

小型肺腺癌における胃腸型ムチンの産生とリンパ節転移との関係

西海 昇¹・阿部良行²・中村雅登²・井上宏司¹

要旨 **目的**．小型肺腺癌に対し縮小手術の是非が論議されているが，未だ一定の見解が得られていない．正常の肺胞から胃腸型ムチンは分泌されないが，胃腸型ムチンを分泌した肺腺癌は予後不良と報告されている．そこでわれわれは小型肺腺癌手術例のリンパ節転移と胃腸型ムチン産生との関係について研究を行った．**対象と方法**．1989年から1999年の11年間に肺葉切除とND2a郭清を行った2.0 cm以下の肺腺癌79例を対象とした．79例を，N陰性群(pN0, 60例)とN陽性群(pN1, 8例とpN2, 11例)の2群にわけ，2群の胃腸型ムチン(HGM, MUC2, MUC5AC, MUC6)産生能について，免疫組織学的に比較検討した．**結果**．HGMは全例陰性であった．MUC2の発現はN陰性群1例(2%)，N陽性群5例(26%)で， $p < 0.001$ の有意差を認めた．MUC6の発現はN陰性群5例(8%)，N陽性群6例(32%)で， $p = 0.006$ の有意差を認めた．MUC5ACの発現はN陰性群3例(5%)，N陽性群3例(16%)で，有意差を認めなかった．**結論**．MUC2とMUC6陽性の小型肺腺癌は，リンパ節転移が高率であった．MUC2かMUC6が陽性の小型肺腺癌は縦隔郭清を伴う肺葉切除が必須である．(肺癌．2003;43:125-130)

索引用語 小型肺腺癌，胃腸型ムチン，MUC，リンパ節転移，予後

Relation Between Gastrointestinal Mucus Production and Lymph Node Metastasis in Cases of Small-sized Lung Adenocarcinoma

Noboru Nishiumi¹; Yoshiyuki Abe²; Masato Nakamura²; Hiroshi Inoue¹

ABSTRACT **Objective.** The evaluation of reduction surgery for small-sized lung adenocarcinoma is still being debated, and the indications for reduction surgery in these patients have not been adequately discussed. Gastrointestinal mucus is not secreted by normal alveolar cells, but some lung adenocarcinomas secrete gastrointestinal mucus, and it is reported that the prognosis of patients with lung adenocarcinomas secreting gastrointestinal mucus is poor. We therefore investigated the relation between lymph node metastasis and the secretion of gastrointestinal mucus in surgically treated cases of small-sized lung adenocarcinoma. **Methods.** We studied 79 lung adenocarcinoma lesions measuring 2.0 cm or less in patients treated by lobectomy and ND2a dissection between 1989 and 1999. We separated the lesions into two groups according to nodal metastasis: the node-negative group (pN0, 60 lesions) and the node-positive group (pN1, 8 lesions; pN2, 11 lesions). We investigated the incidence of lymph node metastasis in relation to gastrointestinal mucus production, which was determined immunohistologically by staining for HGM, MUC2, MUC5AC, and MUC6, in these two groups. **Results.** Staining for HGM was negative in all samples. MUC2 was detected in 1 lesion (2%) in the node-negative group and in 5 lesions (26%) in the node-positive group. MUC6 was detected in 5 lesions (8%) in the node-negative group and in 6 lesions (32%) in the node-positive group. The difference in the frequency of MUC2 and MUC6 production between lesions with and without lymph node metastasis was statistically significant ($p < 0.001$, $p = 0.006$, re-

東海大学医学部¹ 外科学系呼吸器外科学部部門，²病態診断系病理学部部門。

別刷請求先：西海 昇，東海大学医学部外科学系呼吸器外科学部部門，〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台 (e-mail: nishiumi@is.icc.u-tokai.ac.jp)。

¹Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery,
²Department of Pathology, Tokai University School of Medicine, Ja-

pan.

Reprints: Noboru Nishiumi, Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery, Tokai University, School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan (e-mail: nishiumi@is.icc.u-tokai.ac.jp)

Received September 4, 2002; accepted February 13, 2003.

