

非小細胞肺癌における XVIII 型コラーゲンの予後因子としての意義

飯笹俊彦¹・常 浩¹・鈴木 実¹・伊豫田明¹・
 渋谷 潔¹・廣島健三²・中谷行雄²・藤澤武彦¹

要旨 — **目的.** XVIII 型コラーゲンは、血管新生抑制因子の一つであるエンドスタチンの前駆物質であり、血管および上皮基底膜を構成する細胞外マトリックス蛋白の構成成分である。本研究は非小細胞肺癌における XVIII 型コラーゲン発現の予後因子としての重要性を明らかにすることを目的とした。**対象と方法.** 1994~2000 年に切除された非小細胞肺癌 306 例を対象とした。男女比は 215:91, 年齢は 31~85 歳(平均 64.8±9.8 歳)。扁平上皮癌 114 例, 腺癌 179 例, 大細胞癌 13 例。術後病期 I 期 130 例, II 期 47 例, III 期 113 例, IV 期 16 例であった。抗 XVIII 型コラーゲン抗体にて免疫染色を行い、臨床的因子(年齢, 性別, 組織型, T 因子, N 因子, 術後病期)との相関ならびに予後を統計学的に解析した。**結果.** 抗 XVIII 型コラーゲン抗体による切除標本の染色結果は、陰性 92 例, 陽性 119 例ならびに強陽性 95 例であった。全体の 5 年生存率は陰性例 70.4%, 陽性例 56.5% ならびに強陽性例 40.3% で、強陽性群, 陽性群ではいずれも陰性例に比べ有意に予後不良であった ($P < 0.0001$)。多変量解析でも、免疫染色による XVIII 型コラーゲン発現は独立した予後因子として選択された。**結論.** 非小細胞肺癌における XVIII 型コラーゲンの発現は 69.9% の症例に認められ、XVIII 型コラーゲンの発現は予後を強く決定づける因子と考えられた。(肺癌. 2005;45:221-227)

索引用語 — 非小細胞肺癌, 予後, XVIII 型コラーゲン, エンドスタチン

Significance of Expression of Collagen XVIII as an Important Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Carcinoma

Toshihiko Iizasa¹; Hao Chang¹; Makoto Suzuki¹; Akira Iyoda¹;
 Kiyoshi Shibuya¹; Kenzo Hiroshima²; Yukio Nakatani²; Takehiko Fujisawa¹

ABSTRACT — **Objective.** Collagen XVIII, a precursor of endostatin, is an extracellular matrix protein that is a component of vascular and epithelial basement membranes. The aim of this study was to determine whether collagen XVIII expression has any prognostic value in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Study design.** The authors investigated the expression of collagen XVIII in 306 patients who underwent surgery for NSCLC using immunohistochemical methods. The series of patients consisted of 215 men and 91 women ranging in age from 31 to 85, mean 64.8 ± 9.8 years; 114 squamous cell carcinomas, 179 adenocarcinomas, and 13 large cell carcinomas; 130 stage I cases, 47 stage II cases, 113 stage III cases, and 16 stage IV cases. **Results.** Collagen XVIII expression was detected in 214 of 306 patients with NSCLC (69.9%). Low collagen XVIII expression levels were found in 119 tumor specimens, while high collagen XVIII expression levels were noted in 95 tumor specimens. The overall 5-year survival rates were 40.3%, 56.5%, and 70.4% in the patients who were strongly collagen XVIII-positive, positive, and negative NSCLC, respectively. The prognosis for patients with strongly collagen XVIII-positive NSCLC or collagen XVIII-positive NSCLC was significantly worse than the prognosis for patients with collagen XVIII-negative NSCLC ($P < 0.0001$). Multivariate analysis indicated that age, postsurgical stage, T status, N status, and the overexpression of collagen XVIII were independent prognostic fac-

千葉大学大学院医学研究院 ¹胸部外科学, ²基礎病理学.

別刷請求先: 藤澤武彦, 千葉大学大学院医学研究院胸部外科学,
 〒260-8670 千葉市中央区亥鼻 1-8-1 (e-mail: fujisawat@faculty.chiba-u.jp).

Department of ¹Thoracic Surgery, ²Basic Pathology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Japan.

Reprints: Takehiko Fujisawa, Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan (e-mail: fujisawat@faculty.chiba-u.jp).

Received December 13, 2004; accepted March 22, 2005.

