

原発性肺癌における Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) 発現の免疫組織化学的検討

Immunohistochemical Study of Thyroid Transcription Factor-1
Expression in Lung Cancers

石和直樹^{1,2}・中谷行雄¹・稲山嘉明¹・渡部克也²
前原孝光²・林 康史²・高梨吉則²

要旨：原発性肺癌 140 例を対象とし，パラフィン切片を使用した免疫組織化学染色にて Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) の発現について検討した。肺腺癌に関しては，分化度・組織亜型との関連性についても検討した。また肺腺癌と他臓器の腺癌との発現を比較し，TTF-1 の肺腺癌組織診断マーカーとしての有用性を検討した。正常肺組織において TTF-1 は，II 型肺胞上皮細胞，Clara 細胞，一部の細気管支粘膜上皮基底細胞の核に陽性であった。原発性肺癌における TTF-1 の陽性率は，腺癌 83% (50/60)，小細胞癌 67% (20/30)，扁平上皮癌 8% (3/40)，大細胞癌 20% (2/10) であった。肺腺癌に関しては，分化度と TTF-1 発現に有意な相関がみられ，また組織亜型では papillary type が tubular type よりも有意に陽性率が高かった。他臓器の腺癌では，甲状腺癌が 93% で陽性になる以外では，90 例中大腸癌の 1 例に陽性例を認めたのみであり，TTF-1 は肺腺癌の組織診断マーカーとして極めて有用であると思われた。

〔肺癌 41 (1) : 45 ~ 49, 2001, JJLC 41 : 45 ~ 49, 2001〕

Key words : Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) Lung cancer, Extrapulmonary adenocarcinoma, Immunohistochemistry (IHC)

はじめに

Thyroid transcription factor-1 (以下 TTF-1) は，甲状腺・肺・脳で認められる遺伝子調節蛋白である¹⁾²⁾。正常肺組織においては，II 型肺胞上皮細胞や Clara 細胞に発現し，surfactant protein 遺伝子の転写を促進する役割を果たしていると考えられている³⁾。他方，肺は他臓器の癌の転移率が高く，近年では重複癌も増加し，転移性肺癌の切除術も積極的に行われるようになり，原発性肺癌が否か病理に求められる事も増えている。今回われわれは，TTF-1 の原発性肺癌における発現を検討し，組織診断マーカーとしての有用性を検討したので報告する。

対象と方法

対象は 1991 年 7 月から 2000 年 3 月までに横浜市立大学医学部附属病院にて手術または組織診が施行された原発性肺癌 140 例である。その内訳は，年齢 41 歳 ~ 87

歳 (中央値 66 歳) で，性別は男性 97 例，女性 43 例。検体は，経気管支肺生検による小細胞癌の組織標本が 24 例，手術標本が 116 例で，術式は肺全摘 5 例，肺葉切除 105 例，肺部分切除 4 例，切除術 2 例 (いずれも小細胞癌の転移がみられた皮膚・リンパ節) であった。組織型は腺癌 60 例，扁平上皮癌 40 例，小細胞癌 30 例，大細胞癌 10 例であった。

標本は，4 μ m で作製したホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。抗原賦活化のため，pH6.0 のクエン酸緩衝液中でオートクレーブにて 120 分で 10 分間処理を行い，Biotin Blocking System (DAKO) にて内因性ビオチンをブロックした。一次抗体は，抗ヒト TTF-1 マウスモノクローナル抗体 (NEO MARKERS, 8G7G3/1,500 倍希釈) を使用し，免疫組織化学染色は CSA system (Catalyzed Signal Amplification system, DAKO) を用いた。発色はジアミノベンチジン (DAB) で行い，核染はヘマトキシリンを使用した。陽性コントロールは正常肺組織を用いた。陰性コントロールは，一次抗体の代わりに正常マウス血清を使用した。

核が褐色に染色性を示す腫瘍細胞を陽性とし，腫瘍細胞中の陽性細胞の比率を算出した。判定は，0% : - (陰性)，0 ~ 10% : + (少数陽性)，11 ~ 79% : 2+ (中等陽性)，80% 以上 : 3+ (多数陽性) とした。

