

## 2次元電気泳動法による肺癌蛋白解析結果に基づく 原発性肺腺癌の生物学的悪性度評価

Evaluation of Biological Malignancy of Primary Lung Adenocarcinoma Using  
Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

平野 隆<sup>1</sup>・竹川広三<sup>1</sup>・日吉利光<sup>1</sup>・田口史子<sup>1</sup>・大平達夫<sup>1</sup>  
池田徳彦<sup>1</sup>・河手典彦<sup>1</sup>・小中千守<sup>1</sup>・海老原善郎<sup>2</sup>・加藤治文<sup>1</sup>

**要旨**：原発性肺腺癌切除材料を用いた蛋白の2次元電気泳動像が腫瘍の生物学的悪性度の指標になるか検討した。1994年～1996年に切除された肺腺癌症例の内、2次元電気泳動法による蛋白の解析が可能であった70例を対象とした。各症例ごとに以前報告した原発性肺癌組織関連蛋白(腺癌関連蛋白TA01～05、扁平上皮癌関連蛋白TSq01～04、神経内分泌腫瘍関連蛋白TS01～04)および細胞増殖能関連蛋白(PCNA)を同一ゲル上で評価した。この結果に基づき典型的肺腺癌パターン症例(定型例)と非典型的肺腺癌パターン症例(非定型例)に分類した。70例中定型例は26例(37.1%)、非定型例が44例(62.9%)であった。定型例では全症例、I期症例の3年間無再発率はそれぞれ69.2%、94.1%であり、非定型例の27.1%、46.7%に比較し有意に良好であった( $p=0.0011$ 、 $p=0.0030$ )。2次元電気泳動像による評価は肺腺癌の生物学的悪性度を反映すると考えられた。

[肺癌 40(3): 195～200, 2000, JJLC 40: 195～200, 2000]

**Key words** : Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Primary lung adenocarcinoma, Disease free survival rate, Biological malignancy

### 緒 言

原発性肺癌は一臓器に発症する癌腫でありながら組織学的に種々の形態を示し、組織学的形態に基づく分類がなされ、臨床的悪性度評価・治療法の選択に応用されている。2次元電気泳動法は蛋白質の解析法として既に確立したものであり<sup>1)</sup>、腫瘍学への応用でも培養細胞での解析はあるものの、外科的切除材料での解析は血清蛋白・間質細胞の混入などの問題から高分解能の解析は困難であった。

私達は1989年以来固形腫瘍切除材料を非酵素的に処理することで可能になった固形癌の2次元電気泳動法による腫瘍蛋白解析を進めてきた<sup>2)3)</sup>。私達はこの手技を肺癌切除材料に応用することで組織学的分化と関連の深いペプチドを検出し、同定を進めてきた<sup>4)</sup>。これらの組織学的分化と関連するとみられる蛋白とすでに2次元電気泳動ゲル上で同定されている細胞増殖能関連蛋白を同時に評価することは腫瘍の生物学的性格、臨床的には腫瘍の悪性度を反映する診断が可能になると考える。

そこで2次元電気泳動による解析がこれまでに最も進んだ原発性肺腺癌について2次元電気泳動パターンに基づく腫瘍の悪性度評価を試みた。

### 材料と方法

#### 外科的切除材料

1994年～1996年までに東京医科大学病院外科にて切除された原発性肺腺癌の内2次元電気泳動法による蛋白解析が可能であり、術後経過観察が東京医大病院にて行われている70例を対象にprospectiveに術後病理組織学的診断・予後との関係の評価した。70例の内訳は高分化型26例、中等分化型27例、低分化型17例；IA期21例、IB期11例、IIA期5例、IIB期6例、IIIA期15例、IIIB期7例、IV期5例であった。

