

2次元電気泳動法により検出された非小細胞肺癌関連蛋白質の 免疫組織化学染色による検証

小鹿雅和^{1,2}・平野 隆¹・松林 純²・果 然¹・龔 雲波¹・
川村 猛³・片場寛明¹・大平達夫¹・向井 清²・加藤治文¹

要旨—— **目的.** 原発性肺癌の生物学的性格を反映するバイオマーカーの探索を目的に Ettan-DIGE 法による肺癌組織型関連蛋白質の検出・同定を試みた. **方法.** 組織型ごとに4~8症例の組織分化が中等度~高分化症例の2次元電気泳動(2-DE)用サンプルを混合し, 組織型標準サンプルとして蛍光標識後に2-DEを施行, 各組織型で高発現するスポットを検出した. 各スポットは質量分析法で蛋白質分子を同定, 検証は肺癌腫瘍組織の免疫組織化学染色によって行った. **結果.** 19種類の扁平上皮癌関連蛋白質(eSq), 16種類の腺癌関連蛋白質(eAd), 17種類の神経内分泌癌関連蛋白質(eNE)を検出, このうち6種類のeSq, 8種類のeAdを同定した. 同定蛋白質の14種類のうち8種類がサイトケラチン(CK)(eSq: CK5, CK6A, CK6C, CK6D, CK17, eAd: CK8, CK18, CK19)であった. その後の免疫組織染色による検証で各組織型間でのCKの発現に特徴があることを示すことができた. **考察.** 腫瘍関連蛋白質の発現量に基づいて肺癌を評価することで, 腫瘍の生物学的性格を反映させることが可能となり, 治療法選択に応用できると考える. (肺癌. 2007;47:861-869)

索引用語—— プロテオミクス, サイトケラチン, 2次元電気泳動法, 扁平上皮癌関連蛋白質, 腺癌関連蛋白質

Validation Analysis Using Immunohistochemistry of Non-small Cell Lung Cancer-associated Proteins Detected by Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Masakazu Kojika^{1,2}; Takashi Hirano¹; Jun Matsubayashi²; Ran Guo¹; Yunbo Gong¹;
Takeshi Kawamura³; Hiroaki Kataba¹; Tatsuo Ohira¹; Kiyoshi Mukai²; Harubumi Kato¹

ABSTRACT—— **Objective.** We set out to detect primary lung cancer (PLC)-associated proteins using 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) analysis and to identify the protein molecules for the exploration of biomarkers reflecting the biological characteristics of lung cancer. **Study Design.** We prepared samples for 2-DE from representative histological types of primary lung cancer; squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell carcinoma. We selected 8 cases of well or moderately differentiated squamous cell carcinoma confirmed postoperatively to possess typical histological features of primary lung squamous cell carcinoma. The mixture that contained equal amounts of these 8 samples was taken to be a standard sample of lung squamous cell carcinoma. Similarly, we selected 8 cases of well or moderately differentiated adenocarcinoma to prepare a standard sample of primary lung adenocarcinoma. We also mixed specimens of 4 cases of small cell carcinoma, and prepared a standard sample of small cell carcinoma.

東京医科大学 ¹外科学第一講座, ²病理診断学講座, ³臨床プロテオームセンター.

別刷請求先: 平野 隆, 東京医科大学外科学第一講座, 〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 (e-mail: thirano@tokyo-med.ac.jp).

¹First Department of Surgery, ²Department of Diagnostic Pathology, ³Clinical Proteome Center, Tokyo Medical University, Ja-

pan.

Reprints: Takashi Hirano, First Department of Surgery, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan (e-mail: thirano@tokyo-med.ac.jp).

Received August 27, 2007; accepted October 16, 2007.

© 2007 The Japan Lung Cancer Society

noma. We then labeled each standard sample with a fluorescent dye (either Cy2, Cy3 or Cy5) according to the manufacturer's protocol. Furthermore, using mass spectrometry we identified protein molecules that were detected in 2-DE analysis, followed by validation analysis by immunohistochemistry. **Results.** We detected 19 kinds of squamous cell carcinoma-associated spots (eSq), 16 kinds of adenocarcinoma-associated spots (eAd) and 17 kinds of neuroendocrine carcinoma-associated spots (eNE). From these spots, 6 kinds of eSq-protein molecules and 8 kinds of eAd-protein molecules were identified. Eight protein molecules out of these 14 identified molecules were cytokeratin (CK) molecules. CK5, CK6A, CK6C, CK6D and CK17 were identified as eSq-protein molecules, and furthermore CK8, CK18 and CK19 were identified as eAd-protein molecules. The results of a validation analysis using immunohistochemistry indicated a high possibility that CK5, CK5/6 and CK17 are biomarkers for squamous cell carcinoma, and that CK18 is a biomarker for adenocarcinoma. We succeeded in showing a significant relationship between the histopathological differentiation of PLC and the expression of CKs. **Conclusion.** There is a strong possibility that the biological characteristics of lung carcinoma may be clarified by classification based upon proteomic analysis, and the results of proteomic analysis may be applied to the selection of therapeutic strategies of PLC. (*JJLC*. 2007;47:861-869)