© 2003 The Japan Lung Cancer Society

spectively) MUC5AC was detected in 3 lesions (5%) in the node-negative group and in 3 lesions (16%) in the node-positive group, a difference that was not statistically significant. **Conclusion.** The frequency of lymph node metastasis was high in patients with small-sized lung adenocarcinoma with lesions immuno-histochemically positive for MUC2 and MUC6. It is essential that MUC2- or MUC6-positive small-sized lung adenocarcinoma be treated by lobectomy combined with mediastinal dissection. (*JJLC*. 2003;43:125-130)

KEY WORDS Small-sized lung adenocarcinoma, Gastrointestinal mucus, MUC, Lymph node metastasis, Prognosis

はじめに

肺癌手術症例におけるリンパ節転移の有無は、予後因子として最も重要である。Asamura ら¹ は腫瘍径が 3 cm 以下の肺癌の予後を報告した。リンパ節転移のない IA 期の 5 年生存率は 92%、リンパ節転移のある IIA 期、IIIA 期の 5 年生存率は、各々 62%、45% であった。一方、腫瘍径が 2 cm 以下の小型の肺癌に対し、2a 群のリンパ節郭清（縦隔郭清）の省略、さらに肺部分切除や区域切除などの積極的縮小手術の是非が論議されているが、どのような症例に対し縮小手術が可能か一定した見解が得られていない²。われわれは、腫瘍径が 1.0 cm を超える肺腺癌においては、リンパ節転移のある症例が存在するため^{3,4} 標準術式は、肺葉切除と 2a 群までの系統的リンパ節郭清であると主張してきた。

癌の増殖・進展には癌細胞自身の増殖能や生物学的特性の変化が大きく関わっていることが示唆されている。われわれは、免疫組織学的手法を用い、肺癌におけるリンパ節転移の有無や予後を調査し、Lewis 関連抗原⁵、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)⁶、インターロイキン (interleukin) 10⁷ を産生する腫瘍は予後不良であることを報告している。

胃腸型ムチン (MUC) は、正常の肺胞で分泌されることはない。しかし、肺癌が発生する過程において、この胃腸型ムチンが産生されることが報告されている⁸。そこでわれわれは、小型肺腺癌の増殖・進展に関わる因子を明らかにする目的で、胃腸型ムチンの発現とリンパ節転移との関係について研究を行った。

対象

1989 年から 1999 年の 11 年間に、東海大学病院において肺葉切除と ND2a の縦隔郭清を行った CT 上と組織標本上の腫瘍径が共に 2.0 cm 以下であった肺腺癌 79 例に対し、胃腸型ムチンの中で human gastric mucin (HGM)、MUC2 glycoprotein、MUC5AC glycoprotein、MUC6 glycoprotein の免疫組織学的な発現頻度とリンパ節転移との関係を検討した。男性 33 例、女性 46 例、平均年齢は 60 ± 9 歳であった。1 葉切除が 76 例、2 葉切除が 3 例で