#### 非酵素処理による2次元電気泳動サンプルの調整および2次元電気泳動法

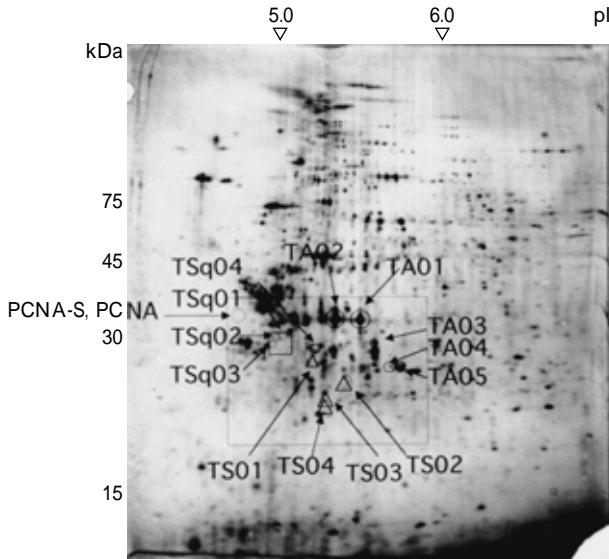
固形腫瘍の2次元電気泳動用サンプルの調整はB. Franzén, K. Okuzawaらの方法に従い施行した<sup>2)3)</sup>。外科的切除された腫瘍は切除後直ちに処理され、蛋白量で30μgのサンプルが一回の2次元電気泳動により解析された。蛋白の2次元電気泳動法は一次元めに蛋白の持つ電荷により分離する等電点電気泳動を内径1.2mm、長さ200mmのガラス管内で施行(800V, 14.5時間；1000V, 1.0時間)された。等電点電気泳動終了後スパゲッティ状のゲルは180mm×190mm×1.0mmの大きさの10%～13%Tのlinear gradient SDS-poly-acrylamide gel上にのせられ8～10℃, 10mAの条件で泳動された。

2次元電気泳動後20%エタノールにて蛋白をゲル上に固定、銀染色にて各蛋白のスポットを描出した<sup>5)</sup>。

1. 東京医科大学第一外科

2. 同 第二病理

**Fig. 1.** Overview of the 2-DE pattern of primary lung adenocarcinoma. The regions subjected to this analysis are enclosed by a box. The locations of the 13 polypeptides associated with histopathological differentiation are shown by the following marks.  $\square$ : polypeptides associated with adenocarcinoma (TA01 ~ 05);  $\triangle$ : polypeptide associated with squamous cell carcinoma (TSq01 ~ 04);  $\circ$ : polypeptides associated with neuroendocrine tumor (TS01 ~ 04);  $\odot$ : PCNA and PCNA-satellite spot



2次元電気泳動像の評価

以前報告した原発性肺癌各組織型に特徴的な13種類の原発性肺癌組織学的分化関連蛋白(腺癌関連蛋白TA01~TA05, 扁平上皮癌関連蛋白TSq01~TSq04, 神経内分泌腫瘍関連蛋白TS01~TS04)および細胞増殖能関連蛋白proliferating cell nuclear antigen(PCNA)とそのsatellite spot(PCNA-s)を発現の程度を評価した(Fig. 1). 肺腺癌関連蛋白(TA01-05)はその発現量により(-):陰性(±):灰色の小さなスポットとして認識,(+):黒色のスポットとして明瞭に認識(2+):高分子領域に向かう尾を引いたスポットあるいは通常発現量を示すスポットよりも明らかに大きなスポットとして認識,の4段階で評価した.

原発性肺癌症例の評価

腺癌関連蛋白TAに関する評価(評価法I)

(-):0点(±):0.5点(+):1点,(2+):2点とし,TA蛋白発現量評価の合計点数が3.5以上を典型的腺癌電気泳動パターンとした.

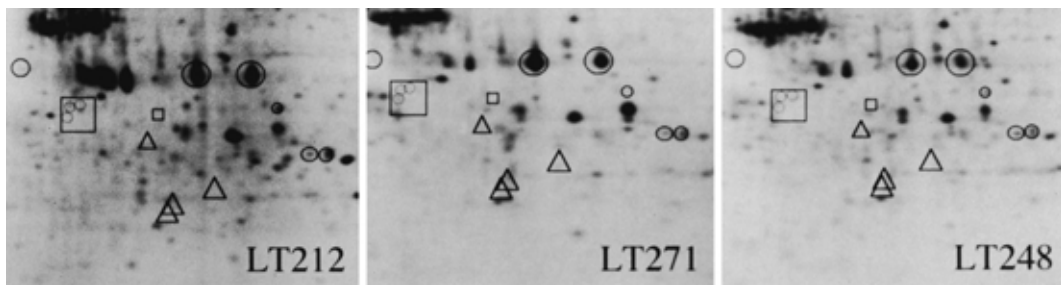
扁平上皮癌関連蛋白TSq・神経内分泌腫瘍

関連蛋白TS・細胞増殖能関連蛋白の評価(評価法II)

