

# 肺線維化巣における発癌機序の免疫組織化学的検討 特に血小板由来増殖因子 (PDGF) との関連性について

Immunohistochemical Analysis of Tumorigenesis in the Fibrotic Lung

本間 栄<sup>1,2</sup>・中田紘一郎<sup>1,2</sup>

**要旨**：特発性間質性肺炎 (IIP) に合併した肺癌症例の肺組織を用い肺線維化に關与するサイトカインの内、プロトオンコジーンでもある PDGF-B 蛋白の肺組織内局在、分布を検討すると同時にオンコジーン、細胞周期調節因子の発現との関連性を考察し肺線維化巣における発癌機序を形態学的に解明することを目的とした。対象は肺癌を合併した IIP、コントロールは IIP の急性増悪、膠原病に伴う間質性肺炎、原発性肺癌および健常肺で方法は剖検あるいは手術摘出肺組織を用い PDGF-B, PDGF Receptor- $\beta$ , PCNA, c-myc, c-erbB-2, p53, p21 および p27 それぞれの抗体を免疫組織学的方法 (Avidin Biotin Complex 法) により染色し肺組織内の局在、分布を顕微鏡下で形態学的に検討した。更に非 RI in situ hybridization 法で PDGF-B mRNA の発現も検討した。結果は肺癌を合併した IIP, IIP の急性増悪, IP-CVD の肺組織に認められる化生上皮細胞, 異型肺胞 II 型上皮細胞および肺癌細胞において健常肺組織, 慢性非活動期の肺線維化部分では認められない PDGF-B, PDGF-receptor- $\beta$ , PCNA, c-erb B2, 9E10, 6E10, p53, p21, p27 が種々な程度、頻度で陽性所見を示し, PDGF-B mRNA の発現もこれらの細胞において確認できた。尚, IIP では IP-CVD より p53, p21 の発現率が共に低く p21 の発現が p53 に依存的で平衡する傾向が認められた。ところが肺癌細胞では p53 は高く p21 は低くその発現が p53 に非依存的であった。

以上より肺線維化過程における末梢気腔細胞の増殖, 癌化機構にこれらのプロトオンコジーン, オンコジーン, 細胞周期調節因子の誘導発現, 抑制ならびにそれらのネットワークが關与していることが示唆された。

[肺癌 40 (7): 725 ~ 729, 2000, JJLC 40: 725 ~ 729, 2000]

**Key words** : Pulmonary fibrosis, Lung cancer, Oncogene, PDGF, Cell cycle regulation

## はじめに

慢性型の特発性間質性肺炎 (IIP) に肺癌合併率が高いことと形態学的に肺線維化巣に増生する前癌病変と考えられる化生上皮細胞, 異型肺胞 II 型上皮細胞との関連性が注目されている<sup>1)</sup>。著者は最近、間質性肺炎の組織標本を用い肺末梢気腔の諸細胞において肺線維化に關与するサイトカインの中で competence 因子である platelet-derived growth factor (PDGF), progression 因子である insulin-like growth factor I (IGF-I) がいかに発現されるかを解析した。その結果, 急性活動期の間質性肺炎の組織では細気管支上皮細胞, 肺胞 II 型上皮細胞, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 線維芽細胞等に慢性非活動期お

び正常コントロールには認められない PDGF, IGF-I 蛋白の局在が確認され, 肺線維化との関連性においてこれらの増殖因子およびそのリセプターの誘導発現が示唆された。更に, この肺胞 II 型上皮細胞において PDGF-B と  $\beta$  Receptor mRNA の coexpression および同蛋白の産生を同時に認め, PDGF-B が同細胞の増殖にオートクライン機序を介して作用していることを見いだした<sup>2)</sup>。尚, PDGF-B はプロトオンコジーンでもあり原発性肺癌の cell line で発現しているとの報告<sup>3)</sup>はあるが肺線維化過程で末梢気腔細胞の癌化機構における關与を検討した報告はない。そこで IIP, 膠原病に合併した間質性肺炎および原発性肺癌症例の肺組織における PDGF-B, PDGF-Receptor- $\beta$ , Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), neu 癌遺伝子, c-myc 癌遺伝子, p53 癌抑制遺伝子, 細胞周期調節因子 (p21, p27) の肺組織内局在, 分布, 発現率を比較し肺線維化巣における発癌機序をこれらの因子の発現との関連性において形態学的に検討した。