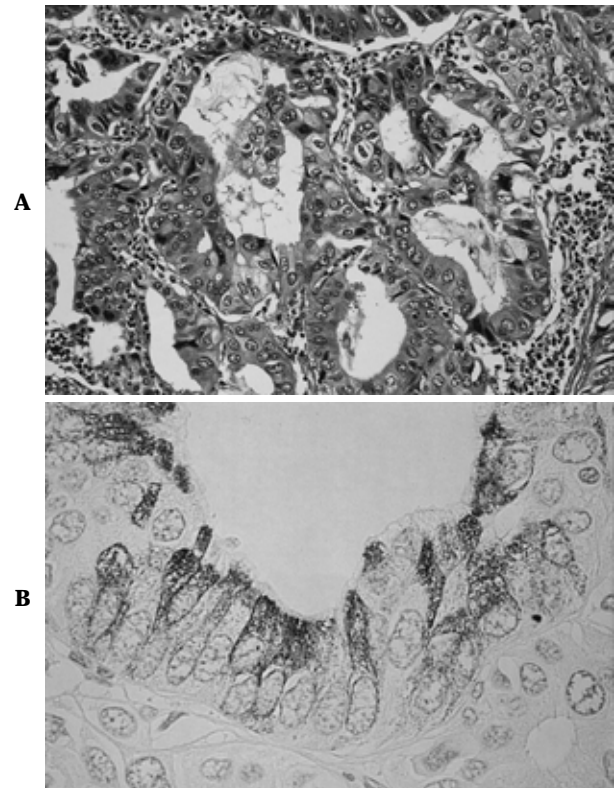


Figure 1. A. Photomicrograph showing microscopic findings of a lesion in a pN2 patient. Nest-like proliferation in a papillary pattern is seen (HE stain, ×50). B. Tumor cells are immunohistochemically positive for MUC2 antibody (×200).

あった。腫瘍径がいずれも 2.0 cm 以下の同側性同時性多発肺腺癌の 5 例（そのうちの 1 例は三重腺癌）は、画像上最も大きい腫瘍を第一癌とし、第一癌を対象として検討した。bronchioloalveolar carcinoma (BAC) は 18 例で、BAC 以外の腺癌が 61 例であった。リンパ節転移の有無により、N 陰性群 (pN0, 60 例) と N 陽性群 (pN1, 8 例と pN2, 11 例、計 19 例) の 2 群にわけ、2 群の胃腸型ムチン (HGM、MUC2、MUC5AC、MUC6) 産生能について、免疫組織学的に比較検討を行った。多発肺腺癌の 5 例 11 病巣は、BAC が 5 病巣で、BAC 以外の腺癌が 6 病巣

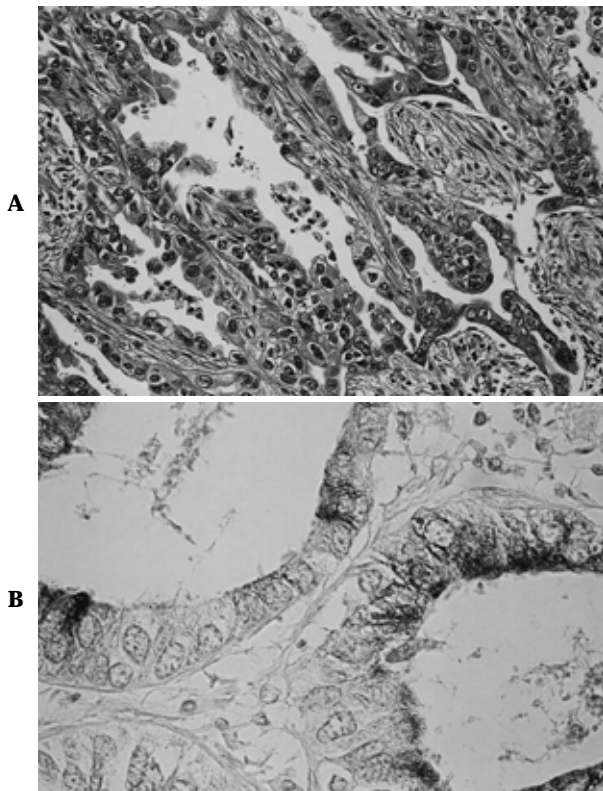


Figure 2. A. Photomicrograph showing microscopic findings of a lesion in a pN1 patient. Nest-like proliferation in a papillary pattern is seen (HE stain, $\times 50$) B. Tumor cell are immunohistochemically positive for MUC5AC antibody ($\times 200$)