1. 横浜市立大学医学部附属病院病理部

2. 横浜市立大学第 1 外科

別刷請求先：石和直樹 神奈川県立循環器呼吸器病センター

〒236-0051 横浜市金沢区富岡東 6 丁目 16 番 1 号

TEL 045-701-9581

e-mail : ishiwa@mtg.biglobe.ne.jp

Fig. 1. Normal lung tissue, showing immunolabeling for TTF-1 of nuclei of Type II alveolar epithelial cells (immunoperoxidase and hematoxylin. $\times 200$)

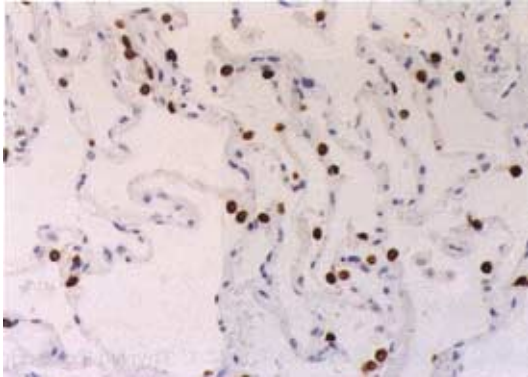


Fig. 2. Normal bronchiole, showing immunolabeling for TTF-1 of scattered nuclei of basal cells (immunoperoxidase and hematoxylin. $\times 200$)

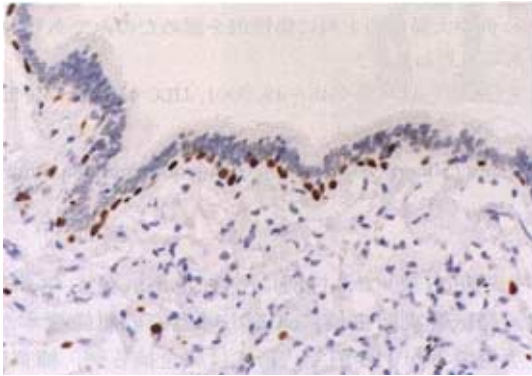


Fig. 3. Adenocarcinoma of the lung, showing immunolabeling for TTF-1 of nuclei of cancer cells (immunoperoxidase and hematoxylin. $\times 100$)

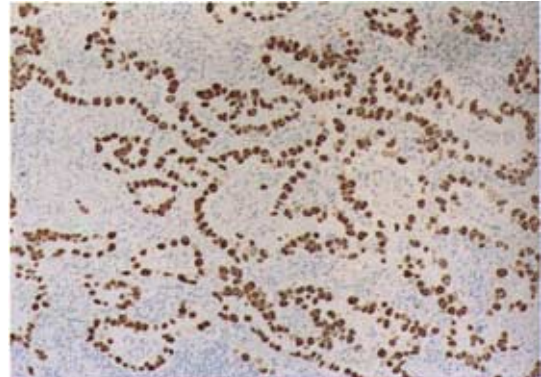
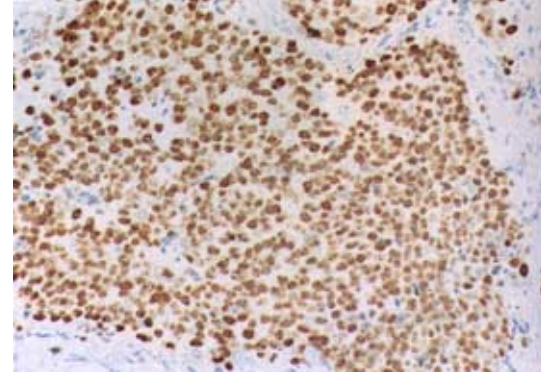


Fig. 4. Small cell carcinoma of the lung, showing immunolabeling for TTF-1 of nuclei of cancer cells (immunoperoxidase and hematoxylin. $\times 100$)



肺癌の各組織型における陽性率を比較し、肺腺癌においては分化度、組織亜型との関係も検討した。なお分化度、組織亜型の基準は、その組織中の優勢像とした。また、肺以外の腺癌 120 例（甲状腺癌 30 例、大腸癌 30 例、乳癌 30 例、卵巣癌 30 例）の陽性率を求め、後 3 者に対しては肺腺癌の陽性率との比較検討を行い、TTF-1 の肺癌組織診断マーカーとしての有用性を検討した。

肺腺癌における分化度および組織亜型と陽性率との相関関係の検定には、Mann-Whitney の検定または Spearman の順位相関係数検定を行い、 p 値は 0.05 以下をもって有意差ありとした。

結 果

1. 正常肺組織では、II 型肺胞上皮細胞、Clara 細胞および、一部の細気管支粘膜上皮基底細胞の核に陽性であった (Fig. 1 Fig. 2) .

