, by Mann-Whitney's U-test. □ positive cases, ■ Negative cases.

4. p53蛋白発現との相関

p53蛋白発現は、腫瘍細胞の核にみられ(図2D)、p53蛋白発現率は全体として47.7% (165/346)であった。TSP-1蛋白発現陽性群と陰性群のp53蛋白陽性率は、それぞれ53.5%、36.7%であり、TSP-1蛋白発現とp53蛋白発現との間に正の相関を認めた(p<0.01)(表4)。

5. PCNA LIとの相関

PCNA染色像を図2Eに示す。PCNA LIの平均値は、TSP-1蛋白陽性群で57.5±1.5%、TSP-1蛋白陰性群で42.5±2.1%であり、前者は後者に比して有意に高値であった(p<0.0001)。ま

た同値は、VEGF陽性群55.1±1.7%、VEGF陰性群48.2±2.0%で前者は後者に比して有意に高値であり(p<0.01)、VEGF高値群54.9±2.0、VEGF低値群50.3±1.7で前者は後者に比して高い傾向がみられた(p=0.07)(図4)。

6. 臨床病理学的背景因子との相関(表5)

性別では、男性の陽性率69.3%が、女性の陽性率56.2%に比して有意に高率であった(p<0.01)。組織型別には、扁平上皮癌の陽性率73.2%が、腺癌症例の陽性率56.3%に比して有意に高率であった(p<0.0001)。分化度別では、中および低分化型の陽性率74.6%および80.0%が、高分化型の陽性率49.2%に比

Table 5. Correlation between clinicopathological factors and expression of TSP-1 in 346 primary non-small cell lung cancer cases

Groups	No. (%) of cases	No. (%) of TSP-1-positive cases
All	346	226 (65.3)
Sex		
Male	241 (69.7)	167 (69.3)
Female	105 (30.3)	59 (56.2)
Age		
≤65	156 (45.1)	106 (63.2)
>65	190 (54.9)	120 (67.9)
Histology		
Adenoca.	174 (50.3)	98 (56.3)
Squamous cell ca.	138 (39.9)	101 (73.2)
Adenosquamous cell ca.	18 (5.2)	13 (72.2)
Large cell ca.	12 (3.4)	10 (83.3)
Adenoid cystic ca.	2 (0.1)	2 (100)
Mucoepidermoid ca.	2 (0.1)	2 (100)
Histopathological grading		
Well differentiated	130 (37.6)	64 (49.2)
Moderately differentiated	122 (35.3)	91 (74.6)
Poorly differentiated	70 (20.2)	56 (80.0)
Unknown	24 (6.9)	
Location of tumor		
Hilum	63 (18.4)	46 (73.0)
Periphery	279 (81.6)	178 (63.8)
Stage		
I	148 (42.8)	80 (54.1)
II	32 (9.2)	23 (71.9)
III A	89 (25.8)	68 (76.4)
III B	45 (13.0)	35 (77.8)
IV	32 (9.2)	20 (62.5)
T factor		
1	113 (32.7)	59 (52.2)
2	146 (42.2)	100 (68.5)
3	47 (13.6)	37 (78.7)
4	40 (11.5)	30 (75.0)
N factor		
0	187 (54.1)	114 (61.0)
1	44 (12.7)	30 (68.2)
2	87 (25.1)	60 (69.0)
3	28 (8.1)	22 (78.6)
M factor		
0	314 (90.8)	206 (65.6)
1	32 (9.2)	20 (62.5)

Adenoca, adenocarcinoma; Squamous cell ca, squamous cell carcinoma; Adenosquamous cell ca., adenosquamous cell carcinoma; Large cell ca. large cell carcinoma; Adenoid cystic ca., adenoid cystic carcinoma; Mucoepidermoid ca., mucoepidermoid carcinoma. * p<0.01, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Table 6. Survival rate of all cases

Groups	No. of cases	Survival rate (%)		
		1-year	3-year	5-year
TSP-1				
Positive	224	78.6	45.1	32.1
Negative	119	80.7	63.0	58.8
				】***
VEGF				
Positive	206	75.2	41.7	29.6
Negative	137	85.4	65.7	59.1
				】****
VEGF score				
2 or 3 points	152	77.6	46.7	31.6
0 or 1 point	191	80.6	55.0	49.2
				】*
MD				
>32.3	134	81.8	56.5	49.3
≤32.3	209	75.4	43.3	29.1
				】**
p53 protein				
Positive	163	82.2	51.5	40.5
Negative	180	76.7	51.1	42.2
PCNA LI				
>51.3	164	84.4	60.3	52.0
≤51.3	179	73.8	41.5	29.9
				】****
p-stage				
I	148	94.6	77.0	69.6
II, IIIA, IIIB or IV	195	67.7	31.8	20.0
				】****
T				
1	112	95.5	77.7	70.5
2, 3 or 4	231	71.4	35.8	27.3
				】****
N				
0	187	88.8	69.5	60.4
1, 2 or 3	156	67.9	29.5	18.6
				】****
M				
0	311	83.0	54.3	44.4
I	32	73.8	21.9	12.5
				】****

The univariate analysis by generalized Wilcoxon test showed that TSP-1-positive, VEGF-positive, high VEGF score, high MD, high PCNA LI, advanced stage, large tumor size, lymph node metastasis and distant metastasis were poor-prognostic factors, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