KEY WORDS—Proteomics, Cytokeratin, 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Squamous cell carcinoma-associated protein, Adenocarcinoma-associated protein

緒言

原発性肺癌の生物学的特性を明確にしようとする時に HE 染色像のみによる形態学的評価だけでは不十分と考えられるようになってきた。そのよい例を WHO 分類にみることができる。WHO 分類では形態学的に神経内分泌癌とみなされても生化学的・電顕的に証明できない腫瘍は non small cell lung cancer with neuroendocrine differentiation とされ、大細胞性神経内分泌癌 (LCNEC ; large cell neuroendocrine carcinoma) と別に規定している。¹

私たちは 1989 年以降 2 次元電気泳動法 (2-DE ; 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis) による肺癌関連蛋白質の解析を行い、肺癌組織型関連蛋白質の解析により、組織型に特徴的な蛋白質発現パターンがあること、2-DE ゲル上で典型的な原発性腺癌パターンを示す症例の方が非典型例よりも予後良好なことなどを示してきた。^{2,4} 従来法による 2-DE は再現性に問題があるといわれていたが、波長の異なる蛍光色素で標識されたサンプルを等量混和し、同一ゲル上で泳動する新しいシステムを用いることでこの問題を解決するとともに検体間の発現蛋白質の量的比較が容易になった。このシステムを用いて原発性肺癌の各組織型に特徴的な発現蛋白質の解析を行い、さらに質量分析によって蛋白質分子の同定を試みた。この解析でいくつかのサイトケラチン (CK ; cytokeratin) の発現が肺癌の組織型間で特徴的であることが示されたことから、検証実験として CK の発現様式と肺癌組織型の関連性を免疫組織化学染色にて評価した。

材料と方法

2 次元電気泳動法肺癌解析用外科切除サンプル

2003 年 1 月～2005 年 12 月に外科的に切除され、2 次元電気泳動用サンプルとして以前報告した方法によって調整されていたサンプルを再検討し、適切な解析結果の得られることが確認され、解析に十分な検体量 (蛋白量) が確保しうる検体を用いた。⁵ 今回の解析は各組織型の典型的 2 次元電気泳動像を比較解析するのが目的であり、術後の病理組織検査で中～高分化扁平上皮癌、中～高分化腺癌 (杯細胞型腺癌を除く) および小細胞癌と診断されたサンプルのみを用いた。その結果扁平上皮癌 8 例、腺癌 8 例、小細胞癌 4 例が残り、このサンプルを用いて解析を行った。

各組織型のサンプルは各症例ごとに蛋白量を調整し等量ずつ混和され、それぞれ扁平上皮肺癌標準サンプル・肺腺癌標準サンプル・小細胞肺癌標準サンプルとした。脱塩処理後 3 種類の蛍光色素 (Cy2, Cy3, Cy5 ; GE Healthcare UK Ltd, England) によりサンプルを蛍光標識し、2-DE 用サンプルとした。3 種類の蛍光色素による標識は蛍光色素の標識率や標識による移動度の微妙な差を考慮し、3 通りの組み合わせを行い、泳動・解析ともそれぞれ 3 通り施行した。

Ettan-DIGE 法による 2 次元電気泳動

1 次元目の等電点電気泳動は Immobiline DryStrip gel (pH3-10) (GE Healthcare UK Ltd) を用い、Multiphor II (GE Healthcare UK Ltd) により 1 ゲルあたり 50 μ A で泳動、その後 10% polyacrylamide gel 上に 1 次元ゲルをのせ、EttanDalt II (GE Healthcare UK Ltd) によって 1

ゲルあたり 1 W で泳動, Bromophenol blue で示される泳動先端がゲルの最下端に達するまで約 15 時間泳動を行った。泳動法の詳細は GE Healthcare Bioscience 社の操作マニュアルに従った。