2. 肺癌における陽性率は、腺癌で 50/60 (83%) , 小細胞癌で 20/30 (67%) , 大細胞癌で 2/10 (20%) , 扁平上

皮癌では 3/40 (8%) であった。小細胞癌では、生検標本と手術標本との間で陽性率に有意差はみられなかった ($p = 0.8$) (Table 1) (Fig. 3 Fig. 4) .

3. 肺腺癌における陽性率と分化度との関係は、高分化型から中分化型、低分化型と分化度が低くなるに従って陽性率は有意に低下した ($p = 0.01$) (Table 2) . また陽性率と組織亜型との関係では、papillary type の方が tubular type よりも有意に陽性率が高かった ($p < 0.01$) (Table 3) .

4. 他臓器の腺癌においては、甲状腺癌で 93% に発現が認められたが、その他の癌では 90 例のうち大腸癌で 1 例陽性例を認めたのみであった (Table 4) .

考 察

TTF-1 は、1989 年¹⁾にラットの甲状腺で発見された 371 のアミノ酸からなる蛋白質で、その後に肺や脳にも存在することが確認された²⁾。甲状腺では濾胞上皮細胞における thyroglobulin や thyroid peroxidase 遺伝子の転

Table 1. Results of immunostaining in lung cancer

Histology	Cases studied	TTF-1 expression				Positive cases
		-	+	2 +	3 +	
Adenoca.	60	10	5	4	41	5(83%)
Small cell ca.	30	10	3	6	11	2(67%)
{ biopsy specimen { surgical specimen	24	8	2	6	8	N.S.
	6	2	1	0	3	
Squamous cell ca.	40	37	1	1	1	3(8%)
Large cell ca.	10	8	0	1	1	2(20%)

ca. : carcinoma, N.S. : not significant

Table 2. Results of immunostaining in pulmonary adenocarcinomas according to differentiation

Differentiation	Cases studied	TTF-1 expression				Positive cases
		-	+	2 +	3 +	
Well	23	2	2	0	19	21(91%)
Moderate	27	4	2	3	18	23(85%)
Poor	10	4	1	1	4	6(60%)

ca. : carcinoma p = 0.01

Table 3. Results of immunostaining in pulmonary adenocarcinomas according to subtype

Subtype	Cases studied	TTF-1 expression				Positive cases
		-	+	2 +	3 +	
Papillary	42	2	3	1	36	4(95%)
Tubular	12	5	2	2	3	7(58%)
Undetermined	6	2	0	1	3	4(67%)

* p < 0.01

Table 4. Results of immunostaining in adenocarcinomas originating in other organs

Tumors	Cases studied	TTF-1 expression				Positive cases
		-	+	2 +	3 +	
Colon ca.	30	29	1	0	0	1(3%)
Breast ca.	30	30	0	0	0	0(0%)
Ovarian ca.	30	30	0	0	0	0(0%)
Thyroid ca.	30	2	2	4	22	28(93%)

ca. : carcinoma

写を¹⁾, 肺では II 型肺胞細胞や Clara 細胞における surfactant protein 遺伝子の転写を促進する³⁾と考えられているが, 脳における役割は未だ不明である. 最近では, 甲状腺や肺の形態発現にも深く関係していることが判明してきた^{4,5)}.

正常肺における免疫組織化学染色では, II 型肺胞上皮や終末細気管支より末梢の単層細気管支無線毛上皮細胞

の核に陽性と報告されている⁶⁾. 今回の我々の検討では, それに加えて偽重層の細気管支上皮内の一部の基底細胞の核に陽性であった.

肺腫瘍における発現に関しては, 腺癌で 63 ~ 76 %⁷⁾⁻⁹⁾, 扁平上皮癌では 0 ~ 11 %⁷⁾⁻⁹⁾, と報告されている. 神経内分泌腫瘍では, 小細胞癌に 80 ~ 97 %¹⁰⁾⁻¹²⁾と高頻度に発現がみられ, 定型的カルチノイドで 35 ~ 44 %^{11,12)}, 非定型的カルチノイドで 67 ~ 100 %^{11,12)}, 大細胞神経内分泌癌で 50 ~ 75 %^{11,12)}との報告がみられる. 本検討では, 高感度染色法である CSA system を使用して, 腺癌の陽性率は既報告よりもやや上昇したが, 小細胞癌の陽性率は低下し, その他の組織型では不変であった. 小細胞癌の検体は, 気管支鏡下に採取した生検標本が多かったが, 手術標本と比べて陽性率に有意な差はなく, 生検標本が多いことが陽性率低下の一因となっている可能性は考えにくい. 小細胞癌の陽性率低下の原因は不明である. 扁平上皮癌の陽性率は 8 % と既報告と同様であった. 末梢発生の扁平上皮癌には粘液細胞や基底細胞の性質を有するものがあることが報告されており^{13,14)}, 今回の陽性の 3 例が全て末梢発生の低分化扁平上皮癌であったことは, これらとの関連において興味深い.