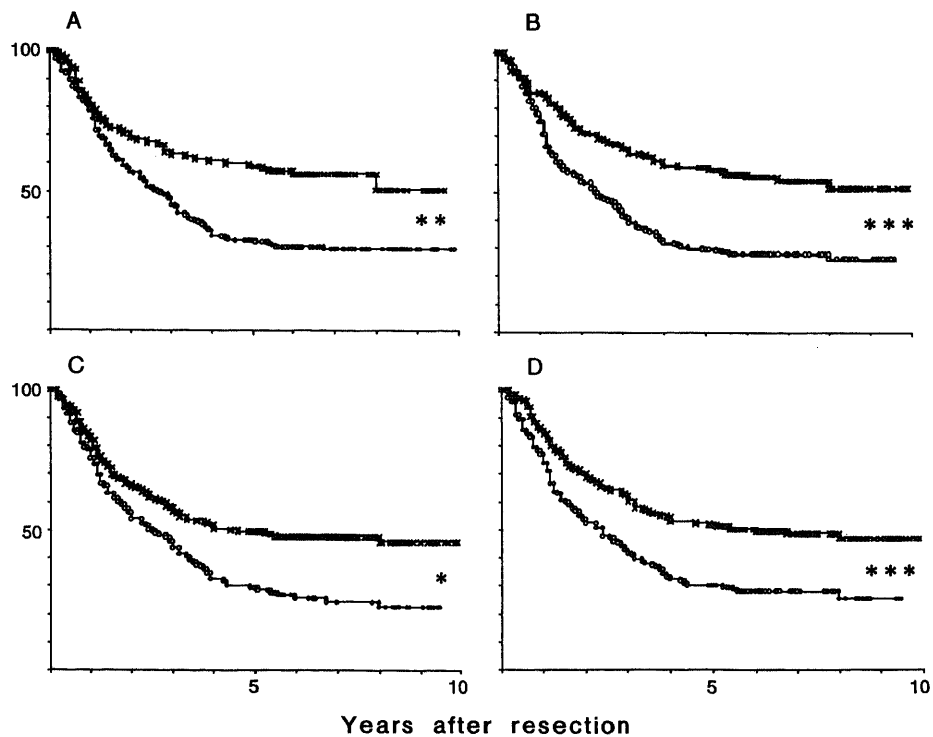


Fig.5. Survival curves of all cases. (A) O, TSP-1-positive cases; X, TSP-1-negative cases. (B) O, VEGF-positive cases; X, VEGF-negative cases. (C) O, Cases of MD > 32.3; X, Cases of MD ≤ 32.3. (D) O, Cases of PCNA LI > 51.3; X, Cases of PCNA LI ≤ 51.3. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0005$, *** $p < 0.0001$, by generalized Wilcoxon test.

Table 7. Survival rate of curatively resected p-stage I cases

Groups	No. of cases	Survival rate		
		1-year	3-year	5-year
TSP-1				
Positive	80	91.3	66.3	56.3
Negative	68	98.5	89.7	85.3
VEGF				
Positive	70	90.0	61.4	48.6
Negative	78	98.7	91.0	88.5
VEGF score				
2 or 3 points	51	86.3	62.7	49.0
0 or 1 point	97	99.0	84.5	80.4
MD				
>32.3	55	90.9	61.8	50.9
≤32.3	93	96.8	86.0	80.6
p53 protein				
Positive	76	96.1	72.4	61.8
Negative	72	93.1	81.9	77.8
PCNA LI				
>51.3	59	89.8	76.3	69.5
≤51.3	89	97.8	77.5	69.7
T				
1	90	96.7	84.4	80.0
2	58	91.4	65.5	53.4

The univariate analysis by generalized Wilcoxon test showed that TSP-1-positive, VEGF-positive, high VEGF score, high MD and T2 were poor-prognostic factors, respectively. * p<0.001, ** p<0.0001.