2次元電気泳動ゲルの解析

2次元電気泳動ゲルは Typhoon 9400 fluorescence gel scanner (GE Healthcare UK Ltd) により画像を取り込み, DeCyder software v. 5.0 (GE Healthcare UK Ltd) によって解析した。3通りの組み合わせの蛍光標識で得られた結果を Cy2 で標識された組織型を基準にし, 3倍以上の発現を認めたスポットを拾い出し, 他の2種類の組織型と比較して3倍以上の発現量と判断されたスポットをその組織型に関連した蛋白質由来のスポットとした。

ゲルの切り出しとゲル内消化

目的のスポットは切り出され, 洗浄・脱水・cysteine 残基の除去処理後, trypsin により消化, 消化されたペプチドはゲルから抽出・濃縮された後, 質量分析による蛋白質解析に供された。

質量分析法

Peptide Mass Finger Print 法により蛋白質分子の同定が試みられた。測定には MALDI-TOF MS (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems, Foster City, CA) が用いられ, 質量分析により得られた結果は Mascot (Matrix Science, Boston, MA) データと照合し, 蛋白質分子の同定を行った。

プロテオーム解析による結果の検証

プロテオーム解析によって検出, 同定された蛋白質が実際に肺癌細胞で発現していることの検証は免疫組織化学染色によった。1997年1月～2000年12月の間に WHO 分類に基づいて病理組織学的に診断された 113 症例 (腺癌 65 症例, 扁平上皮癌 31 例, 大細胞癌 14 例 (うち, LCNEC 8 例), 腺扁平上皮癌 3 例) のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い, 免疫組織化学染色にて腫瘍組織での蛋白質発現を評価した。また同時に正常気管支・末梢肺組織での染色性は腫瘍病巣より離れた部位の正常肺組織 10 症例を同時に染色し, 評価した。

なお, 以降 LCNEC 以外の大細胞癌を大細胞癌と表記し, LCNEC と区別した。

免疫組織化学染色の評価方法と解析

免疫組織化学染色は ABC 法にて行い, 一次抗体は市販されているマウスモノクローナル抗体 CK5 (XM26, Novocastra, Newcastle upon Tyne, England; 希釈率 200 倍にて使用), CK5/6 (D5/16B4, DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark; 希釈率 100 倍にて使用), CK8 (35βH11, DAKO; 希釈率 50 倍にて使用), CK17 (E3, DAKO; 希釈率 50 倍にて使用), CK18 (DC10, DAKO; 希釈率 20 倍にて使用), CK19 (RCK108,

DAKO; 希釈率 50 倍にて使用) を用いた。染色性の評価は正常組織・腫瘍間質の染色性と比較して決定された。

腫瘍組織は陽性細胞数で 4 段階に評価した。すなわち強陽性 (2+) : 70% 以上の腫瘍細胞が陽性, 陽性 (+) : 40～70% の腫瘍細胞が陽性, 弱陽性 (±) : 10～40% の腫瘍細胞が陽性, 陰性 (-) : 10% 未満の腫瘍細胞が陽性と評価し, 陽性率は (2+), (+) を陽性症例と判定, 陽性率を算出し統計学的解析を行った。統計学的解析には χ^2 検定, Fisher 検定を用いた。(Dr. SPSS II for Windows, standard version 11.0, SPSS Inc, Chicago, Ill).

染色性および腫瘍組織での陽性細胞数の評価は 2 人の病理医と 1 人の外科医により独立して評価し, 評価の異なる症例については供覧のうえ再評価した。

結果

2次元電気泳動および質量分析による解析

2次元電気泳動ゲル上で扁平上皮癌関連蛋白質 (eSq), 腺癌関連蛋白質 (eAd) および神経内分泌癌関連蛋白質 (eNE) をそれぞれ 19 個, 16 個, 17 個検出した。扁平上皮癌関連蛋白質 19 個中 6 個, 腺癌関連蛋白質 16 個中 8 個の同定を現在までに終了した。同定された合計 14 個の蛋白質分子のうち 8 個はサイトケラチンであり, CK5, CK6A, CK6C, CK6D, CK17 は扁平上皮癌関連蛋白質として同定され, CK8, CK18, CK19 は腺癌関連蛋白質として同定された。また, CK 以外に既に腺癌関連蛋白質として検出・同定されている napsin A, annexin A4 などが含まれた (Figure 1, Table 1)。

サイトケラチン免疫組織化学染色によるプロテオミクス解析の検証

正常肺組織の染色性 (Figure 2)

気管上皮細胞では CK5, CK5/6, CK19 が, 気管支腺癌細胞では CK5, CK8, CK18, CK19, 肺胞上皮細胞では CK8, CK18, CK19 が陽性を示した。I, II 型肺胞上皮細胞では CK の発現に差は認められなかった。CK17 は正常組織での発現は弱かった。