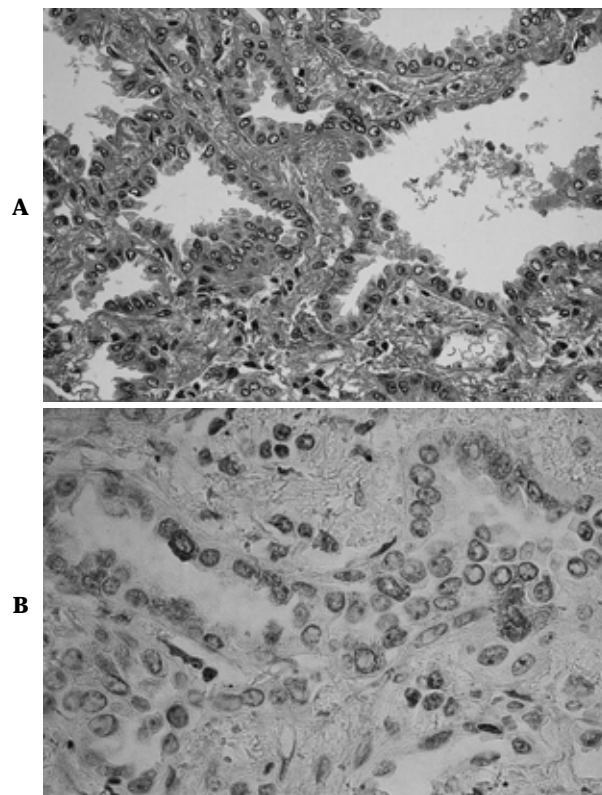


Figure 3. A. Photomicrograph showing microscopic findings of a lesion in a pN0 patient. Bronchioalveolar pattern is seen (HE stain, $\times 50$) B. Tumor cell are immunohistochemically positive for MUC6 antibody ($\times 200$)

で、5例とも pN0 であった。

方法

最初に原発腫瘍の最大断面のヘマトキシリン エオジン (hematoxylin-eosin: HE) 染色したスライド切片を病理組織学的に検討した。パラフィン包埋した原発腫瘍組織サンプルから、3マイクロメートルの厚さのシラン切片を作成した。内因性ペルオキシダーゼは、0.3% 過酸化水素でブロックし、標本は 0.1 モルリン酸緩衝生食液 (pH 7.2) で洗浄した。一抗は、human gastric mucin (HGM), MUC-2 glycoprotein/clone (Ccp58), MUC-5AC glycoprotein/clone (CLH2), MUC-6 glycoprotein/clone (CLH5) (Novocastera laboratories) のマウスモノクローナル抗体 (100倍希釈) を用い、4 で 10時間接触させた。ビオチン標識二次抗体は、ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体 (DAKO Envision) で 30分間化学反応させた。ビオチン標識ペルオキシダーゼとストレプトアビジンの複合体反応ののち、0.03% 過酸化水素に 3-3 ジアミノベンチジンを加え発色した。最後にヘマトキシリンにより核染色を

行った。

臨床上の結果をふせた標本番号を作成し、2人の独立した病理学者により評価した。標本上で 1% 以上の腫瘍細胞が染色された症例を陽性と判定した。2人が相違した場合の再評価は、他の病理学者を加え 3人の合議により決定した。

統計解析は χ^2 検定を用いた。予後は Kaplan-Meire 法を用い、予後の検定は、log-rank test を用いた。

Figure 1 に MUC2 が発現した pN2 の乳頭状腺癌の HE 染色と MUC2 の免疫染色を示した。Figure 2 に MUC5AC が発現した pN1 の乳頭状腺癌の HE 染色と MUC5AC の免疫染色を示した。Figure 3 に MUC6 が発現した pN0 の BAC の HE 染色と MUC6 の免疫染色を示した。

結果

Table 1 に、胃腸型ムチンの免疫学的発現頻度とリンパ節転移との関係を示した。

HGM は 79 病巣全例で染色陰性であった。MUC2 の発現は、N 陰性群 1 例 (2%), N 陽性群 5 例 (26%) で、MUC 2 発現とリンパ節転移との間に $p < 0.001$ の有意差を認

Table 1. Immunologically determined gastrointestinal mucus production in cases of node-negative and node-positive small-sized lung adenocarcinoma