## 対象と方法

対象は肺癌 (腺癌 7, 扁平上皮癌 4, 小細胞癌 1) を合併

1. 虎の門病院呼吸器科

2. 沖中記念成人病研究所

別刷請求先: 本間 栄 虎の門病院呼吸器科

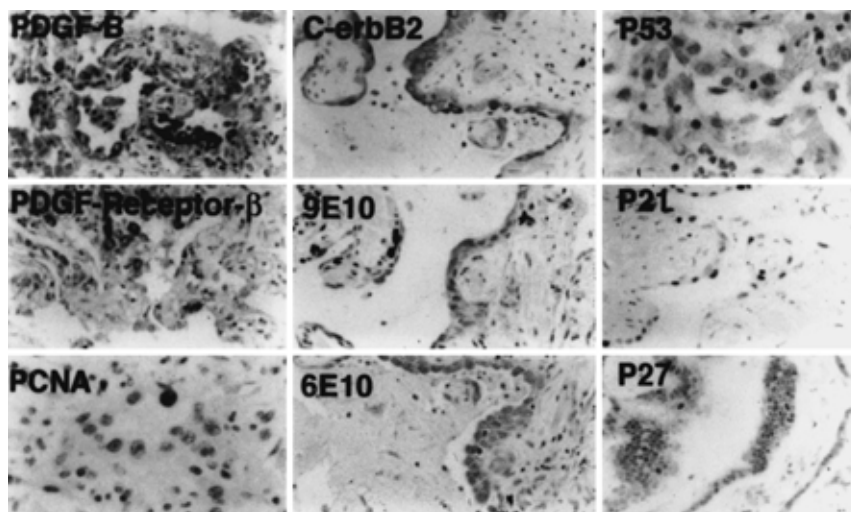
〒105-8470 港区虎ノ門 2-2-2

TEL: 03-3588-1111

FAX: 03-3582-7068

E-mail: sa-homma@toranomon.gr.jp

**Fig. 1.** Metaplastic cells or alveolar type II cells stained positively with anti-PDGF-B, -PDGF-Receptor- $\beta$ , -PCNA, -C-erb B-2, -9E10, -6E10, -p53, -p21 and -p27 antibodies in lung tissues with IIP ( $\times 100$ )



**Table 1.** Localization and expression rate of PDGF-B, -Receptor- $\beta$ , -BmRNA and PCNA in lung tissues

	PDGF			PCNA(n)
	-B protein(n)	-Receptor- $\beta$ (n)	-B mRNA	
Metaplastic cell or Alveolar type II cell				
IIP + Lung cancer	+( 12/12 )	+( 12/12 )	+	+( 8/12 )
IIP + Acute exacerbation	+( 5/5 )	+( 5/5 )	+	+( 5/5 )
IP-CVD	+( 6/6 )	+( 6/6 )	Not examined	+( 6/6 )
Lung cancer cell				
Non-small cell cancer	+( 9/9 )	+( 9/9 )	+	+( 9/9 )
Small cell cancer	+( 1/2 )	+( 2/2 )	Not examined	+( 2/2 )
Normal control	-( 0/5 )	-( 0/5 )	-	-( 0/5 )