肺腫瘍組織の染色性 (Figure 3, Table 2, 3)

①扁平上皮癌関連蛋白質として同定されたサイトケラチンの腫瘍組織での発現

CK5, CK5/6 は扁平上皮癌にて高発現を示し, とともに強陽性例が 60% 以上を占め, 他の組織型と比較し有意に陽性症例を多く認めた (対腺癌 : $P < 0.001$, 対大細胞癌 : $P < 0.001$)。しかし, 扁平上皮癌の中では組織学的分化度で明らかな差を認めなかった。CK17 は CK5, CK5/6 に比較し陽性率では 74.2% とやや低いが, 他の組織型との比較では有意に陽性症例を多く認めた (対腺癌 : $P < 0.001$, 対大細胞癌 : $P = 0.014$)。

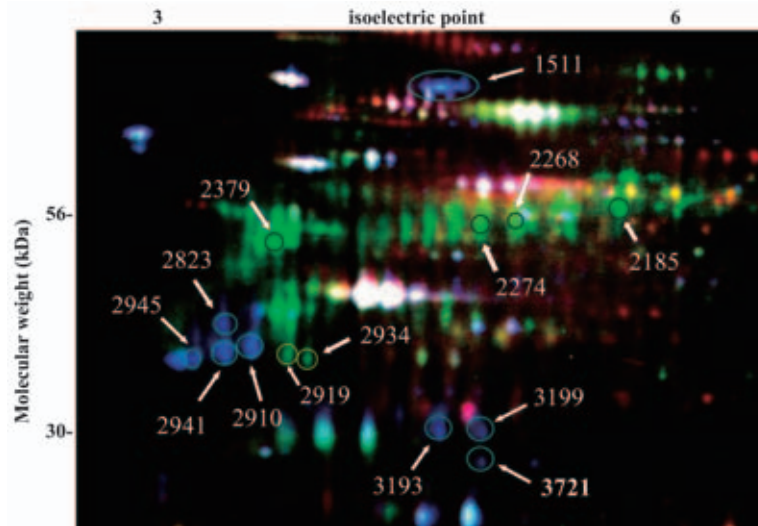


Figure 1. The localization of the protein spots detected by 2-DE analysis. This figure shows the localization of the protein spots detected by 2-DE analysis. Blue spots indicate squamous cell carcinoma-associated proteins, and green shows adenocarcinoma-associated proteins.

Table 1. Identified Proteins Detected by 2-DE Analysis

Spot No.	Spot tag	Intensity rate (fold)		Identified protein molecules
		Ad/Sq	Ad/SCC	
1511	eAd-03	7.15	6.86	HSP70
2823	eAd-05	10.60	7.81	CK18
2945	eAd-07	12.17	10.08	CK19
2941	eAd-08	13.57	11.55	CK8
2910	eAd-09	8.53	26.21	CK8
3193	eAd-10	17.70	7.94	napsin A
3199	eAd-11	9.68	5.98	napsin A
3721	eAd-12	5.05	3.68	annexin A4
		Sq/Ad	Sq/SCC	
2185	eSq-04	4.37	5.80	CK6A
2274	eSq-07	8.23	6.11	CK5
2268	eSq-08	4.47	4.86	CK5
2379	eSq-09	13.65	7.10	CK17
2919	eSq-11	6.78	6.26	CK6C
2934	eSq-12	5.55	7.70	CK6D

Ad: Adenocarcinoma, Sq: Squamous cell carcinoma, SCC: Small cell carcinoma, HSP: Heat shock protein, CK: Cytokeratin.

②腺癌関連蛋白質として同定されたサイトケラチンの腫瘍組織での発現

CK8の陽性率は腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌ともに高いが、強陽性を示す割合が腺癌で比較的高かった。特に中～高分化腺癌で60%以上の症例で強陽性を示すが、中分化以上の扁平上皮癌の強陽性は16.7%であった。陽性率では組織型間に有意な差を認めなかった。

CK18は腺癌の96.9%の陽性率を示し、扁平上皮癌に比較し有意に陽性症例が多かった ($P < 0.001$)。腺癌の中では組織学的分化度が高いほど強陽性を示す症例が多かった。

CK19の陽性率は腺癌・扁平上皮癌でほとんど差がなく、一定の傾向を認めなかった。

③腺扁平上皮癌のCKの染色性

	Bronchus	Peripheral lung	PIR
CK5			BE, BG
CK5/6			BE
CK17			N.R
CK8			AE, BG
CK18			AE, BG
CK19			BE, AE, BG

Figure 2. Cytokeratin expression in normal lung tissue. This panel shows the immunohistochemical stainability for antibodies against several kinds of cytokeratins in normal epithelium of the bronchus and peripheral lung. PIR: Positive immunohistochemical reactivity, BE: Bronchial epithelium, AE: Alveolar epithelium, BG: Bronchial glands, N.R: No reactivity, CK: Cytokeratin.