		Node-negative group (n = 60)		Node-positive group (n = 19)		
HGM	positive	0	0%	0	0%	
	negative	60	100%	19	100%	
MUC2	positive	1	2%	5	26%	<i>p</i> < 0.001
	negative	59	98%	14	74%	
MUC5AC	positive	3	5%	3	16%	<i>p</i> = 0.094
	negative	57	95%	16	84%	
MUC6	positive	5	8%	6	32%	<i>p</i> = 0.006
	negative	55	92%	13	68%	

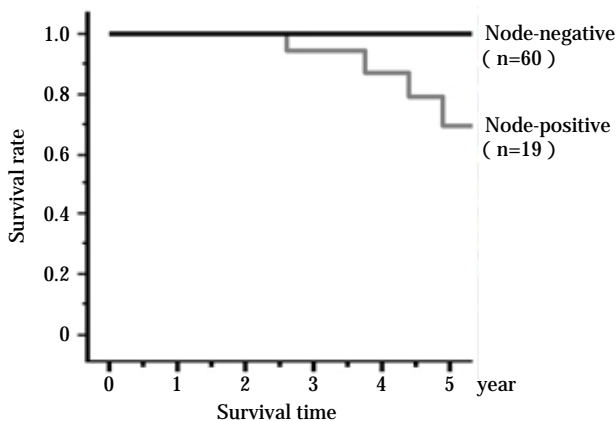


Figure 4. Survival curves obtained by the Kaplan-Meier method for node-negative and node-positive small-sized lung adenocarcinoma.

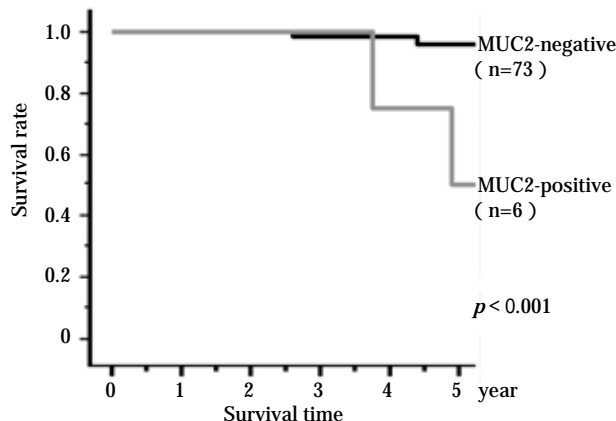


Figure 5. Survival curves obtained by the Kaplan-Meier method for MUC2-negative and MUC2-positive small-sized lung adenocarcinoma.

めた。MUC5ACの発現は、N陰性群3例(5%)、N陽性群3例(16%)で、両者間に有意差を認めなかった。MUC6の発現は、N陰性群5例(8%)、N陽性群6例(32%)で、MUC6の発現とリンパ節転移との間に $p = 0.006$ の有意差を認めた。pN1とpN2の間では、MUC2、MUC5AC、MUC6の発現頻度に差を認めなかった。18例のBACのうち、MUC6の発現を2例(Figure 3)に認めたが、BACとBAC以外の腺癌との間に有意差は認めなかった。BACにおいて、MUC2とMUC5ACの発現は認めなかった。多発肺腺癌の5例11病巣のうち、1例で第一癌と第二癌の染色性が異なった。第一癌はBAC以外の腺癌でMUC5ACとMUC6の発現を認めた。第二癌はBACでMUC2、MUC5AC、MUC6のいずれも発現を認めなかった。

他病死を打ち切りとしたKaplan-Meier法による79例の生存曲線をFigure 4に示した。観察期間は、 5.4 ± 3.1 年であった。N陰性群の5年生存率は100%、N陽性群の

5年生存率は69%であった。MUC2陰性群の5年生存率は96%、MUC2陽性群の5年生存率は50%で、両者間に $p < 0.001$ の有意差を認めた(Figure 5)。MUC5AC陰性群の5年生存率は94%、MUC5AC陽性群の5年生存率は67%、MUC6陰性群の5年生存率は94%、MUC6陽性群の5年生存率は80%で、MUC5ACとMUC6の発現と予後との間に有意差を認めなかった。