© 2005 The Japan Lung Cancer Society

tors. **Conclusion.** Our results indicate that expression of collagen XVIII in tumor tissue is a crucial prognostic factor in NSCLC. (*JJLC*. 2005;45:221-227)

KEY WORDS — Non-small cell lung carcinoma, Prognosis, Collagen XVIII, Endostatin

はじめに

原発性肺癌は、悪性腫瘍臓器別死亡率において第1位を占め、その診断ならびに治療のなご一層の向上が望まれる。TNM分類はもっとも重要な予後決定因子と考えられるが、¹ それぞれのサブグループにおける予後は異なっており、肺癌の生物学的特性を反映したマーカーの発見が期待される。これまでもさまざまな癌関連遺伝子や血清学的に証明される腫瘍マーカーなどにおいて肺非小細胞癌に特異性の高いものが報告され臨床応用されている。²

XVIII型コラーゲンは、血管新生抑制因子の一つであるエンドスタチンの前駆物質であり、血管および上皮基底膜を構成する細胞外マトリックス蛋白の構成成分である。これまで我々は、非小細胞肺癌におけるIV型コラーゲンの分解酵素であるmatrix metalloproteinases (MMP)-2ならびにMMP-9、またその阻害酵素であるtissue inhibitors metalloproteinases (TIMP)の発現の意義を報告してきた。³⁻⁵ また非小細胞肺癌におけるXVIII型コラーゲン高発現と血清エンドスタチン上昇との関連性、ならびに観察期間は短いもの予後との関連を明らかにしてきた。⁶⁻⁸

本研究は1994~1996年ならびに1997~2000年の非小細胞肺癌切除例に対しておこなった二つの研究^{7,8}をまとめ、長期の経過観察を行い、非小細胞肺癌切除例におけるXVIII型コラーゲン発現の予後因子としての重要性につき検討した。

対象と方法

検索対象

1994年から2000年に切除された非小細胞肺癌のうち稀な組織型を除き、今回の検討の主旨から試験開胸に終わった症例5例ならびに術死例4例は除外した。病理組織学的に診断が確定し、患者より同意の得られた306例を対象とした。男女比は215:91、年齢は31~85歳(平均64.8±9.8歳)であった。病理組織型ならびに病期は『肺癌取扱い規約改定第6版』⁹に従い、扁平上皮癌114例、腺癌179例、大細胞癌13例で、術後病期IA/B期130例、IIA/B期47例、IIIA/B期113例、IV期16例であった。術式は肺葉切除術278例、肺全剝術9例、および縮小手術19例であった。いずれの症例も術前ならびに術後補助

化学療法はおこなわず、再発時ないし局所遺残がみられた場合は可能な治療をおこなった。生存期間は、手術日より起算し、死亡日ないしは最終生存確認日までとした。予後は2004年10月30日現在の予後調査に従った。

免疫染色

染色法ならびに判定法はこれまでの報告に従い、^{7,8} XVIII型コラーゲンのペプチド(134-150, 503-518)を家兎に免疫して作成した2種類のポリクローナル抗体(免疫生物研究所にて作成)にて免疫染色(ABC法)をおこなった。染色結果は細胞質の染色性ならびに陽性細胞数より決定した。染色陽性細胞数を点数化し、陰性:0、陽性細胞数<25%:1、陽性細胞数25~50%:2、陽性細胞数>50%:3とした。同様に細胞質の染色性は陰性:0、弱陽性:1、中等度陽性:2、強陽性:3とし陽性細胞数ならびに染色性の点数を合計し、0点から2点を陰性、3点または4点を陽性、5点または6点を強陽性に分類した。

統計解析

統計解析は、Stat View 5.0ソフトウェア(SAS, Cary, NC, USA)を用いた。臨床的予後因子として年齢、性別、組織型、術後病期、T因子、N因子を挙げ、XVIII型コラーゲン発現との関連性はchi square testによりおこなった。生存率はKaplan-Meier法により算出し、検定には単変量解析にlog-rank testを用いた。

多変量解析にはCox比例ハザードモデルを用い、臨床的予後因子としては患者背景として年齢と性別、腫瘍側因子としての組織型、病期、T因子、N因子ならびにXVIII型コラーゲンの発現を用いた。単変量解析にてP<0.1となった変数をP値最小のものから変数増加法により投入した。各検定は危険率5%未満を有意差ありとした。