腺扁平上皮癌の評価に関しては扁平上皮癌成分と腺癌成分に分けて評価した。CK5, CK5/6では扁平上皮癌成分で強陽性を認め、腺癌成分ではほぼ陰性であった。CK17では扁平上皮癌成分で66.7%の陽性率を示した。CK18では腺癌成分で66.7%の陽性率を示した。CK8, CK19では両成分における発現差異を認めなかった。

④大細胞癌のCK染色性

大細胞癌ではCK8, 18の陽性率が高かった(100%, 66.7%)。CK18では腺癌との比較でわずかに陽性率に差を認めた($P=0.033$)が、扁平上皮癌との比較では差を認めなかった。CK5, CK5/6の染色結果では大細胞癌はCK5陽性, CK5/6強陽性の各1例ずつを示した以外はすべて陰性であった。CK17に関しても1例のみ陽性を示した。eSqとして同定されたCKの陽性率は扁平上皮癌と比較すると統計学的に有意に低かった(CK5: $P<0.001$, CK5/6: $P<0.001$, CK17: $P=0.014$)。

⑤大細胞性神経内分泌癌のCK染色性

LCNECではCK5, CK5/6の陽性例は認めず、CK17

は1例の陽性症例を認めるのみであった。CK18は強陽性症例は認めないが、8例すべてが陽性であった。CK8の陽性率は62.5%、CK19の陽性率は25%であったが、いずれも強陽性を示す症例はなかった。

考 察

今回の2D-DIGE法により検出された原発性肺癌関連蛋白質のスポットは、19種類のeSq, 16種類のeAd, 17種類のeNEであった。質量分析法による蛋白質分子の同定作業は、このうち発現量が特に多いと評価された6種類のeSq, 8種類のeAdから開始した。同定蛋白質のうち8種類はCK(eSq:CK5, CK6A, CK6C, CK6D, CK17; eAd:CK8, CK18, CK19)であり、プロテオーム解析の検証実験として市販抗体が入手可能な6種類の抗CK抗体で肺癌組織の免疫組織化学染色を行い、肺癌腫瘍細胞での発現パターンを検証することにした。

eSqとして同定されたCK5, CK6, CK17はいずれもわずかに低分化腺癌で陽性例を認めるものの、腺癌への組織分化を示す明確な細胞ではほとんど発現していないことが確認され、これらのCKは扁平上皮癌と腺癌の鑑別に有効と考えられる。eAdとして同定されたCK8, CK18, CK19はいずれも扁平上皮癌との鑑別という観点からみた場合、腺癌に対する特異性が低く、私たちが以前報告したnapsin Aを凌駕するものではない。⁴しかし、CK18は腺癌において扁平上皮癌よりも有意に高率に発現し、その陽性率はSpA, TTF-1, napsin Aなどの既存の肺腺癌のバイオマーカーよりも高率であることから、^{4,6,7}これらのバイオマーカーとの組み合わせにより、より確実な診断に寄与するものと考えられる。

以前より、細胞骨格蛋白質であるCKの腫瘍細胞での発現は多数報告されている。⁸⁻¹⁰しかしながら2次元電気泳動法による外科切除材料を用いたプロテオミクス解析の報告は少ない。¹¹私たちは扁平上皮癌、腺癌で検出・同定される蛋白質群のプロテオーム解析の中で、いくつかのCK群が肺癌組織型に比較的特徴的な発現パターンをとることを見出し、さらにCK発現に関し免疫組織学的検証を行った。検証実験でその有用性が確認できたのは扁平上皮癌関連CKでCK5, CK6, CK17, 腺癌関連CKではCK18のみであった。

扁平上皮癌とCK発現

原発性扁平上皮肺癌に対するプロテオーム解析の報告はいくつかあるが、¹²扁平上皮肺癌に対する真に特異的マーカーの報告はない。今回の解析では肺癌の他組織型との鑑別という観点から扁平上皮癌関連CKとしてCK5, CK6, CK17が同定され、その有用性が示された。一般的に扁平上皮癌のCK発現に関する評価は以前から解析が進められており、特にhigh molecular weight cy-



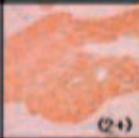
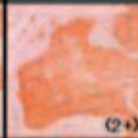
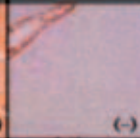