考 察

ムチンは、重糖鎖形成化した糖蛋白質で、上皮組織の表面をカバーする粘液の構成成分である。ムチンは、糖蛋白質質量の50~80%を占めるペプチド中核と炭水化物側鎖から成る。ペプチド中核の中心部は、セリンとトレオニンの残留物で、繰り返したアミノ酸配列から成る。現在まで、9つの人間のムチン遺伝子(MUC1, 2, 3, 4, 5AC, 5B, 6, 7, 8)が発見され、それらはペプチド中核

が異なっているためこのように命名された。⁹

これらのムチンは、サブタイプごとに存在部位が異なっている。MUC5ACは多くの正常の上皮に存在する。MUC6は主に胃粘膜に存在する。しかし、MUC2は正常の胃粘膜では存在せず、腸上皮に存在する。Copinら⁸は、MUC1, 2, 4, 5AC, 5B, 7, 8は、正常の細気管支において発現するが、正常の肺胞においては、胃腸型ムチンの発現はなかったと報告した。

癌の増殖・進展には癌細胞自身の増殖能や生物学的特性の変化が大きく関わっていることが示唆されている。Thomas¹⁰は、異常型糖鎖形成、正常の糖鎖形成低下、ムチン蛋白の過剰表現は、癌のムチン表現の調節異常と報告した。癌細胞におけるムチン発現は、腫瘍細胞の集合を減少させ、腫瘍細胞が毛細血管やリンパ管へ侵入し、転移を進めると考えられている。今日までムチン発現の異常はいくつかの疾患で報告された。Cornbergら⁹は、胃癌において、胃腸型ムチン産生の変化と、胃腸型ムチンを産生する遺伝子の変化が起こっていると報告した。腸上皮化生では、MUC6糖蛋白質の出現が示唆された。このように、異常型ムチンの発現とムチン関連抗原の出現は、胃癌⁹、結腸癌¹¹、乳癌¹²、胆嚢癌¹³において、予後不良因子の一つと考えられている。

しかし、肺癌において、ムチン及びムチン関連抗原と予後の関連についての報告は少ない。Ohgamiら¹⁴は、MUC1の発現したI期の肺腺癌は、早期に再発すると報告した。当教室では、Ogawaら⁵がシアロムチン表現陽性の肺癌は、生存が短いと報告した。Kernら¹⁵は、肺腺癌におけるerbB-2腫瘍蛋白の過剰表現は、シアロムチン表現と密接に関係し、予後の因子であると報告した。しかし、erbB-2腫瘍蛋白とシアロムチン表現との関係のメカニズムは、分かっていない。

Grazianoら¹⁶は、非小細胞肺癌において、予後不良となるムチンの存在を明らかにした。Copinら⁸は、次のように述べた。気道でのムチン分泌は、正常な上皮細胞の維持に貢献している。そのなかでムチン細胞の過形成は、気管気管支の上皮損傷の反応として、しばしば起こっている。胃腸型ムチンは正常の肺では分泌されないが、肺癌が発生する過程で、この胃腸型ムチンが産生されることが示唆される。Yuら¹⁷は、シアロムチン表現を持った非小細胞肺癌の患者は、治癒切除を受けたにもかかわらず術後再発し、生存期間が短い傾向にあったと述べた。そして、ムチン遺伝子物質(MUC1, 2, 3, 4, 5AC, 5B)をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を用いて調査した。その結果MUC5ACとMUC5B遺伝子の過剰表現をもった非小細胞肺癌は高い再発傾向を示した。

われわれは、2.0 cm以下の小型肺腺癌において、胃腸

型ムチンのうち、HMG, MUC2, MUC5AC, MUC6の腫瘍細胞における発現を免疫組織学的に検討した。MUC2とMUC6の発現とリンパ節転移との間に有意差を認められた。MUC5ACの発現とリンパ節転移との間に有意差を認めなかった。HMGの発現は全例で認められなかった。BAC 18例はすべてpN0であったが、2例にMUC6の発現を認めた。今後BACの症例を蓄積した上でMUCの染色性を検討する必要がある。