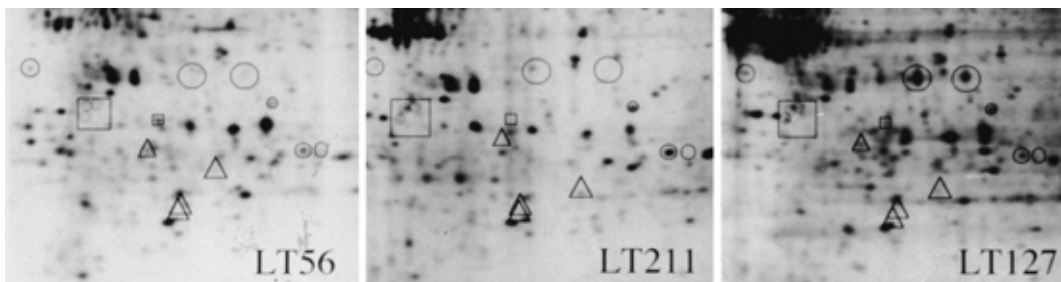
TSq蛋白群,TS蛋白群,PCNA,PCNA-sの内2個以上の蛋白の発現を認めない場合を典型的腺癌2次元電気泳動パターンとした.

I,IIの両方の評価法でいずれも典型的腺癌2次元電気

**Fig. 2.** A) Three representative adenocarcinoma cases with typical 2-DE pattern. LT212: Well differentiated adenocarcinoma, LT271: Well differentiated adenocarcinoma, LT248: Moderately differentiated adenocarcinoma. B) Three representative adenocarcinoma cases with atypical 2-DE pattern. LT75: Moderately differentiated adenocarcinoma, LT211: Moderately differentiated adenocarcinoma, LT56: Poorly differentiated adenocarcinoma.



A) Adenocarcinoma cases with typical 2DE-pattern



B) Adenocarcinoma cases with atypical 2DE-pattern

**Table 1.** Relationship between the classification of adenocarcinoma based on 2-DE patterns and histopathological findings

	Typical cases (cases)	Atypical cases (cases)
<u>Histopathological differentiation</u>		
W/D Adc	17	9
M/D Adc	8	19
P/D Adc	1	16
<u>t-factor</u>		
t1	13	18
t2	9	17
t3	0	5
t4	4	4
<u>n-factor</u>		
n0	17	19
n1	4	9
n2	4	15
n3	1	1
<u>m-factor</u>		
m0	25	40
m1	1	4
<u>Pathological stage</u>		
stage I A	10	11
stage I B	7	4
stage II A	2	3
stage II B	0	6
stage III A	2	13
stage III B	4	3
stage IV	1	4

W/D Adc : Well differentiated adenocarcinoma, M/D : Moderately differentiated adenocarcinoma, P/D Adc : Poorly differentiated adenocarcinoma

泳動パターンとされた症例を典型的肺腺癌パターン症例(以下, 定型例)とし, それ以外の症例を非典型的肺腺癌パターン症例(以下, 非定型例)とした。

#### 統計学的解析

組織・細胞学的に再発が確認されるか, 画像診断上明らかに再発と診断された時点を再発とした。Kaplan-Meier 法にて disease-free survival curve を描き, 各群間の有意差検定は Logrank test により検定し, 危険率 1% 未満をもって有意と判定した。

#### 結 果

原発性肺腺癌の 2 次元電気泳動像を Fig. 1 に示す。比較的 low molecular weight 領域に今回の解析対象の原発性肺腺癌組織学的分化関連蛋白, PCNA のスポットは集中しており, 解析対象とした領域を点線で示している。Fig. 2A に典型的肺腺癌パターンを示した 3 症例, Fig. 2B に非典型的肺腺癌パターンを示した 3 症例を提示する。