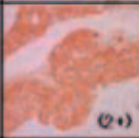
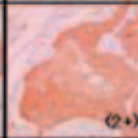
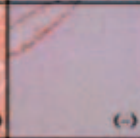

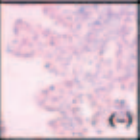

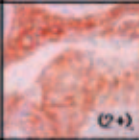
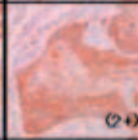
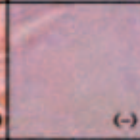

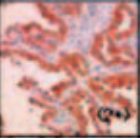
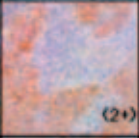
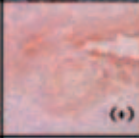
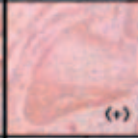
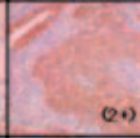

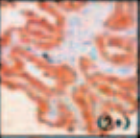
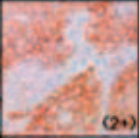
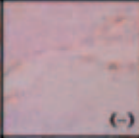
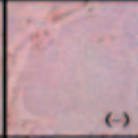
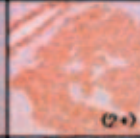
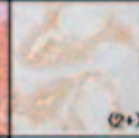
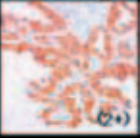
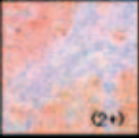
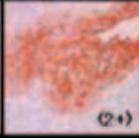
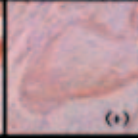
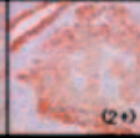

	W/D AD	P/D AD	M/D SqCC	P/D SqCC	LCC	ADSQ
CK5	 (-)	 (-)	 (2+)	 (2+)	 (-)	 (2+)
CK5/6	 (-)	 (-)	 (2+)	 (2+)	 (-)	 (2+)
CK17	 (-)	 (-)	 (2+)	 (2+)	 (-)	 (+)
CK8	 (2+)	 (2+)	 (+)	 (+)	 (2+)	 (2+)
CK18	 (2+)	 (2+)	 (-)	 (-)	 (2+)	 (2+)
CK19	 (2+)	 (2+)	 (2+)	 (+)	 (2+)	 (2+)

Figure 3. Relationship between cytokeratin expression and histopathological types of primary lung cancer. AD: Adenocarcinoma, SqCC: Squamous cell carcinoma, LCC: Large cell carcinoma except LCNEC, ADSQ: Adenosquamous cell carcinoma. (ADC); Adenocarcinoma component, (SqCCC): Squamous cell carcinoma component, W/D: Well differentiated, M/D: Moderately differentiated, P/D: Poorly differentiated, CK: Cytokeratin.

keratin (CK5, CK5/6) 発現についていくつかの報告がある.^{13,14} しかしながら CK17 についての報告は少ない. Lyda らは上皮マーカーと神経内分泌マーカーによる肺組織の検討で扁平上皮癌において CK14, CK17, 高分子 CK の発現を報告し, Wetzels らは扁平上皮癌における Type VII collagen, CK14, CK17 の発現の報告を行っている.^{15,16} 今回の結果は CK17 の発現について支持するものであった. 扁平上皮癌のサイトケラチンによる免疫組織化学染色は部位による heterogeneity が大きいことが知られている. 1つの癌巣の中でも, 基底膜側と癌巣中心では所見が異なり CK 発現パターンが変わることが経験される. 当研究でも high molecular weight (CK5, CK5/6) においては中分化型扁平上皮癌 (高分化型を含む) で基底膜側周囲での発現が目立った. しかし

ながら他のサイトケラチンでは今回, 明らかな傾向は示さなかった. 陽性細胞としての判定は腫瘍全体の面積で判定した.

腺癌と CK 発現

原発性肺腺癌におけるプロテオーム解析では Seike らによる培養細胞を用いての研究で, 肺腺癌関連蛋白として CK8, CK18 の関与を示している.¹⁷ また, Gharib らも肺腺癌外科切除材料を用いた同様の報告をしている.¹¹ 今回の解析でも, 腺癌関連サイトケラチンとして (CK8, CK18, CK19) を検出した. 他にも肺腺癌では low molecular weight cytokeratin (CK7, CK8, CK18, CK19) の発現が報告されているが,^{8,18,19} 今回 CK7 の同定はできなかった. 私たちは CK18 のみで発現率において他組織型との間に有意差を示すことができたが, 腺癌

Table 2. Correlation Between Cytokeratin Expression and Histological Types of Lung Cancer