肺腺癌における胃腸型ムチンの産生とリンパ節転移との関係が明らかにされ、胃腸型ムチン産生の肺腺癌は、リンパ節転移率が高く、予後不良であると判明すれば、そのような症例では十分なリンパ節郭清が必要である。逆に、胃腸型ムチンを産生しない肺腺癌は、リンパ節転移率が低く、予後良好と判明すれば、そのような症例では縦隔リンパ節郭清の省略など手術侵襲を小さくすることが可能となる。今後、RT-PCRを用いたMUC遺伝子の解析が進めば、MUCの発現とリンパ節転移や予後との関係が明らかになると考える。

結 語

胃腸型ムチンの中でMUC2とMUC6陽性の小型肺腺癌は、リンパ節転移率が高かった。MUC2かMUC6が陽性の小型肺腺癌は縦隔郭清を伴う肺葉切除が必須である。

謝辞：本研究にあたり、御尽力戴きました東海大学医学部病態診断系病理学部門の畑中宏之先生、井上芳正先生、野村公達技師に感謝致します。

REFERENCES

1. Asamura H, Nakayama H, Kondo H, et al. Lymph node involvement, recurrence, and prognosis in resected small, peripheral, non-small-cell lung carcinomas: are these carcinomas candidates for video-assisted lobectomy? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;111:1125-1134.
2. Oda M, Watanabe Y, Shimizu J, et al. Extent of mediastinal node metastasis in clinical stage I non-small-cell lung cancer: the role of systematic nodal dissection. *Lung Cancer.* 1998;22:23-30.
3. Nishiumi N, Maitani F, Kaga K, et al. Is it permissible to omit mediastinal dissection for peripheral non-small-cell lung cancers with tumor diameters less than 1.5 cm? *Tohoku J Exp Clin Med.* 2000;25:33-37.
4. Takizawa T, Terashima M, Koike T, et al. Lymph node metastasis in small peripheral adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;116:276-280.
5. Ogawa J, Sano A, Inoue H, et al. Expression of Lewis-related antigen and prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1995;59:412-415.
6. Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, et al. Ribozyme ap-

- proach to downregulate vascular endothelial growth factor (VEGF)189 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) *Eur J Cancer*. 2000;36:2390-2396.
- 7 . Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, et al. Clinical implications of interleukin (IL)10 induced by non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2000;11:815-819.
 - 8 . Copin MC, Devisme L, Buisine MP, et al. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int J Cancer*. 2000;86:162-168.
 - 9 . Cornberg M, Enss ML, Makkink MK, et al. Variation of human mucin gene expression in gastric cancer cell lines and gastric mucous cell primary cultures. *Eur J Cell Biol*. 1999;78:832-841.
 - 10 . Thomas P. Cell surface sialic acid as a mediator of metastatic potential in colorectal cancer. *Cancer J*. 1996;9:32-36.
 - 11 . Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, et al. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 1994;106:353-361.
 - 12 . McGuckin MA, Walsh MD, Hohn BG, et al. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol*. 1995;26:432-439.
 - 13 . Kashiwagi H, Kijima H, Dowaki S, et al. MUC1 and MUC2 expression in human gallbladder carcinoma: a clinicopathological study and relationship with prognosis. *Oncol Rep*. 2001;8:485-489.
 - 14 . Ohgami A, Tsuda T, Osaki T, et al. MUC1 mucin mRNA expression in stage I lung adenocarcinoma and its association with early recurrence. *Ann Thorac Surg*. 1999;67:810-814.
 - 15 . Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, et al. pl85^{neu} Expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res*. 1990;50:5184-5187.
 - 16 . Graziano SL, Tatum AH, Newman NB, et al. The prognostic significance of neuroendocrine markers and carcinoembryonic antigen in patients with resected stage I and II non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1994;54:2908-2913.
 - 17 . Yu CJ, Shew JY, Shun CT, et al. Quantitative analysis of mRNA encoding MUC1, MUC2, and MUC5AC genes: a correlation between specific mucin gene expression and sialomucin expression in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18:643-652.