Expression level : + , 10% ; - , 10% >

した IIP12 例, IIP の急性増悪 5 例, 膠原病に伴う間質性肺炎 (IP-CVD) 6 例 (シェーグレン症候群 2, 慢性関節リウマチ 2, 皮膚筋炎 1, 結節性多発動脈炎 1), 原発性肺癌 5 例 (腺癌 1, 扁平上皮癌 2, 腺扁平上皮癌 1, 小細胞癌 1) および健常肺組織 5 例を用いた。方法は剖検あるいは手術摘出肺組織の凍結またはホルマリン固定パラフィン包埋後, 3 $\mu$ m 幅に薄切した標本を用い抗 PDGF-BB 抗体 (ZP-215; Genzyme Corp.), 抗 PDGF Receptor- $\beta$  抗体 (1263-00; Genzyme Corp.), 細胞増殖の指標となる抗 PCNA 抗体<sup>4)</sup> (NCL-PCNA; Novocastra), 癌遺伝子に関する抗 c-erbB-2 抗体 (NCL-CB11; Novocastra), 抗 c-myc 抗体 (9E10; Pharmingen Com., 6E10; Genosys Biotechnologies Inc.), 変異型および野生型の p53 蛋白を認識する抗 p53 抗体 (DO7; Dako), 細胞周期の調節因子に関する抗 p21 抗体 (NCL-WAF-1; Novocastra), 抗 p27 抗体 (NCL-p27; Novocastra) を免疫組織学的方法 (Avidin Biotin Complex 法) により染色し肺組織内の局在, 分布, 発

現率を顕微鏡下で形態学的に検討した。更に非 RI in situ hybridization 法で PDGF-BmRNA の発現を検討した。尚, 発現率は Doglioni らの基準<sup>5)</sup>に従い陽性細胞数 10% 以上を陽性, 10% 以下は陰性として算出した。統計学的分析方法は統計ソフト StatView 5.0 を用い Fisher の直接確率計算法により行い, 危険率 5% 以下を有意とした。

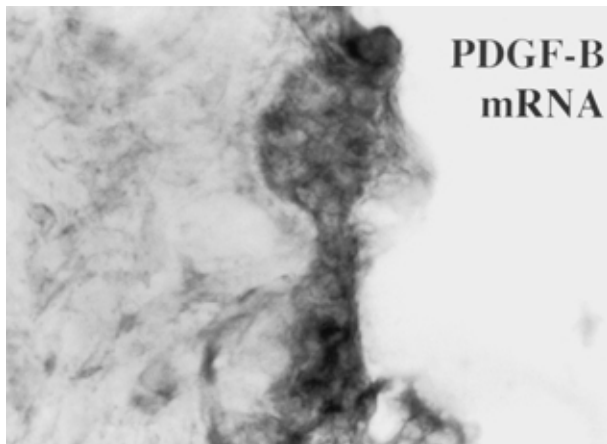
## 結果

初めに前記抗体による染色結果を示す (Fig. 1)。肺癌を合併した IIP, IIP の急性増悪, IP-CVD の肺組織に認められる化生上皮細胞, 異型肺胞 II 型上皮細胞および肺癌細胞において健常肺組織では認められない PDGF-B, PDGF-receptor- $\beta$ , PCNA, c-erb B-2, 9E10, 6E10, p53, p21, p27 が種々な程度, 頻度で陽性所見を示した。一方, このような上皮細胞の増生を伴わない慢性非活動期の肺線維化部分では全て陰性であった。

次に PDGF, PCNA の肺組織内の局在, 10% 以上の陽

性細胞を有する症例数の比率 ( 発現率 ) を Table 1 に示す . 前記間質性肺炎症例の肺組織に認められる化生上皮細胞 , 異型肺胞 II 型上皮細胞および非小細胞 , 小細胞肺癌細胞において健常肺組織では認められない PDGF-B , PDGF Receptor-β が細胞増殖の指標となる PCNA と同様に高率な発現が認められた . 尚 , PDGF-B mRNA の発現

**Fig. 2.** Hybridization with the complementary antisense probes demonstrated strong expression of the mRNAs for PDGF-B in the metaplastic cells of lung tissues with IIP ( × 200 )



もこれらの化生 , 異型上皮細胞において確認できた ( Fig. 2 ) . 即ち , PDGF-B がこれらの細胞の増殖にオートクライン機序を介して作用している可能性が示唆された .

次に c-erb B-2 , 9E10 , 6E10 の局在 , 発現率を Table 2 に示す . 前記間質性肺炎症例に認められる化生上皮細胞 , 異型肺胞 II 型上皮細胞でも原発性肺癌の非小細胞癌 , 小細胞癌組織と同様に健常肺では認められない癌遺伝子の発現が高率に認められた .