結果

各臨床因子分布の内訳ならびに全体の生存率では、年齢、術後病期、T因子、ならびにN因子において有意差を認めた(Table 1)。抗XVIII型コラーゲン抗体による非小細胞肺癌切除標本の染色では、ほとんどの症例において細胞質に一致したような染色がみられ、陰性92例、陽性119例ならびに強陽性95例(陽性率69.9%)であった。全体の5年生存率は陰性例70.4%、陽性例56.5%ならびに強陽性例40.3%で、陽性群は陰性群に比べ有意に予後

Table 1. Prognostic Variables, 5-year Survival and Univariate Survival Rates Analyses according to the Log-Rank Test

Variable	No. of patients (n = 306)	5-year survival	P value	
Sex				
male	215	53.9%	0.5175	
female	91	59.5%		
Age (yrs)				
65 <	144	64.4%	0.0038	
≤ 65	162	47.9%		
Histology				
squamous cell carcinoma	114	50.5%	0.0817*	
adenocarcinoma	179	57.9%		
large cell carcinoma	13	67.1%		
T status				
T1	112	76.1%	< 0.0001†	
T2	86	40.0%		
T3	38	43.5%		
T4	70	47.5%		
N status				
N0	187	70.1%	< 0.0001‡	
N1	38	53.0%		
N2	65	24.4%		
N3	16	7.1%		
Postsurgical stage				
I A	89	79.6%	< 0.0001§	
I B	41	57.1%		
II A	8	100.0%		
II B	39	47.7%		
III A	41	29.2%		
III B	72	41.9%		
IV	16	32.8%		
Immunohistochemistry for collagen XVIII				
negative	92	70.4%		< 0.0001
positive	119	56.5%		
strongly positive	95	40.3%		

*squamous cell carcinoma vs non-squamous cell carcinoma

† T1 vs T2 or more

‡ N (-) vs N (+)

§ stage I vs II, III, IV

不良であった ($P < 0.0001$)。また強陽性群も陰性群に比べ有意に予後不良であった ($P < 0.0001$) (Table 1, Figure 1)。

さらに XVIII 型コラーゲンの発現と各臨床因子との関連性では T 因子が悪化するほど、XVIII 型コラーゲン発現が強く有意差を認めた ($P = 0.0376$) が、他の因子にはまったく相関がみられなかった (Table 2)。

Cox 比例ハザードモデルを用いた全体の生存率に対する解析では、術後病期を決定している T 因子ならびに N 因子は、強い相関があり交絡が生じるため、これらを独立させ検討した。まず単変量解析にて各因子の相対危険度 (hazard ratio)、95% 信頼区間、P 値を求めたとこ

ろ、年齢 ($P = 0.0221$)、T 因子 (T2 vs T1, T4 vs T1: $P < 0.0001$, T3 vs T1: $P = 0.0002$)、N 因子 (N1 vs N0: $P = 0.0095$, N2 vs N0 および N3 vs N0: $P < 0.0001$)、術後病期 (II vs I: $P = 0.0134$, III vs I, IV vs I: いずれも $P < 0.0001$) ならびに XVIII 型コラーゲン発現の多寡 (強陽性 vs 陰性: $P < 0.0001$, 陽性 vs 陰性: $P = 0.0062$) が有意な因子として選択された (Table 3)。これらを用い術後病期を含むものを多変量解析 I とし、T 因子ならびに N 因子を含むものを多変量解析 II とした。多変量解析 I では、年齢、術後病期および XVIII 型コラーゲン発現の多寡が選択され、多変量解析 II では、年齢、T 因子、N 因子ならびに XVIII 型コラーゲン発現の多寡が選択された (Table