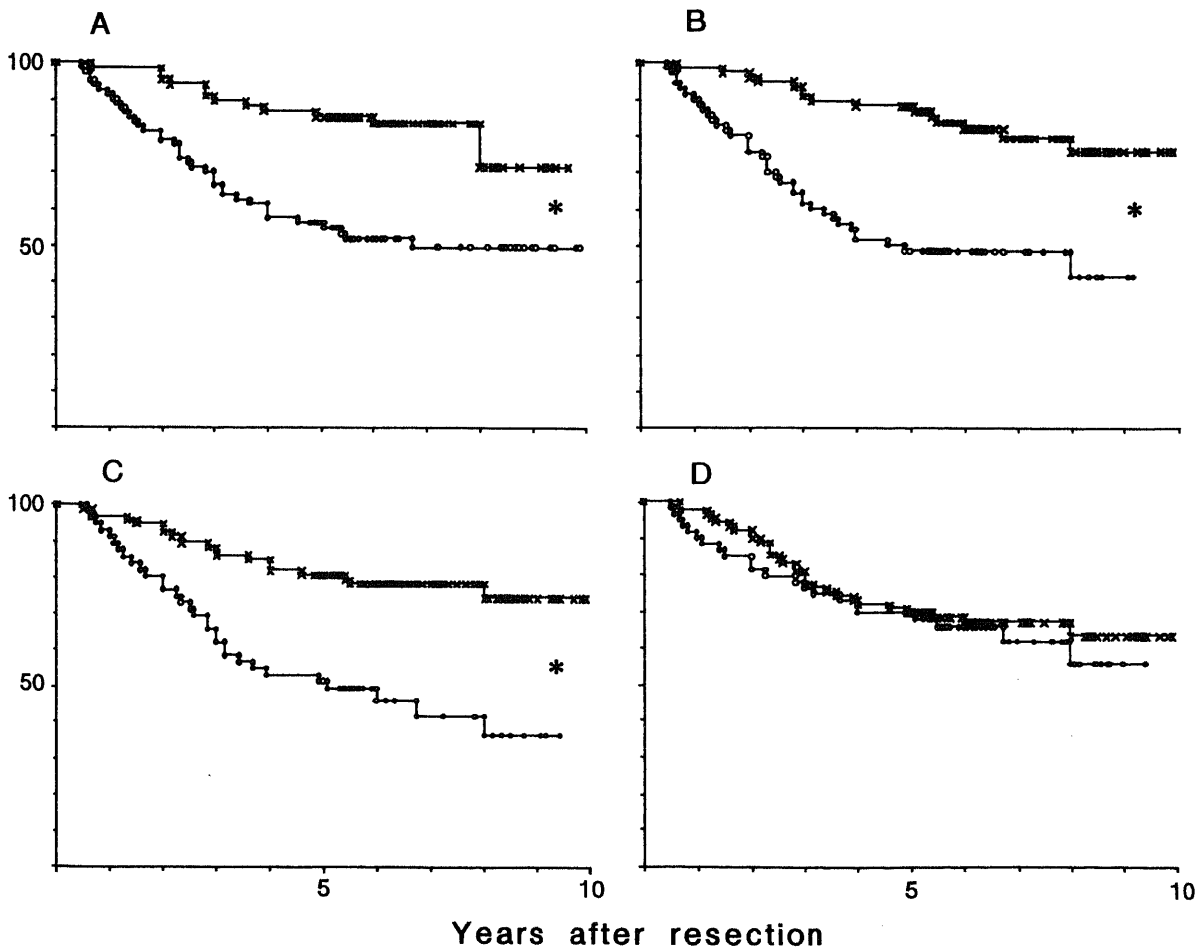


Fig.6. Survival curves of curatively resected p-stage I cases. (A) ○, TSP-1-positive cases; ×, TSP-1-negative cases. (B) ○, VEGF-positive cases; ×, VEGF-negative cases. (C) ○, Cases of MD >32.3; ×, Cases of MD ≤32.3. (D) ○, Cases of PCNA LI >51.3; ×, Cases of PCNA LI ≤51.3. *p<0.0001, by generalized Wilcoxon test.

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

Variables	χ^2	p value
TSP-1-positive	3.927	0.0475
VEGF-positive	3.397	0.0653
MD>32.3	2.259	0.1329
PCNA LI>51.3	0.169	0.6808
Stage II, III A, III B and IV	4.938	0.0263
T2, 3 and 4	16.804	<0.0001
N1, 2 and 3	2.275	0.1315
M1	4.971	0.0258

TSP-1-positive, the advanced stage, large tumor size and the distant metastasis were independent poor-prognostic factors.

Table 9. Results of Cox hazard model analysis of prognostic factors on non-small cell lung cancers-curatively resected p-stage I cases

Variables	χ^2	p value
TSP-1 positive	9.652	0.0019
VEGF-positive	10.110	0.0015
MD>32.3	2.468	0.1162
T2	10.040	0.0015

TSP-1-positive, VEGF-positive and T2 were independent poor-prognostic factors.

して有意に高率であった (各々 $p < 0.0001$, $p < 0.0001$). 病期別では, III A および III B 期の陽性率 76.4% および 77.8% が, I 期の陽性率 54.1% に比して有意に高率であった (各々 $p < 0.0001$, $p < 0.01$). T 因子別では, T2, 3 および 4 の陽性率 68.5%, 78.7% および 75.0% が, T1 の陽性率 52.2% に比して有意に高率であった (各々 $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$). なお, 年齢, 病変部位, N 因子, M 因子による差はなかった.

III. 長期予後との相関

全症例における単変量解析では表 6, 図 5 に示した如く, TSP-1 発現, VEGF 発現, MD, PCNA LI, 病期 (I 期か I 期以外か), 腫瘍径 (T1 か T1 以外か), リンパ節転移, 遠隔転移が予後と相関していた. p53 蛋白発現, 性別, 年齢, 組織型, 分化度, 病変部位による予後の有意差はみられなかった. また, I 期の絶対治癒切除例における単変量解析では表 7, 図 6 に示した如く, TSP-1, VEGF, MD, 腫瘍径が予後と相関していた. p53 蛋白発現, PCNA LI, 性別, 年齢, 組織型, 分化度, 病変部位による予後の有意差はみられなかった.

次に全症例において, TSP-1 陽性, VEGF 陽性, MD 高値 (> 32.3), PCNA LI 高値 (> 51.3), I 期以外 (II, III A, III B, および I 期), T1 以外 (T2, 3 および 4), N0 以外 (リンパ節転移陽性), M1 (遠隔転移陽性) の各因子について, 多変量解析を行った (表 8). その結果, TSP-1 発現 ($p < 0.05$), I 期以上の進行癌 ($p < 0.05$), T1 以外 ($p < 0.0001$), 遠隔転移陽性 ($p < 0.05$) が各々独立した予後不良因子であった. さらに I 期の絶対的治

癒切除例において, TSP-1 陽性, VEGF 陽性, MD 高値 (> 32.3), T2 の各因子について多変量解析を行った結果, TSP-1 陽性 ($p < 0.01$), VEGF 陽性 ($p < 0.01$), T2 ($p < 0.01$) が各々独立した予後不良因子であった (表 9).