この結果, 26 例(37.1%)が定型例, 44 例(62.9%)が非定型例と判定された。定型例 26 例の内 17 例(65.4%)が高分化型であるのに対し非定型例では 44 例中 9 例(20.5%)であった。また, 定型例 9 例(34.6%)にリンパ節転移を認めたのに対し, 非定型例では 25 例(65.1%)にリンパ節転移を認めた。各群における術後病理学的因子および術後病理病期との関係を Table 1 に示す。

各群における disease-free survival curve を Fig. 3 Fig. 4 に示す。Fig. 3 は全症例での解析結果, Fig. 4 は病理病期 I 期症例に限った解析結果である。どちらの解析でも非定型例は定型例に比べ再発までの期間が有意に短かった ( $p=0.0011$ ,  $p=0.0030$ )。

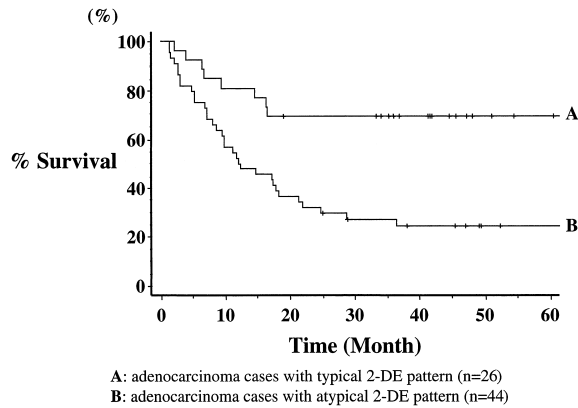
#### 考 察

現在原発性肺腺癌はその病理組織学的形態に従って大きく 4 つに分類され, 治療法の選択・予後の推測に用いられている。しかしながら特に低分化癌の内にはそれぞれの境界的性格を有する症例があることが報告されている。形態学的にも両者の性格が混在している場合(腺扁平上皮癌, combined small-cell type, small cell lung cancer with a large cell component<sup>7)-9</sup>)など, 細胞化学的にのみ証明され形態学的には鑑別困難な場合(non-small cell lung cancer with neuroendocrine feature<sup>10</sup>)があり, 必ずしも形態学的な検索だけでは腫瘍の生物学的特性を正確に評価することが困難であることが明らかになってきた。

私達は固形腫瘍より抽出した蛋白を材料とした 2 次元電気泳動法による解析を 1989 年以来スウェーデンカロリンスカ研究所病理部と共同して行ってきた。非酵素処理によるサンプル処理法の確立により乳癌・肺癌などの固形腫瘍由来の蛋白解析が高分解能 2 次元電気泳動法により可能となった<sup>2),3)</sup>。典型的な原発性肺腺癌の解析ではそれぞれの組織学的分化傾向に特徴的な 2 次元電気泳動パターンがあることが分かっている<sup>4)</sup>。1994 年~1996 年に東京医科大学病院外科で切除された原発性肺腺癌は術直後に 2 次元電気泳動法による腫瘍関連蛋白解析が行われ, 泳動パターンの解析がなされた。今回, 全症例が術後 3 年を経過した時点で 2 次元電気泳動像の術直後の評価と病理組織学的因子, 病理病期, 再発までの期間との関係を prospective に検討した。

2 次元電気泳動像の評価は肺腺癌関連蛋白 TA01~05 の 5 つの蛋白の発現程度が低い場合と扁平上皮癌関連蛋白・神経内分泌腫瘍関連蛋白あるいは細胞増殖能関連蛋白(PCNA, PCNA-s)の発現が 2 個以上発現する場合を非典型的肺腺癌 2 次元電気泳動パターンとして典型的肺腺癌 2 次元電気泳動パターン症例と比較検討した。すなわち, 非定型例とは腺癌への分化傾向の乏しい症例・他の組織型への分化傾向を併せ持つ可能性のある症例・細胞増殖