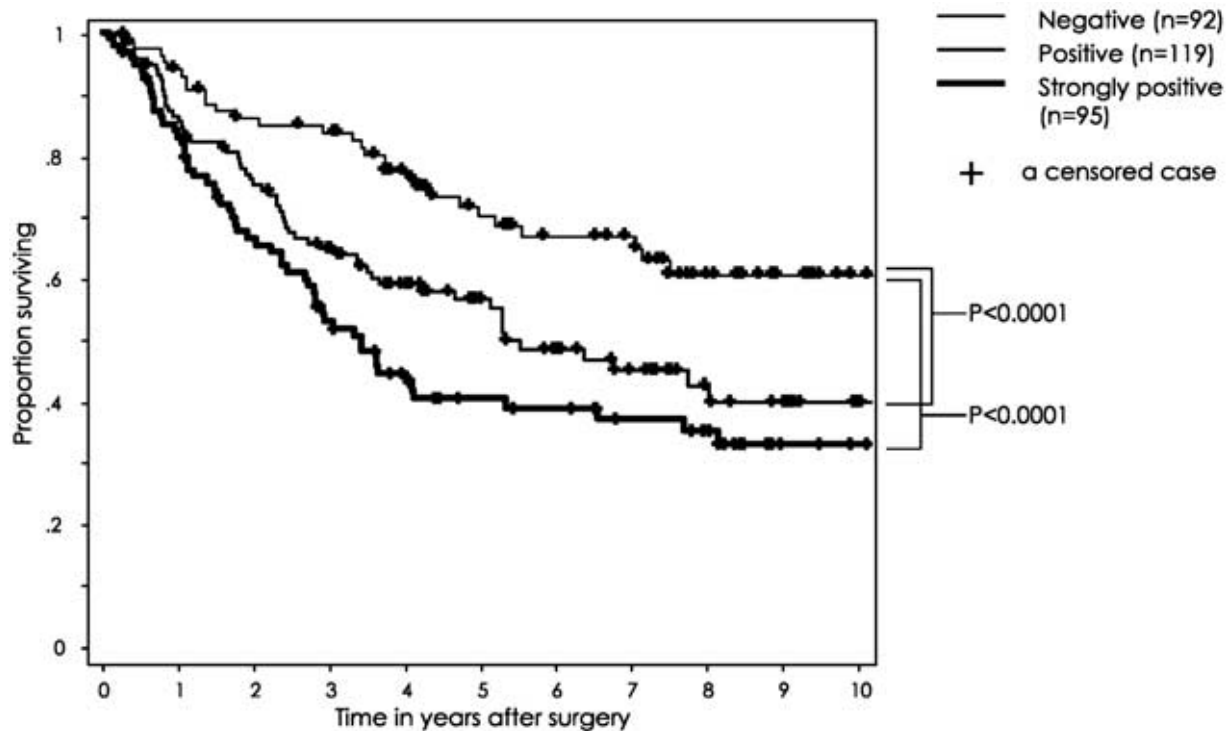


Figure 1. Overall survival curves for patients with non-small cell lung carcinoma according to expression of collagen XVIII.

4). 以上の結果より年齢, 術後病期, T 因子, N 因子ならびに XVIII 型コラーゲン発現の多寡はそれぞれ独立した予後因子と考えられた。

考 察

XVIII 型コラーゲンは, 血管新生抑制因子の一つであるエンドスタチンの前駆物質であり, 血管および上皮基底膜を構成する細胞外マトリックス蛋白の構成成分である。XVIII 型コラーゲンは, Muragaki や Kivirikko らによって発見され, 特異なドメイン構造を有することからコラーゲンファミリーのマルチプレキシンサブグループに分類される。¹⁰⁻¹² このサブグループは C 末端と N 末端に非コラーゲン領域を持つことが特徴とされ, XVIII 型コラーゲンの C 末端の非コラーゲン領域の一部は, エンドスタチンと呼ばれ血管新生抑制因子として注目され, 悪性腫瘍が転移を起こす際, 血管内皮細胞の増殖を抑制するといわれている。¹³⁻¹⁷

これまで我々は, 血清エンドスタチン値と非小細胞肺癌組織における XVIII 型コラーゲン産生との関連性を明らかにし, 非小細胞肺癌における血清エンドスタチンの産生部位が腫瘍組織に由来するものであることを明らかにした。⁸ そして経過観察期間は短いものの, 血清エンドスタチン高値群ならびに腫瘍組織における XVIII 型コ

ラーゲン高発現群において予後不良であることを明らかにした。⁶⁻⁸ 同様に Hata らも卵巣腫瘍において血清エンドスタチン高値群が予後不良であることを報告している。¹⁸ 今回の研究では対象をあわせ, 4~10 年に亘り長期間観察した結果, XVIII 型コラーゲン発現は主要な臨床的予後因子とは独立した新たな予後因子としての重要性が明らかになった。これらの結果は, 血管新生抑制に作用するエンドスタチンの作用と矛盾する結果とも思えるが, 腫瘍摘出により血清エンドスタチンは低下することから, 逆に微小転移巣においてはこれまで抑制されていた血管新生が亢進する可能性も考えられる。さらにまだ明らかにされていない XVIII 型コラーゲンの腫瘍増殖を促進するような未知的作用があることも想定される。現在この点につき, XVIII 型コラーゲンがさまざまな癌関連遺伝子の発現に及ぼす影響について関連性を検索している。