考 察

TSP-1 は, 1971 年に Baenziger ら¹⁾によって, トロンビンで刺激された血小板から放出される高分子量の糖蛋白として, 最初に同定された. TSP-1 は, 各々が 1152 個のアミノ酸からなる分子量 145,000 の 3 本の分子鎖が, 互いに s-s 結合した三量体構造をなしている²³⁾. さらに各々の分子鎖は, 6 つのドメインからなっており, N 末端から順に, ヘパリン結合ドメイン, プロコラーゲンホモロジドドメイン, マラリア蛋白ホモロジドドメイン (type 1 repeat), 表皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor) ホモロジドドメイン (type 2 repeat), カルモデュリンホモロジドドメイン (type 3 repeat), C 末端部 (細胞結合ドメイン) よりなる²⁴⁾. 各々のドメインが, それぞれ異なった細胞表面レセプターに作用し, 血小板 α 顆粒の構成成分として止血に関わるほか, 細胞接着^{14)~16)}, 遊走, 細胞増殖¹⁷⁾, 細胞骨格形成¹⁸⁾, 炎症および創傷治癒¹⁹⁾, 分化²⁰⁾²¹⁾などの様々な機能を発揮する.

癌の進展過程ことに転移は, 腫瘍細胞の接着, 遊走, 浸潤, 遠隔臓器におけるコロニー形成, 血管新生から成り立っている. 本研究においては TSP-1 陽性群は陰性群に比して, 細胞増殖能の指標の一つである PCNA LI が有意に高かった. Castle ら²²⁾は, NIH 3T3 細胞において, TSP の過剰発現が細胞増殖を引き起こしたという. 試験管内 (In vitro) の実験では, TSP-1 はヒト扁平上皮癌細胞²³⁾や黒色腫細胞²⁴⁾の接着と拡散を引き起こし, またヒト黒色腫細胞および乳癌細胞の走化性と遊走能を促進した²⁵⁾との報告がある. Wang ら²⁵⁾²⁶⁾は, ボイデンチャンバー (boyden chamber) 浸潤アッセイを用いて, TSP-1 が口腔内扁平上皮癌細胞や乳癌細胞のコラーゲン内遊走を促進することを見いだした.

癌の浸潤に関して, Wong ら²⁷⁾, Tuszyński ら²⁸⁾は, 乳癌において, TSP 発現レベルの増加により, 細胞の悪性化と浸潤能の促進がみられたとしている. Hosokawa ら²⁹⁾, Albo ら³⁰⁾, Arnoletti ら³¹⁾は, TSP-1 がウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (urokinase type plasminogen activator) とプラスミノゲン活性化因子抑制因子 1 (plasminogen activator inhibitor-1) の両方の活性化, 形質転換増殖因子ベータ 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1) の活性化により, 癌細胞のフィブリンゲルへの浸潤を促進することを見いだした. 癌の浸潤, 転移にはシステイン-セリン-バリン-スレオニン-システイン-グリシン (cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine) 特異的 TSP-1 受容体の発現が重要であると考えられている. Arnoletti ら³²⁾は, この受容体の免疫染色を施した頭頸部癌の腫瘍片をコンピューター解析し, 受容体密度が高いほど予後不良であることを報告した. また, Arnoletti ら³²⁾, Tuszyński ら³³⁾は, この受容体は, 癌細胞にのみ発現し, 正常細胞には発現していなかったとしている.

Tuszyński ら³⁴⁾³⁵⁾は, マウスの実験において, TSP-1 投与により肉腫細胞の肺での腫瘍コロニーの形成が促進され, 抗 TSP-1 抗体の投与により, 転移が抑制されたとしている. このことは, TSP-1 自体が転移巣での腫瘍コロニー形成に関与している可能性を示唆している.

TSP-1の発現部位についてWongら³⁶⁾は、免疫組織学的染色により、TSP-1は乳癌の腫瘍間質や腫瘍組織の基底膜に過剰発現がみられたとしている。Cleazardinら³⁷⁾も、生体内局所ハイブリダイゼーションによって、TSP-1が間質より産生されることを見いだした。さらにTSP-1を産生するのは、主として線維芽細胞、血管内皮細胞、活性化された血小板であり、腫瘍細胞も僅かながら産生している³⁸⁾という。本研究では、TSP-1 mRNAは腫瘍組織に、TSP-1蛋白は腫瘍組織中の間質に発現がみられたが、担癌正常肺組織や腫瘍細胞そのものには発現を見いだせなかった。