更に p53 , p21 , p27 の局在 , 発現率を Table 3 に示す . 肺癌を合併した IIP , IIP の急性増悪では IP-CVD より p53 , p21 の発現率が共に低く p21 の発現が p53 に依存的で平衡する傾向が認められた . ところが肺癌細胞では p53 の発現率が高いのに反し p21 は低くその発現が p53 に非依存的であった . 尚 , p27 の発現率に一定の傾向はなく健常肺組織の細気管支上皮細胞にも高率な発現が認められた .

**考 察**

間葉系細胞の増殖において PDGF は G0 期から G1 期への移行を促進する . 一方 , 細胞周期の進行はサイクリン依存性キナーゼ ( CDK ) により制御されており , CDK の活性はサイクリンと呼ばれる活性化因子と CDK インヒビターにより調節されている . G1 期から S 期への移行

**Table 2.** Localization and expression rate of c-erb B-2, 9E10, and 6E10 in lung tissues

	c-erb B-2 ( n )	9E10 ( n )	6E10 ( n )
Metaplastic cell or			
Alveolar type II cell			
IIP + Lung cancer	+( 9/12 )	+( 12/12 )	+( 12/12 )
IIP + Acute exacerbation	+( 5/5 )	+( 5/5 )	+( 5/5 )
IP-CVD	+( 5/6 )	+( 5/6 )	+( 6/6 )
Lung cancer cell			
Non-small cell cancer	+( 3/9 )	+( 9/9 )	+( 7/9 )
Small cell cancer	+( 1/2 )	+( 1/2 )	+( 2/2 )
Normal control	-( 0/5 )	-( 0/5 )	-( 0/5 )

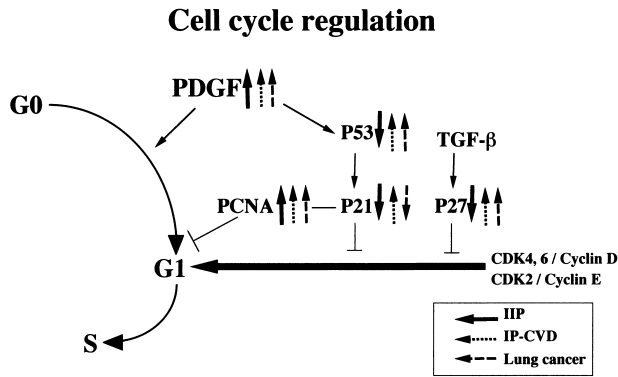
Expression level : + , 10% ; - , 10% >

**Table 3.** Localization and expression rate of P53, P21 and P27 in lung tissues

	P53 ( n )	P21 ( n )	P27 ( n )
Metaplastic cell or			
Alveolar type II cell			
IIP + Lung cancer	-( 0/12 )	-( 0/12 )	+( 9/12 )
IIP + Acute exacerbation	+( 1/5 ) * ** ]	+( 1/5 ) * ** ]	+( 1/5 ) ** ** ]
IP-CVD	+( 5/6 ) * ** ]	+( 3/6 ) * ** ]	+( 4/6 ) * ** ]
Lung cancer cell			
Non-small cell cancer	+( 6/9 )	-( 0/9 )	+( 6/9 )
Small cell cancer	+( 1/2 )	-( 0/2 )	+( 2/2 )
Normal control	-( 0/5 )	-( 0/5 )	+( 5/5 )

Expression level : + , 10% ; - , 10% > \* : p < 0.05 , \*\* : p > 0.05

**Fig. 3.** Cell cycle regulation. Comparison between metaplastic cells and alveolar type II cells in IIP, IP-CVD, and lung cancer cells.