一般に非小細胞肺癌の予後因子として検討されるものは, 年齢, 性別, 病期, 腫瘍径, 転移の有無, 組織型などが挙げられる。これまでの多くの報告によれば, 非小細胞肺癌を全体の生存率でみた場合, 年齢, 病期, 腫瘍径, リンパ節ならびに遠隔転移の有無は最も重要でかつ基本的な予後因子として挙げられる。^{1,19-21} 今回の我々の検討では, 非小細胞肺癌切除例の約 70% に XVIII 型コ

Table 2. Correlation Between Expression of Collagen XVIII and Clinicopathologic Factors in 306 Patients With Non-Small Cell Lung Carcinoma

Variable	Expression of collagen XVIII			P value*
	Negative (n = 92)	Positive (n = 119)	Strongly positive (n = 95)	
Age (yrs)				
65 <	36	60	48	0.1902
≤ 65	56	59	47	
Sex				
male	66	81	68	0.7988
female	26	38	27	
Histology				
squamous cell carcinoma	34	43	37	0.1552
adenocarcinoma	53	75	51	
large cell carcinoma	5	1	7	
T status				
T1	39	50	23	0.0376
T2	21	29	36	
T3	13	16	9	
T4	19	24	27	
N status				
N0	60	74	53	0.3838
N1	14	14	10	
N2	13	26	26	
N3	5	5	6	
Postsurgical stage				
I A	33	39	17	0.2189
I B	9	16	16	
II A	3	4	1	
II B	14	13	12	
III A	10	17	14	
III B	21	23	28	
IV	2	7	7	

*chi square test

ラーゲンの異常発現を認めた。また XVIII 型コラーゲン発現は年齢、病期、転移の有無などの重要な予後因子との相関は示さず、腫瘍径とは相関を認めたものの、単変量解析ならびに多変量解析いずれにおいても予後との強い相関を示した。また XVIII 型コラーゲン発現の多寡により予後に相違があることも明らかになった。これは XVIII 型コラーゲンが多彩な生物学的特徴を有する集団である非小細胞肺癌において、予後を決定するような重要な生物学的特性を有する蛋白質であることを意味する。この点に関し Olsen は XVIII 型コラーゲンが血管新生を補助する因子である可能性を指摘しているが今後の研究の待たれるところである。²²

以上より、XVIII 型コラーゲンは非小細胞肺癌における強く予後を決定づける独立した因子であることが確認された。また抗 XVIII 型コラーゲン抗体による免疫染色は、肺非小細胞癌の予後判定に有用な手段となりうる。今後

XVIII 型コラーゲンの発現機構ならびに作用の解明が必要であるが、本研究の結果から、XVIII 型コラーゲンの発現する非小細胞肺癌は、再発や転移の出現する可能性が高く、術後補助療法の追加を考慮する必要性が示唆された。

結 語

1. 非小細胞肺癌における XVIII 型コラーゲン発現は 69.9% の症例でみられ、全体の 5 年生存率は陰性例 70.4%、陽性例 56.5% ならびに強陽性例 40.3% で、陽性群、強陽性群は陰性群に比べ有意に予後不良であった。

2. 非小細胞肺癌における XVIII 型コラーゲン発現は他の重要な臨床的予後因子とは相関せず、予後を強く決定づける独立した因子であった。

Table 3. A Univariate Analysis of Clinicopathologic Factors and Expression of Collagen XVIII Using the Cox Proportional Hazards Model

Variable	Hazard ratio	95% confidence interval	P value
Age (continuous)			
elder vs younger	1.021	1.003- 1.039	0.0221
Sex			
male vs female	1.126	0.786- 1.613	0.5179
Histology			
squamous cell carcinoma vs non-squamous cell carcinoma	1.340	0.962- 1.866	0.0829
T status			
T2 vs T1	2.722	1.748- 4.240	< 0.0001
T3 vs T1	2.885	1.667- 4.993	0.0002
T4 vs T1	3.264	2.062- 5.166	< 0.0001
N status			
N1 vs N0	1.915	1.172- 3.128	0.0095
N2 vs N0	3.290	2.224- 4.866	< 0.0001
N3 vs N0	5.788	3.283-10.204	< 0.0001
Postsurgical stage			
II vs I	1.911	1.144- 3.194	0.0134
III vs I	3.261	2.203- 4.827	< 0.0001
IV vs I	5.364	2.805-10.259	< 0.0001
Immunohistochemistry for collagen XVIII			
strongly positive vs negative	2.525	1.613- 3.952	< 0.0001
positive vs negative	1.862	1.193- 2.906	0.0062