腫瘍血管新生は、癌の増殖や進展に不可欠であり³⁹⁾、その度合いは血行性転移と相関し、独立した予後不良因子となることが分かっている⁴⁰⁾。本研究においても、MD高値は独立した予後不良因子であった。血管新生の過程は、内皮細胞の遊走および増殖、細胞外マトリックスの蛋白分解、管腔形成といった多段階からなり⁴⁰⁾、それには塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、VEGF、TGF- β 1などの血管新生因子群が関与している⁴⁰⁾。TSP-1の腫瘍血管新生に対する作用については、促進的に働くという意見と抑制的に働くという意見とに分かれている。BenEzraら⁴¹⁾が行ったウサギ角膜の血管新生アッセイでは、TSP-1がbFGFおよび脂質多糖類 (lipopolysaccharide) による血管新生を5倍に促進した。また増殖期の内皮細胞では静止期の内皮細胞に比べてTSP-1産生能が高いとする見解^{42,43)}がある。一方Goodら⁴⁴⁾は、ラット角膜血管新生アッセイによって、TSP-1がbFGFによって誘導される微小血管形成を抑制することを見いだした。またTSP-1が血管内皮細胞の増殖を抑制するとの見解^{45,46)}がある。この見解に違いについて、Tuszynskiら⁴⁶⁾は、TSP-1やbFGFの使用量が異なるために生じたのではないかとしている。本研究においては、TSP-1陽性群では陰性群に比して肺癌組織中の微小血管密度が有意に高く、原発性肺癌においてはTSP-1が腫瘍血管新生を直接的あるいは間接的に促進している可能性が示唆された。

血管内皮細胞の遊走能に与える影響についてTarabolettiら⁴⁷⁾のポイデンチャンバー遊走アッセイでは、TSP-1は5~50 μ g/mlの濃度において、単独であるいはbFGFの存在下で血管内皮細胞の遊走能を濃度依存性に刺激し、その効果はTSP-1のヘパリン結合ドメインに対するモノクローナル抗体によって抑制された。また彼らは、bFGFの内皮細胞遊走作用に対してTSP-1は、高濃度 (100 μ g/ml) の時には促進的にはたらき、低濃度 (0.1~0.01 μ g/ml) の時には抑制的にはたらく可能性を示した。Tolsmaら⁴⁸⁾も試験管内において、TSP-1が低濃度 (2.5 μ g/ml程度) の場合には、bFGFの内皮細胞遊走作用を抑制したと報告した。これらの見解から、TSP-1の内皮細胞遊走能に対する作用は濃度依存性であり、高濃度の場合には促進的、低濃度の場合には抑制的である可能性があると考えられる。実際健康状態においても、TSP-1は0.05~0.4 μ g/mlの濃度で循環血液中に存在する^{49,50)}が、何らかの原因で凝固系が活性化されるとTSP-1の血中濃度は10~30 μ g/mlに上昇する^{51,52)}。悪性腫瘍などの病的状態においても、血中でのTSP-1濃度の上昇と腫瘍組織中でのTSP-1発現の亢進が起り^{38,39,49,53)~56)}、さらには内皮細胞遊走能が促進されるものと思われる。

TSP-1の微小血管管腔形成に対する作用について、Sheibaniら⁵⁷⁾は、ウイルスで形質転換させた内皮細胞は管腔を形成できず、TSP-1 mRNAの発現がほとんどみられなかったが、TSP-1

遺伝子を導入しTSP-1を発現させることにより、管腔形成がみられるようになったとしている。さらにQianら⁵⁸⁾は、TSP-1は内皮細胞で形成された微小血管ネットワーク構造を安定化させるが、抗TSP-1抗体はそれを不安定化させることを見いだした。このことより、TSP-1自体が微小血管管腔形成、ネットワーク構造の安定化にも関与しているものと思われる。

上述のように基礎的研究がかなり進んでいるにもかかわらず、臨床検体におけるTSP-1発現について、ホルマリン固定後パラフィン包埋標本を用いた免疫組織学的研究として論文に報告されているものは、Grossfeldら⁹⁾の膀胱癌切除標本を用いた研究以外にはみられない。その一因として、ホルマリン固定後パラフィン包埋標本におけるTSP-1染色の困難さがあった。彼らは、ホルマリン固定後パラフィン包埋標本におけるTSP-1の免疫組織学的染色法を世界で初めて見いだした⁵⁹⁾。本研究においても、彼らの考案した方法に基づき良好な染色を得ることができた。

臨床病理学的因子とTSP-1発現との関連について、Grossfeldtら⁹⁾は膀胱癌組織中のTSP-1発現強度と原発巣の進行度、リンパ節転移の有無との相関はみられなかったとしている。本研究では、扁平上皮癌が腺癌と比較して、中および低分化型が高分化型と比較して、ⅢAおよびⅢB期がⅠ期と比較して、T2、T3、T4がT1と比較して、各々有意にTSP-1発現が高率であった。しかし、リンパ節転移および遠隔転移とTSP-1発現との関連はみられなかった。

野生型p53蛋白はTSP-1の転写を活性化し、p53蛋白の変異によってTSP-1発現が有意に低下する⁶⁰⁾という。Grossfeldtら⁹⁾は、膀胱癌において変異型p53蛋白の発現下ではTSP-1発現レベルが低い場合が多く、野生型p53蛋白の発現下ではTSP-1発現が中ないし高レベルである傾向がみられたとしている。しかし、中ないし高レベルのTSP-1発現を示す症例の約3分の1に、変異型p53蛋白の発現がみられたという。この原因について、彼らはp53以外の因子が変異型p53蛋白の存在下でTSP-1発現を刺激しているためではないか^{61,62)}としている。本研究では、変異型p53の存在下の方がTSP-1発現率が高かったが、これも上記の理由によるものである可能性がある。