肺腺癌における分化度と TTF-1 陽性率は関連なしとの報告¹⁵⁾があるが, 本検討では陽性率に有意な相関をみた. これは, TTF-1 を本来発現している II 型肺胞上皮細胞ないし Clara 細胞の性格を大多数が有する肺腺癌において, 分化度の高い腫瘍の方が発生母地本来の形質を良く発現していると考えれば充分理解できる. また, 肺腺癌の亜型と TTF-1 陽性率との関連をみると, papillary type の方が tubular type よりも有意に陽性率が高かった. これも papillary type の肺腺癌が tubular type の肺腺癌に比して高分化型で, 癌細胞の II 型肺胞上皮細胞や Clara 細胞への分化が示唆され, 形態的に類似していることと関連している可能性が考えられる.

TTF-1 は, 甲状腺, 肺以外の臓器の腺癌では陽性例がほとんどみられないとされており^{9,10)}, 既報告でも局所的に陽性細胞がみられた症例がわずかに報告されただけである(胃癌 66 例中 1 例で陽性率 2%, 子宮内膜癌 8 例中

1例で陽性率13%)⁵⁾。本検討でも90例中大腸癌の1例(1%)に局所的に陽性細胞がみられたのみであった。肺腺癌の組織診断マーカーとしては surfactant proteins A and B(以下SPA, SPBと略す)が知られているが, sensitivityはいずれも50~60%であり, 使用抗体によっては false positive の症例も少なからず認められる⁹⁾¹⁶⁾。本検討では TTF-1 の sensitivity は84%でSPA, SPBに優り, specificityも甲状腺以外の部位の腺癌との鑑別においては99%と同様に優れており, TTF-1は肺腺癌の組織診断マーカーとして極めて有用であると思われた。なお, 今回染色にはCSA systemを用いたが, 低分化の腫瘍でない限りLSAB法など通常感度の染色法でも充分有用であると思われる。

小細胞癌については, 当初は腺癌と同様に肺原発の

マーカーとして有用と考えられたが, 最近では他臓器の小細胞癌でも7~80%にTTF-1が陽性であるという報告¹²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾がみられ, 小細胞癌については肺原発か否かの鑑別診断には必ずしも有効でないと考えられる。特に前立腺由来の小細胞癌には高率に陽性のものである(12例中9例で陽性率75%)¹²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。また, 甲状腺の髄様癌にも高率に陽性である(31例中29例で陽性率94%)¹²⁾¹⁷⁾¹⁹⁾。一方, 皮膚原発の小細胞癌であるMerkel cell carcinomaでは陽性例の報告はなく, 鑑別に有効と思われる(43例中0例で陽性率0%)¹⁰⁾¹²⁾¹⁷⁾。