Table 4. Multivariate Analyses of Clinicopathologic Factors and Expression of Collagen XVIII Using the Cox Proportional Hazards Model

Multivariate analysis I			
Variable	Hazard ratio	95% confidence interval	P value
Age (continuous)			
elder vs younger	1.033	1.013- 1.053	0.0008
Postsurgical stage			
II vs I	1.948	1.165- 3.257	0.0110
III vs I	3.571	2.400- 5.313	< 0.0001
IV vs I	4.990	2.593- 9.601	< 0.0001
Immunohistochemistry for collagen XVIII			
strongly positive vs negative	2.518	1.601- 3.958	< 0.0001
positive vs negative	1.911	1.219- 2.996	0.0048
Multivariate analysis II			
Variable	Hazard ratio	95% confidence interval	P value
Age (continuous)			
elder vs younger	1.039	1.018- 1.059	0.0002
T status			
T2 vs T1	2.105	1.319- 3.360	0.0018
T3 vs T1	2.630	1.503- 4.603	0.0007
T4 vs T1	2.544	1.586- 4.079	0.0001
N status			
N1 vs N0	1.608	0.972- 2.660	0.0642
N2 vs N0	3.150	2.098- 4.730	< 0.0001
N3 vs N0	6.418	3.516-11.714	< 0.0001
Immunohistochemistry for collagen XVIII			
strongly positive vs negative	2.437	1.531- 3.879	0.0002
positive vs negative	2.250	1.420- 3.565	0.0006

REFERENCES

1. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997;111:1710-1717.
2. Niklinski J, Furman M. Clinical tumor markers in lung cancer. *Eur J Cancer Prev*. 1995;4:129-138.
3. Iizasa T, Fujisawa T, Suzuki M, et al. Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1999;5:149-153.
4. 鈴木 実, 飯笹俊彦, 山口 豊, 他. 肺癌切除例における Matrix metalloproteinases (MMPs) 及び Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) の免疫組織学的検討. 肺癌. 1996;36:937-943.
5. Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small-cell lung cancer. *Invasion Metastasis*. 1998;18:134-141.
6. Suzuki M, Iizasa T, Ko E, et al. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;35:29-34.
7. Chang H, Iizasa T, Shibuya K, et al. Increased expression of collagen XVIII and its prognostic value in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004;100:1665-1672.
8. Iizasa T, Chang H, Suzuki M, et al. Overexpression of collagen XVIII is associated with poor outcome and elevated levels of circulating serum endostatin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5361-5366.
9. 日本肺癌学会編. 肺癌取扱い規約. 改定第6版. 東京: 金原出版; 2003.
10. Muragaki Y, Abe N, Ninomiya Y, et al. The human alpha 1 (XV) collagen chain contains a large amino-terminal non-triple helical domain with a tandem repeat structure and homology to alpha 1 (XVIII) collagen. *J Biol Chem*. 1994;269:4042-4046.
11. Kivirikko S, Heinamaki P, Rehn M, et al. Primary structure of the alpha 1 chain of human type XV collagen and exon-intron organization in the 3' region of the corresponding gene. *J Biol Chem*. 1994;269:4773-4779.
12. Elamaa H, Snellman A, Rehn M, et al. Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif. *Matrix Biol*. 2003;22:427-442.
13. Sasaki T, Fukai N, Mann K, et al. Structure, function and tissue forms of C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*. 1998;17:4249-4256.
14. Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. 1997;390:404-407.
15. Standker L, Schrader M, Kanse SM, et al. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. *FEBS Lett*. 1997;420:129-133.
16. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88:277-285.
17. Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J*. 1999;18:4414-4423.
18. Hata K, Fujiwaki R, Nakayama K, et al. Expression of the Endostatin gene in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2405-2409.
19. Myrdal G, Lambe M, Gustafsson G, et al. Survival in primary lung cancer potentially cured by operation: influence of tumor stage and clinical characteristics. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:356-363.
20. 飯笹俊彦, 藤澤武彦, 馬場雅行, 他. 肺癌の診断と治療—最新の研究動向—切除例からみた TNM 分類の妥当性と問題点. 日本臨牀. 2002;60:250-254.
21. 飯笹俊彦, 藤澤武彦. T 因子から見た肺癌手術適応の再検討. 日外会誌. 2001;102:507-510.
22. Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol*. 1999;147:909-912.