TSP-1発現と長期予後との関連についてGrossfeldtら⁹⁾は、膀胱癌におけるTSP-1発現が中ないし高レベルの群では、低レベルの群に比して有意に予後良好であったとしている。一方、肺癌組織ではTSP-1発現が予後不良因子となる可能性が示唆されている⁶³⁾。本研究では、TSP-1陽性群では陰性群に比して有意に予後不良であり多変量解析の結果においてもTSP-1陽性は独立した予後不良因子であった。この結果は、Rothら⁶⁴⁾の肺癌組織における結果を支持するものであった。癌組織におけるTSP-1発現意義には、発生臓器や組織の違いによるTSP-1自体の機能および作用機序の多様性や、TSP-1と他因子との相互作用の違いが影響する可能性が考慮される。従って、TSP-1発現意義の解明には、血管新生因子群をも含めた他因子との相関関係について更なる検討が必要であると考えられる。

以上より、原発性非小細胞肺癌において、TSP-1は腫瘍増殖および微小血管新生に直接的あるいは間接的に関与し、癌の進展を促進している可能性が示唆された。最も強力な血管内皮増殖能を有し、肺癌において有用な予後因子となる可能性が示唆されている^{64,65)}VEGF発現との相関性も検討したが、免疫組織学的には明確な相関性を両者間に指摘することはできなかった。

た。従って、TSP-1はVEGFとは独立して肺癌の血管新生を介し、癌の進展に関与している可能性がある。

結 論

原発性非小細胞肺癌の切除標本を用いて、RT-PCR法によりTSP-1 mRNAの発現を調べ、さらに免疫組織学的方法によりTSP-1発現と血管新生因子群、p53蛋白発現、PCNA LI、臨床病理学的背景因子、長期予後との相関を検討して以下の結論を得た。

1. TSP-1 mRNA, TSP-1蛋白は、ともに正常肺組織に比し腫瘍組織で発現が亢進しており、免疫組織学的には特に腫瘍組織間質部に強い染色がみられた。
2. TSP-1発現とVEGF発現との相関はみられず、TSP-1陽性群では陰性群に比して、微小血管密度が有意に高かった。
3. TSP-1発現とp53蛋白発現との間に正の相関を認めた。
4. TSP-1陽性群は陰性群に比し、PCNA LIが有意に高かった。
5. TSP-1発現と臨床病理学的因子との相関では、扁平上皮癌が腺癌に比し、中および低分化型が高分化型に比し、ⅢAおよびⅢB期がⅠ期に比し、またT2, 3および4がT1に比し、各々TSP-1発現が有意に高率であった。リンパ節転移および遠隔転移と、TSP-1発現との相関はなかった。
6. TSP-1陽性群の予後は陰性群に比して有意に不良であった。また、TSP-1陽性は独立した予後不良因子であることが確認された。

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表します。また本研究の遂行に際し、終始直接御指導、御鞭撻を賜りました太田安彦助手に深謝いたします。さらに御協力を頂きました金沢大学外科学第一講座の皆様、病理標本作製にご協力を惜しまれなかった田中洋子氏に心から感謝致します。

なお、本研究の要旨は、第56回日本癌学会総会(1997, 京都)、第38回日本肺癌学会総会(1997, 仙台)において発表した。

文 献

- 1) Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. Thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:240-243, 1971
- 2) Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 253:8609-8616, 1978
- 3) Lawler J, Hynes RO. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 103:1635-1648, 1986
- 4) Fratier WA. Thrombospondins. *Curr Opin Cell Biol* 3:792-799, 1991
- 5) Wang TN, Qian X, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Breger DH, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 promotes the invasive properties of human breast cancer. *J Surg Res* 63:39-43, 1996
- 6) 内田信治, 山下裕一, 細川哲哉, 黒舩敏彦, 立石 勉, 柳瀬 豊, 掛川暉夫, 仙頭聖一. 肝細胞癌におけるThrombospondinの局在について一切除標本ならびに培養細胞を用いて. *肝臓* 35 Supplement(1): 345, 1994
- 7) 前田 清, 康 純明, 小川正文, 鄭 容錫, 小野田尚佳, 沢田鉄二, 仲田文造, 加藤保之, 西口幸雄, 曾和融生. VEGFおよび血管新生抑制因子Thrombospondin-1の発現からみた胃癌の予後. *日本消化器外科学会雑誌* 30: 1292, 1997
- 8) 国安哲矢, 中村 毅, 岩谷慶照, 鈴木知志, 川崎健太郎, 成田晃一, 榊原高至, 田淵芳樹. 胃癌におけるThrombospondin発現の意義. *日外会誌* 98臨時増刊号: 240, 1997
- 9) Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig S, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Tatlor CR, Skinner DG, Cote RJ. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 89:219-227, 1997
- 10) Qian X, Tuszynski GP. Expression of Thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med* 212:199-207, 1996
- 11) Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 25:1582-1584, 1994
- 12) 松影昭夫. PCNA. 実験医学別冊 Bio Science用語ライブラリー—細胞周期—(田矢洋一, 野島 博, 花岡文雄編), 112-113頁, 羊土社, 東京, 1995
- 13) 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
- 14) Tuszynski GP, Rothman V, Murphy A, Siegler K, Smith L, Smith S, Karczewski J, Kundsén KA. Thrombospondin promotes cell-substratum adhesion. *Science* 236:1570-1573, 1987
- 15) Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. Cell attachment to thrombospondin: The role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* 107:2351-2361, 1988
- 16) Morandi V, Fauvel-Lafeve F, Legrand C, Legrand YJ. Role of thrombospondin in the adhesion of human endothelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A:585-591, 1993
- 17) Tarabozetti G, Roberts DD, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111:765-772, 1990
- 18) Lahav J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochem Biophys Acta* 1182:1-14, 1993
- 19) Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41:1467-1477, 1993
- 20) Liska DJ, Hawkins R, Wikstrom K, Bornstein P. Modulation of thrombospondin expression during differentiation of embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol* 158:495-505, 1994
- 21) Corless CL, Mendosa A, Collons T, Lawler J. Colocalization of thrombospondin and syndecan during murine development. *Dev Dyn* 193:346-358, 1992
- 22) Castle VP, Ou X, O'Rourke K, Dixit VM. High level thrombospondin 1 expression in two NIH 3T3 cloned lines confers serum- and anchorage- independent growth. *J Biol Chem*