は CDK4,6,2 およびこれらと複合体を作り活性化するサイクリン D および E によって制御されている。又、この過程では種々の CDK インヒビターが細胞周期進行を阻害している。即ち、TGF- $\beta$  により発現が誘導される p27、野生型 p53 により誘導される p21 が阻害している。尚、p21 は PCNA に直接結合することにより DNA の複製を阻害し細胞の増殖を停止する<sup>6,7)</sup>。更に最近、PDGF が p53 を介さずに直接 p21 の発現を調節していることが報告された<sup>8)</sup>。

このような観点から今回の結果をまとめ IIP, IP-CVD, 肺癌症例の細胞周期の調節に関する相違点をシェーマで示す (Fig. 3)。3 者共に PDGF, PCNA の発現は亢進し細胞増殖促進状態を示す。しかし PDGF-B 蛋白の発現は肺癌合併 IIP および肺癌症例のみで認められる特異的な変化ではなく肺癌非合併症例の間質性肺炎組織でも認められ、慢性炎症病態下における発癌機序にはプロトオンコジーン、リセプタージーンの活性化による前癌病変の自己増殖の誘導以外に他因子の関与が存在すると考えられる。即ち、肺癌合併 IIP 症例はその殆どが重喫煙者であるという背景を有し、喫煙により扁平上皮化生の異型度が増加すると p53 陽性細胞数が増加し高度異型上皮では遺伝子変異も確認されている<sup>9)</sup>ことを考慮すると、喫煙による発癌物質が DNA 修飾、変異の促進をもたらす前癌病変における PDGF-B 及びリセプター蛋白の誘導発現と複雑に絡み合い癌化が導かれる可能性が推測される。

尚、p53, p21 の発現に関して今迄に IIP, IP-CVD の肺組織においては両者共に upregulation され高率な発現が認められたとする報告<sup>10,11)</sup>があるが、今回の結果は IP-CVD

では p53, p21 両方の発現亢進が認められたが IIP では両者共に低下し、肺癌では p53 の発現が亢進し p21 の発現は低下していた。即ち、今回用いた抗 p53 抗体は変異型および野生型両者の p53 蛋白を認識し、通常は半減期の長い変異型が染色される。しかし間質性肺炎組織においてはどちらが優位に染色されるか不明であり、IP-CVD においては p21 の発現を誘導する野生型 p53 が優位であるため細胞周期進行は抑制されるのに対し肺癌では変異型 p53 が優位であるため p21 の発現が抑制され、IIP では野生型、変異型両者共に低下しているため p21 の発現が抑制され後 2 者では細胞周期進行が促進されるとも解釈できる。更に、IIP では特に活動期に出現する末梢化生、異型上皮細胞における DNA 障害および再生の過程で変異型 p53 が優位になると肺癌と同様のパターンとなり細胞の異常増殖ひいては癌化が促進され、野生型 p53 が優位となればアポトーシス<sup>12)</sup>の亢進と共に細胞の増殖が停止し炎症が修復過程に入る可能性が示唆される。尚、興味深いことに今迄にこれらの因子の発現時期に関し著者らは IIP の慢性非活動期ではなく急性活動期のみ PDGF-B の発現を認め、北村ら<sup>13)</sup>も肺線維症の実験モデルにおいて p53, p21 の発現が DNA 障害期の 24 時間後に最大になると報告しており、急性活動期における細胞増殖調節の重要性を示唆している。

今回の検討結果を要約すると IIP の肺組織に認められる化生上皮細胞、異型肺胞 II 型上皮細胞においては PDGF, PCNA, 癌遺伝子の発現亢進が認められ特に PDGF-B がこれらの細胞の増殖にオートクライン機序を介して作用している可能性が示唆された。更に、p21 の発現抑制による細胞周期進行の促進が助長されるとこれらの細胞の異常増殖ひいては癌化が生じる可能性が推測された。即ち肺線維化過程における末梢気腔細胞の癌化機構及びそのオートクライン増殖に PDGF-B 及びそのリセプター蛋白、癌遺伝子、細胞周期調節因子の誘導発現、抑制ならびにそれらのネットワークが関与していることが示唆された。

**謝辞:** 免疫組織化学について御指導、御協力頂いた順天堂大学病理学第 1 阿部 寛技師、同第 2 生化学、長岡 功教授、虎の門病院病理部、松下 央部長に深謝する。

本研究の一部は平成 10 年度 (財) 沖中記念成人病研究所の研究助成を受けた。

## 文 献

- 1) 松下 央: 特発性間質性肺炎と肺癌. 病理と臨床 11: 178-182, 1993.
- 2) Homma S, Nagaoka I, Abe H, et al: Localization of

platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I in the fibrotic lung. Am J Respir Crit Care Med 152: 2084-2089, 1995.