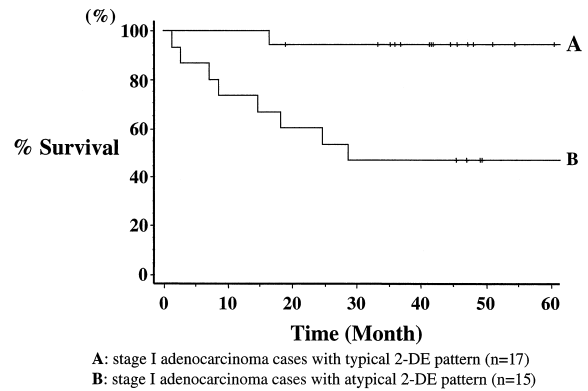
**Fig. 3.** Curves A and B indicate disease-free survival probability for adenocarcinoma cases with typical and atypical 2-DE patterns. The 3-year and 5-year disease-free survival rates were both 69.2% in typical cases, whereas they were 27.1% and 24.4% in atypical cases, respectively. There was a statistically significant difference in the disease-free survival curves of typical cases and atypical cases ( $p=0.0011$ )



能の旺盛な症例である。その結果、定型例で高分化型症例・病理病期I期症例が多く、電気泳動パターンによる解析結果は組織学的分化度・病理病期と独立した因子とは考えられない。しかしながら高分化腺癌と術後診断された症例の中にも非定型例が9例含まれていた。また、全症例を対象と予後解析で定型例では非定型例に比較し予後良好と見られたが、両群間に病理病期に偏りがあるためI期症例に限った検討も併せ行った。I期症例の解析では腫瘍径が大きいstage IB症例が定型例の方に多かったにもかかわらず、定型例は非定型例に比較し予後良好であった。I期定型例に腫瘍径の大きい症例が多いのは非定型例に比較しリンパ節転移に時間を要する結果であり、定型例の転移能が低いことを示唆するものと考えられる。これらの結果は2次元電気泳動像に基づく原発性肺腺癌の解析はより生物学的腫瘍の性格を反映している可能性があると考えられる。

高分解能2次元電気泳動法による蛋白の解析では目的の蛋白を単離することが可能である。そこで現在私達は原発性肺癌切除材料および肺癌培養細胞から2次元電気泳動法により肺癌関連蛋白を単離・精製し、その分子の

**Fig. 4.** Curves A and B indicate disease-free survival probability for stage I adenocarcinoma cases with typical and atypical 2 DE patterns. Both 3-year and 5-year disease free survival rates were 94.1% in typical cases and 46.7% in atypical cases. There was a statistically significant difference between the disease-free survival curves of typical and atypical cases ( $p=0.0030$ )



解析を試みている。この内、TA02の解析が最も進んでおり、2次元電気泳動ゲル上での発現量の比較では分化型の腺癌であるほど発現量が多いこと、杯細胞型あるいは転移性肺腺癌・肺腺癌培養細胞では発現していないことが分かっている<sup>11)</sup>。またこの分子は aspartic pronase の一種であることが判明しつつあり<sup>12),13)</sup>、私達はTA02分子に対するモノクローナル抗体をすでに得ている。TS02での同様の解析ではこの分子が脳組織から抽出されている protein gene product 9.5 (PGP 9.5)<sup>14)</sup>と同一分子である可能性が高いことも分かっている(未発表データ)。今後さらにこれら個々の組織分化関連蛋白の解析を進めることで今回の解析結果がもつ意味がさらに明確になることが期待される。

## 結語

蛋白の2次元伝電気泳動像から見た定型例は非定型例に比べ悪性度が高く、予後不良であった。2次元電気泳動パターンに基づく原発性肺腺癌の解析は腫瘍の生物学的性格を反映している可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021, 1975.
- 2) Franzèn B, Okuzawa K, Linder S, et al: Non-enzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 14: 1045-1053, 1993.
- 3) Okuzawa K, Franzèn B, Lindholm J, et al: Characterization of gene expression in clinical lung cancer material by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 15: 382-390, 1994.
- 4) Hirano T, Franzèn B, Uryu K, et al: Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br J Cancer* 72: 840-848, 1995.
- 5) Morrissey JH: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensi-