268:2899-2903, 1993

- 23) Varani J, Dixit VVM, Fligel SE, Mc Keever PE, Carey TE. Thrombospondin-induced attachment and spreading of human squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res* 167:376-390, 1986
- 24) Roberts DD, Sherwood JA, Ginsburg V. Platelet thrombospondin mediates attachment and spreading of human melanoma cells. *J Cell Biol* 104:131-139, 1987
- 25) Wang TN, Quian X, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin (TSP) on oral squamous carcinoma cell invasion of collagen. *Am J Surg* 170:502-505, 1995
- 26) Wang TN, Quian X, Rothman VL, Solomon MP, Granick MS, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin (TSP) on breast and oral carcinoma cell invasion of collagen. *Cancer Res* 36:75, 1995
- 27) Wong SY, Purdie AT, Han P. Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 140:1473-1482, 1992
- 28) Tuszynski GP, Nicosia RF. Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 70:228-233, 1994
- 29) Hosokawa T, Muraishi A, Rothman VL, Papale M, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on invasion of fibrin gels by human A549 lung carcinoma. *Oncol Res* 5:183-189, 1993
- 30) Albo D, Arnoletti JP, Castiglioni A, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. Thrombospondin (TSP) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β) promote human A549 lung carcinoma cell plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) production and stimulate tumor cell attachment in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 203:857-865, 1994
- 31) Arnoletti JP, Albo D, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. Thrombospondin and transforming growth factor beta 1 increase expression of urokinase type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer* 76:998-1005, 1994
- 32) Arnoletti JP, Albo D, Jhala N, Granick MS, Solomon MP, Atkinson B, Rothman VL, Tuszynski GP. Computer-assisted image analysis of tumor sections for a new thrombospondin receptor. *Am J Surg* 168:433-436, 1994
- 33) Tuszynski GP, Nicolsa RF. Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 70:228-233, 1994
- 34) Tuszynski GP, Gasic TB, Royzman VL, Kundsens KA, Gasic GJ. Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res* 47:4130-4133, 1987
- 35) Tuszynski GP, Rothman VL, Deutch AH, Hamilton BK, Eyal J. Biological activities of peptides and peptide analogues derived from common sequences present in thrombospondin, properdin, and malarial proteins. *J Cell Biol* 116:209-217, 1992
- 36) Wong SY, Purdie AT, Han P. Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign disease: An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 140:1473-1482, 1992
- 37) Clezardin P, Frappart L, Clerget M, Pechoux C, Delmas PD. Expression of thrombospondin (TSP-1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic and neoplastic human breast. *Cancer Res* 53:1421-1430, 1993
- 38) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-31, 1995
- 39) Weinder NJ, Semple LP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 324:1-8, 1991
- 40) Tuszynski GP, Nicolsa RF. The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays* 18:71-76, 1996
- 41) Ben Ezra D, Griffin BW, Maftzir G, Aharonov O. Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3601-3608, 1993
- 42) Raugi GJ, Olerud JE, Grown AM. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* 89:551-554, 1987
- 43) Canfield AE, Boot-Handford RP, Schor AM. Thrombospondin gene expression by endothelial cells in culture is modulated by cell proliferation, cell shape and the substratum. *Biochem J* 268:225-230, 1990
- 44) Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2224-2228, 1990
- 45) Bagavandoss P, Willkins JW. Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 170:867-872, 1990
- 46) Bagavandoss P, Kaytes P, Vogeli G, Wells PA, Willkins JW. Recombinant truncated thrombospondin-1 monomer modulates endothelial cell plasminogen activator inhibitor 1 accumulation and proliferation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 192:325-332, 1993
- 47) Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111:765-772, 1990
- 48) Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122:497-511, 1993
- 49) Tuszynski GP, Smith M, Rothman VL, Capuzzi DM, Joseph RR, Katz J, Besa EC, Treat J, Switalska HI. Thrombospondin levels in patients with malignancy. *Thromb Haemost* 67:607-611, 1992
- 50) Kao KJ, Klein PA. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of plasma thrombospondin. *Am J Clin Pathol* 86:317, 1986
- 51) Switalska HI, Niewiarowski S, Tuszynski GP, Rucinski B, Schmaier AH, Morinelli TA, Cierniewski CS.