本論文の要旨は, 第89回日本病理学会総会(2000年4月, 大阪)において発表した。

文 献

- 1) Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, et al : A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* 8 : 2537-2542, 1989.
- 2) Lazzaro D, Price M, De Felice M, et al : The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the fetal brain. *Development* 113 : 1093-1104, 1991.
- 3) Bohinski RJ, Di Lauro R, Whitsett JA : The lung-specific protein B promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ specific gene expression along the foregut. *Mol Cell Biol* 14 : 5671-5681, 1994.
- 4) Acebron A, Aza-Blanc P, Rossi DL, et al : Congenital human thyroglobulin defect due to low expression of the thyroid-specific transcription factor, TTF-1. *J Clin Invest* 96 : 778-781, 1995.
- 5) Minoo P, Hamdan H, Bu D, et al : TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Dev Biol* 172 : 694-698, 1995.
- 6) Ikeda K, Clark JC, Shaw-White JR, et al : Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* 270 : 8108-8114, 1995.
- 7) Khor A, Whitsett JA, Stahlman MT, et al : Utility of surfactant protein B precursor and thyroid transcription factor 1 in differentiating adenocarcinoma of the lung from malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 30 : 695-700, 1999.
- 8) Di Loreto C, Di Lauro V, Puglisi F, et al : Immunocytochemical expression of tissue specific transcription factor-1 in lung carcinoma. *J Clin Pathol* 50 : 30-32, 1997.
- 9) Kaufmann O, Dietel M : Thyroid transcription factor-1 is the superior immuno-histochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology* 36 : 8-16, 2000.
- 10) Byrd-Gloster AL, Khor A, Glass LF, et al : Differential expression of thyroid transcription factor 1 in small cell lung carcinoma and Merkel cell tumor. *Hum Pathol* 31 : 58-62, 2000.
- 11) Folpe AL, Gown AM, Lamps LW, et al : Thyroid transcription factor-1 : immunohistochemical evaluation in pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 12 : 5-8, 1999.
- 12) Kaufmann O, Dietel M : Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology* 36 : 415-420, 2000.
- 13) McDowell ME, Barrett LA, Glavin F, et al : The respiratory epithelium. V. Histogenesis of lung carcinomas in the human. *J Natl Cancer Inst* 61 : 587-606, 1978.
- 14) 森 清志, 児玉哲郎, 下里幸雄 : 肺扁平上皮癌における細胞分化の方向性 発生部位, 性, 喫煙歴との関連 . *肺癌* 26 : 117-123, 1986.
- 15) Bejarano PA, Baughman RP, Biddinger PW, et al : Surfactant proteins and thyroid transcription factor-1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol* 9 : 445-452, 1996.
- 16) Shimosato Y : Pulmonary neoplasms. In : Sternberg SS ed. *Diagnostic surgical pathology*. Raven Press., New York, pp 1045-1093, 1994.
- 17) Agoff SN, Lamps LW, Philip AT, et al : Thyroid transcription factor-1 is expressed in extrapulmonary small cell carcinomas but not in other extrapulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 13 : 238-242, 2000.
- 18) Ordonez NG : Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in distinguishing small cell lung carcinomas from other small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 24 : 1217-1223, 2000.
- 19) Katoh R, Miyagi E, Nakamura N, et al : Expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in human C cells and medullary thyroid carcinomas. *Hum Pathol* 31 : 386-393, 2000.

Immunohistochemical Study of Thyroid Transcription Factor-1 Expression in Lung Cancers

*Naoki Ishiwa^{1,2}, Yukio Nakatani¹, Yoshiaki Inayama¹, Katsuya Watanabe²,
Takamitsu Maehara², Yasufumi Hayashi² and Yoshinori Takanashi²*

1) Division of Anatomic and Surgical Pathology, Yokohama City University Hospital

2) First Department of Surgery, Yokohama City University

Objective : Recent studies have indicated that the expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) may be a useful marker for lung cancer. In this study we investigated the expression of TTF-1 in lung cancers of various histological types, and also evaluated the utility of TTF-1 in discriminating between pulmonary and extrapulmonary adenocarcinomas.

Methods : We immunostained 140 carcinomas of pulmonary origin (60 adenocarcinomas (Ads), 30 small cell carcinomas (SCLCs), 40 squamous cell carcinomas (SCCs), 10 large cell carcinomas (LCs)) and 120 adenocarcinomas of extrapulmonary origin, using a monoclonal anti-TTF-1 antibody and Catalyzed Signal Amplification (CSA) system on paraffin sections.

Results : In the normal lung, TTF-1 expression was restricted to the nuclei of type II alveolar epithelial cells, Clara cells and some basal cells of the bronchioles. In lung cancers, TTF-1 expression was detected in 50 cases (83%) of 60 Ads, 20 cases (67%) of 30 SCLCs, 3 cases (8%) of 40 SCCs, and 2 cases (20%) of 10 LCs. The frequency of TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas showed a positive correlation with degrees of histological differentiation. TTF-1 expression was found in 28 cases of 30 thyroid cancers, but otherwise in only one case of 90 extrapulmonary adenocarcinomas.

Conclusion : The results suggest that TTF-1 can be a very useful marker discriminating adenocarcinomas of pulmonary origin from those of other sites, excluding the thyroid.

[JJLC 41 : 45 ~ 49, 2001]