- tivity. *Anal Biochem* 117 : 307-310, 1981.
- 6) Celis JE, Celis A : Cell cycle-dependent variations in the distribution of nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells : subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 3262-3266, 1985.
- 7) Hirsh FA, Matthews MJ, Aisner S, et al : Histopathological classification of small cell lung cancer. *Cancer* 62 : 973-977, 1988.
- 8) Radice PA, Matthews MJ, Ihde DC, et al : The clinical behaviour of 'mixed' small cell/large cell bronchogenic carcinoma compared to 'pure' small cell subtypes. *Cancer* 50 : 2894-2902, 1982.
- 9) Nomori H, Shimosato Y, Kodama T, et al : Subtypes of small cell carcinoma of the lung : morphometric, ultrastructural and immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 17 : 604-613, 1986.
- 10) Gazdar AF, Helman LJ, Israel MA, et al : Expression of neuroendocrine cell markers L-dopa decarboxylase, chromogranin A, and dense core granules in human tumors of endocrine and non-endocrine origin. *Cancer Res* 48 : 4078-4082, 1988.
- 11) Hirano T, Fujioka K, Franzèn B, et al : Relationship between TA01 and TA02 polypeptides associated with lung adenocarcinoma and histocytological features. *Br J Cancer* 75 : 978-985, 1997.
- 12) Tannell PJ, Powell DJ, Hill J, et al : Napsins : new human aspartic proteinases. Distinction between two closely related genes. *FEBS Lett* 441 : 43-48, 1998.
- 13) Chuman Y, Bergman A, Ueno T, et al : Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett* 462 : 129-134, 1999.
- 14) Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, et al : PGP9.5 - a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 278 : 224-228, 1983.
- 15) Rode J, Dhillon AP, Doran JF, et al : PGP9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 9 : 147-158, 1985.

---

(原稿受付 2000年2月9日/採択 2000年4月13日)

## Evaluation of Biological Malignancy of Primary Lung Adenocarcinoma Using Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

*Takashi Hirano<sup>1</sup>, Hiromi Takekawa<sup>1</sup>, Toshimitsu Hiyoshi<sup>1</sup>, Fumiko Taguchi<sup>1</sup>, Tatsuo Ohira<sup>1</sup>, Norihiko Ikeda<sup>1</sup>, Norihiko Kawate<sup>1</sup>, Chimori Konaka<sup>1</sup>, Yoshiro Ebihara<sup>2</sup> and Harubumi Kato<sup>1</sup>*

1. Department of Surgery, Tokyo Medical University

2. Department of Pathology, Tokyo Medical University

**Objective** : The usefulness of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis ( 2-DE ) combined with non-enzymatic sample preparation technique of surgically resected primary lung adenocarcinoma was discussed in terms of tumor malignancy.

**Study Design** : Measurement of clinical materials was successful in 70 patients with primary lung adenocarcinoma between 1994 and 1996. We estimated the expression levels of the polypeptides associated with histopathological type as previously described ( i. e. polypeptides associated with adenocarcinoma, TA01 ~ 05 ; polypeptides associated with squamous cell lung carcinoma, TSq01 ~ 04 ; polypeptides associated with neuroendocrine tumor, TS01 ~ 04 ) and proliferating cell nuclear antigen( PCNA ) on 2-DE gels at the same time. Based on these data, all adenocarcinoma cases were classified into two groups and we attempted to evaluate the relationship between histopathological factors and prognosis in both groups.

**Results** : We classified 26 cases ( 37.1% ) as adenocarcinoma case with a typical 2-DE pattern and 44 cases ( 62.9% ) as aadenocarcinoma with an atypical 2-DE pattern. The 3-year disease-free survival rates were 69.2% and 27.1% in typical cases and atypical cases, respectively, showing a statistically significant difference (  $p=0.0011$  ). In stage I cases there was also a statistically significant difference ( 3-year disease-free survival rate : typical cases, 94.1% ; atypical cases, 46.7% ;  $p=0.0030$  ).

**Conclusion** : There is a strong possibility that 2DE evaluation may reflect biological malignancy of surgically resected primary lung adenocarcinoma.

[ JJLC 40 : 195 ~ 200, 2000 ]