	Cytokeratin 5				Total		Cytokeratin 5/6				Total
	2 +	+	±	-			2 +	+	±	-	
W/D AD	0	0	1 (4.0%)	24 (96.0%)	25	W/D AD	0	0	1 (4.0%)	24 (96.0%)	25
M/D AD	0	0	2 (8.7%)	21 (91.3%)	23	M/D AD	0	0	2 (8.7%)	21 (91.3%)	23
P/D AD	0	2 (11.8%)	3 (17.7%)	12 (70.6%)	17	P/D AD	0	1 (5.9%)	4 (23.5%)	12 (70.6%)	17
M/D SqCC	13 (72.2%)	4 (22.2%)	0	1 (5.6%)	18	M/D SqCC	13 (72.2%)	3 (16.7%)	0	2 (11.1%)	18
P/D SqCC	8 (61.5%)	5 (38.5%)	0	0	13	P/D SqCC	10 (76.9%)	3 (23.1%)	0	0	13
LCC	0	1 (16.7%)	0	5 (83.3%)	6	LCC	1 (16.7%)	0	0	5 (83.3%)	6
ADSQ (ADC)	0	0	1 (33.3%)	2 (66.7%)	3	ADSQ (ADC)	0	0	0	3 (100%)	3
ADSQ (SqCCC)	3 (100%)	0	0	0	3	ADSQ (SqCCC)	3 (100%)	0	0	0	3
LCNEC	0	0	2 (25.0%)	6 (75.0%)	8	LCNEC	0	0	2 (25.0%)	6 (75.0%)	8

	Cytokeratin 8				Total		Cytokeratin 17				Total
	2 +	+	±	-			2 +	+	±	-	
W/D AD	15 (60.0%)	10 (40.0%)	0	0	25	W/D AD	0	0	2 (8.0%)	23 (92.0%)	25
M/D AD	15 (65.2%)	7 (30.4%)	1 (4.4%)	0	23	M/D AD	0	0	4 (17.4%)	19 (82.6%)	23
P/D AD	8 (47.1%)	8 (47.1%)	1 (5.9%)	0	17	P/D AD	0	1 (5.9%)	3 (17.7%)	13 (76.5%)	17
M/D SqCC	3 (16.7%)	12 (66.7%)	1 (5.6%)	2 (11.1%)	18	M/D SqCC	6 (33.3%)	6 (33.3%)	4 (22.2%)	2 (11.1%)	18
P/D SqCC	3 (23.1%)	9 (69.2%)	1 (7.7%)	0	13	P/D SqCC	7 (53.9%)	4 (30.8%)	1 (7.7%)	1 (7.7%)	13
LCC	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0	0	6	LCC	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	4 (66.7%)	6
ADSQ (ADC)	3 (100%)	0	0	0	3	ADSQ (ADC)	0	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3
ADSQ (SqCCC)	0	3 (100%)	0	0	3	ADSQ (SqCCC)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0	3
LCNEC	0	5 (62.5%)	2 (25.0%)	1 (12.5%)	8	LCNEC	0	1 (12.5%)	2 (25.0%)	5 (62.5%)	8

	Cytokeratin 18				Total		Cytokeratin 19				Total
	2 +	+	±	-			2 +	+	±	-	
W/D AD	17 (68.0%)	6 (24.0%)	1 (4.0%)	1 (4.0%)	25	W/D AD	7 (28.0%)	15 (60.0%)	2 (8.0%)	1 (4.0%)	25
M/D AD	13 (56.5%)	10 (43.5%)	0	0	23	M/D AD	3 (13.0%)	15 (65.2%)	4 (17.4%)	1 (4.4%)	23
P/D AD	8 (47.1%)	9 (52.9%)	0	0	17	P/D AD	4 (23.5%)	9 (52.9%)	2 (11.8%)	2 (11.8%)	17
M/D SqCC	0	2 (11.1%)	7 (38.9%)	9 (50.0%)	18	M/D SqCC	3 (16.7%)	11 (61.1%)	4 (22.2%)	0	18
P/D SqCC	1 (7.7%)	6 (46.2%)	4 (30.8%)	2 (15.4%)	13	P/D SqCC	5 (38.5%)	8 (61.5%)	0	0	13
LCC	2 (33.3%)	2 (33.3%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	6	LCC	1 (16.7%)	2 (33.3%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)	6
ADSQ (ADC)	2 (66.7%)	0	0	1 (33.3%)	3	ADSQ (ADC)	2 (66.7%)	0	0	1 (33.3%)	3
ADSQ (SqCCC)	1 (33.3%)	0	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3	ADSQ (SqCCC)	3 (100%)	0	0	0	3
LCNEC	0	8 (100%)	0	0	8	LCNEC	0	2 (25.0%)	3 (37.5%)	3 (37.5%)	8

AD: Adenocarcinoma, SqCC: Squamous cell carcinoma, LCC: Large cell carcinoma except LCNEC, LCNEC: Large cell neuroendocrine carcinoma, ADSQ: Adenosquamous cell carcinoma; (ADC): Adenocarcinoma component, (SqCCC): Squamous cell carcinoma component, W/D: Well differentiated, M/D: Moderately differentiated, P/D: Poorly differentiated.