- Radioimmunoassay of human platelet thrombospondin: Different patterns of thrombospondin and beta-thromboglobulin antigen secretion and clearance from the circulation. *J Lab Clin Med* 106:690-700, 1985
- 52) Dawes J, Clemetson KJ, Gogted GO, McGregor J, Clezardin P, Prowse CV, Pepper DS. A radioimmunoassay for thrombospondin, used in a comparative study of thrombospondin, β -thromboglobulin and platelet factor 4 in healthy volunteers. *Thromb Res* 29:569, 1983
- 53) Pratt DA, Miller WR, Dawes J. Thrombospondin in malignant and non-malignant breast tissue. *Eur J Cancer & Clin Oncol* 25: 343-350, 1989
- 54) Nathan FE, Hernandez E, Dunton CJ, Treat J, Switalska HI, Joseph RR, Tuszynski GP. Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 73:2852-2858, 1994
- 55) Tuszynski GP, Smith M, Rothman VL, Capuzzi DM, Joseph RR, Katz J, Besa EC, Treat J, Switalska HI. Thrombospondin levels in patients with malignancy. *Thromb Haemost* 67:607-611, 1992
- 56) Nathan FE, Hernandez E, Dunton CJ, Treat J, Switalska HI, Joseph RR, Tuszynski GP. Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 73:2853-2858, 1994
- 57) Sheibani N, Frazier WA. Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6788-6792, 1995
- 58) Qian X, Nicosia RF, Bochenek KM, Rothman VL, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on endothelial tube formation in vitro. *Mol Biol Cell* 5:179a, 1994
- 59) Grossfeld GD, Shi SR, Ginsberg DA, Rich KA, Skinner DG, Taylor CR, Cote RJ. Immunohistochemical detection of thrombospondin-1 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 44:761-766, 1996
- 60) Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 25: 1582-1584, 1994
- 61) Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS, Roberts DD. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 59:191-195, 1994
- 62) Mettouchi A, Carbon F, Montreau N, Vernier P, Mercier G, Blangy D, Tricoire H, Vigier P, Binetruy B. SPARC and thrombospondin genes are repressed by c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts. *EMBO J* 13:5668-5678, 1994
- 63) Roth JJ, Reiver DM, Granick MS, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP. Histopathology and clinical assessment correlate with the cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine (CSVTCG) receptor of thrombospondin-1 in breast tumors. *Histol Histopathol* 12: 1013-1018, 1997
- 64) Mattern J, Koomagi R, Volm M. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 6: 1059-1062, 1995
- 65) Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, Shimizu J, Oda M, Hayashi Y, Watanabe Y and Sasaki T. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2: 1411-1416, 1996

Thrombospondin-1 Expression in Primary Non-small Cell Lung Cancers Hidemaro Yoshida, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107**, 420 — 433 (1998)

Key words non-small cell lung cancer, thrombospondin, microvessel density, proliferating cell nuclear antigen, long term survival

Abstract

To evaluate the significance of thrombospondin-1 (TSP-1) expression in primary non-small lung cancers, the TSP-1 gene and associated protein expression were analyzed in 39 freshly frozen resected specimens and 346 formalin-fixed, paraffin-embedded resected specimens. Reverse transcription PCR revealed TSP-1 mRNA expression in 41.0% (16/39) of the patients the cancer tissues. An immunohistochemical examination revealed TSP-1 protein expression in 65.3% (226/346) of patients in the stromata of the cancer tissues. The mean value of microvessel density in the TSP-1 protein-positive group (34.5 ± 1.5) was significantly higher than in the TSP-1-negative group (28.3 ± 2.2) ($p < 0.05$). TSP-1 protein expression was significantly correlated with altered p53 protein expression ($p < 0.01$). The mean value of the proliferating cell nuclear antigen labelling index in the TSP-1 protein-positive group ($57.5 \pm 1.5\%$) was significantly higher than in the TSP-1 protein-negative group ($42.5 \pm 2.1\%$) ($p < 0.0001$). The degree of TSP-1 protein expression in the squamous cell carcinoma group (73.2%) was significantly higher than in the adenocarcinoma group (56.3%) ($p < 0.01$), and that in the moderately and poorly differentiated carcinoma groups (74.6% and 80.0%, respectively) was significantly higher than in the well differentiated carcinoma group (49.2%) ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). The degree of TSP-1 protein expression in the stage III A and III B groups (76.4% and 77.8%, respectively) was significantly higher than in the stage I group (54.1%) ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), and that in the T2, 3 and 4 groups (68.5%, 78.7% and 75.0%, respectively) was significantly higher than in the T1 group (52.2%) ($p < 0.01$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). No correlation was found between TSP-1 protein expression and N-factor or M-factor. A univariate analysis showed that in all 346 patients, the 5-year survival rate of the TSP-1 protein-positive group (32.1%) was significantly lower than that of the TSP-1 protein-negative group (58.8%) ($p < 0.001$). Moreover, in 148 curatively resected stage I patients, the 5-year survival rate of the TSP-1 protein-positive group (56.3%) was significantly lower than that of the TSP-1 protein-negative group (85.3%) ($p < 0.0001$). Multivariate analysis revealed that TSP-1 expression in the stromata of tumor was a independent poor-prognostic indicator. These results indicate that TSP-1 might be directly or indirectly involved in tumor neovascularization and cell proliferation, and could promote tumor progression in primary lung cancers.