- 3) Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, et al : Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor ( PDGF ) and PDGF receptor mRNAs and their protein products. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 3942-3946, 1992.
- 4) Pendleton N, Dixon GR, Burnett HE, et al : Expression of proliferating cell nuclear antigen ( PCNA ) in dysplasia of the bronchial epithelium. J Pathol 170 : 169-172, 1993.
- 5) Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, et al : p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon : its relationship with differentiation. J Pathol 179 : 248-253, 1996.
- 6) 矢ノ下 玲, 宮木美知子 : 悪性腫瘍と p53 病理と臨床 14 : 52-55, 1996.
- 7) 小林英紀 : 細胞周期と癌抑制遺伝子 . 臨床病理 440 : 3-11, 1996.
- 8) Michieli P, Chetid M, Lin D, et al : Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. Cancer Res 54 : 3391-3395, 1994.
- 9) Bennet WP, Colby TV, Travis WD, et al : p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. Cancer Research 53 : 4817-4822, 1993.
- 10) Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, et al : p21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 154 : 477-483, 1996.
- 11) Kunitake R, Kuwano K, Miyazaki H, et al : Expression of p53, p21( Waf1/Cip1/Sdi1 ) and Fas antigen in collagen vascular and granulomatous lung diseases. Eur Respir J 12 : 920-925, 1998.
- 12) 井本正哉 : 細胞周期とアポトーシス . 編集, 西條長宏, 医薬ジャーナル社, 東京, 42-51 頁, 1999.
- 13) 北村 均, 奥寺康司, 伊藤隆明, 他 : 喫煙による反応性, 腫瘍性病変における細胞回転制御因子の動態 bleomycin によるマウス肺細胞 DNA 傷害の修復における p53 と p21Waf1 の役割 . 平成 9 年度 喫煙科学研究財団研究年報 : 64-69, 1997.

(原稿受付 2000 年 6 月 23 日/採択 2000 年 8 月 16 日)

## Immunohistochemical Analysis of Tumorigenesis in the Fibrotic Lung

*Sakae Homma and Koichiro Nakata*

Division of Respiratory Diseases, Toranomon Hospital, Okinaka Memorial Institute  
for Medical Research, Tokyo 105-8470, Japan

**Objective** : To analyze the mechanisms responsible for the increasing incidence of lung cancer in the fibrotic lung.

**Methods** : Platelet-derived growth factor ( PDGF )-B, PDGF-receptor- $\beta$ , proliferating cell nuclear antigen ( PCNA ), c-erbB-2, c-myc ( 9E10,6E10 ), p53, p21 and p27 were evaluated immunohistochemically in lung tissues obtained from 12 patients with lung cancer associated with idiopathic interstitial pneumonia( IIP ), 5 patients with acute exacerbation of IIP, 6 patients with interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases ( IP-CVD ), 5 patients with primary lung cancer and 5 normal controls. Additionally, the messenger ribonucleic acids ( mRNAs ) for PDGF-B were investigated by in situ hybridization.

**Results** : PDGF-B, PDGF-receptor- $\beta$ , PDGF-BmRNA, PCNA, c-erbB-2, 9E10, 6E10, p53, p21 and p27 stained positively in metaplastic cells or alveolar type II cells in lung tissues in patients with early-active stage IIP, IP-CVD and primary lung cancer but not in cases with late-inactive stage IIP or in normal controls. The expression rate of p53 and p21 correlated closely in IIP and IP-CVD but not in primary lung cancer.

**Conclusions** : These results suggest that metaplastic cells or alveolar type II cells frequently observed in the active region of fibrotic lung tissues may have the potential to undergo malignant transformation, leading to lung cancer.

[ JJLC 40 : 725 ~ 729, 2000 ]