Table 3. Comparison of Immunohistochemical Positivity in Different Histological Types of Lung Carcinoma

	CK5	CK5/6	CK17	CK8	CK18	CK19
AD	2/65 (3.0)	1/65 (1.5)	1/65 (1.5)	63/65 (96.9)	63/65 (96.9)	53/65 (81.5)
SqCC	30/31 (96.7)	29/31 (93.5)	23/31 (74.2)	27/31 (87.0)	9/31 (29.0)	27/31 (87.0)
LCC	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	6/6 (100)	4/6 (66.7)	3/6 (50.0)
AD vs SqCC	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	N.S	p < 0.001	N.S
AD vs LCC	N.S	N.S	N.S	N.S	p = 0.033	N.S
SqCC vs LCC	p < 0.001	p < 0.001	p = 0.014	N.S	N.S	N.S

AD: Adenocarcinoma, SqCC: Squamous cell carcinoma, LCC: Large cell carcinoma except LCNEC, CK: Cytokeratin, N.S: not statistically significant, LCNEC: Large cell neuroendocrine carcinoma.

の組織亜型間で染色性に差異を見出せなかった。

大細胞癌と CK 発現

大細胞癌の診断は除外診断により成り立つその病理学的特性からどちらの特性も示さないか、扁平上皮癌、腺癌の両方の性質をわずかずつ反映するモザイクな所見が考えられた。しかし今回の解析からは腺癌の発現様式を示す傾向が強かった。実際の病理診断の場ではしばしば低分化扁平上皮癌との鑑別が困難な場合に遭遇する。Rossi らは大細胞癌において TTF-1, CK7, 高分子 CK, と CD56 を用いた免疫組織学的検討をし、大細胞肺癌を低分化腺癌と扁平上皮癌および、神経内分泌腫瘍に分ける試みを示している。²⁰ 大細胞癌の病理学的診断根拠である扁平上皮癌への分化も腺癌への分化も示さないという所見をプロテオーム解析でも重視するならば、eSq である CK5, CK6, CK17 がすべて陰性であり、かつ eAd である CK18 に napsin A を加えた eAd 陰性症例のみを真の大細胞癌としてもいいのではないかと考える。すなわち、扁平上皮癌関連 CK の発現があれば低分化扁平上皮癌に、CK18 と napsin A の発現が少しでもあれば低分化腺癌に分類していいのではないかと考える。TTF-1 は神経内分泌癌でも陽性症例があることが知られており、このような解析に用いるには適さないと考える。²¹

大細胞性神経内分泌癌と CK 発現

病理組織分類では大細胞癌の variant である LCNEC についても別に評価した。発現結果は大細胞癌と同じく腺癌関連サイトケラチン CK8, CK18 の陽性率が高い結果であった。神経内分泌腫瘍における CK18 発現に関してはいくつか報告があり、Cho らによるプロテオーム解析では定型的カルチノイド(89%), 非定型的カルチノイド(50%), LCNEC (50%), 小細胞肺癌(56%)での CK18 発現陽性を報告している。²² 今回 LCNEC での CK18 発現を確認したが、今回の解析と同様の基準で評価した小細胞肺癌の解析は全例 (-) あるいは (+) であった (data not shown)。

蛋白質発現からみた非小細胞肺癌の分類

肺癌のバイオマーカーとしては SpA, TTF-1, napsin A などが確立されている。しかしながら原発性の扁平上皮肺癌の性格を示すバイオマーカーは確立されたものがない。今回の解析は原発性肺癌の中で組織型鑑別に有用なバイオマーカーとして CK5, CK6, CK17 が有力と考えられたが、むろん肺原発の扁平上皮癌に特異的なものではない。またさらに、腺癌の鑑別に CK18 が有用である可能性が示唆されたが、これも肺原発の腺癌に特異的ではない。今後 2-DE による肺癌関連蛋白質解析は発現量の比較的少なかった検出スポットや eNE の解析を進めていくことになる。将来的には神経内分泌癌への分化、扁平上皮癌への分化、腺癌への分化を各組織型関連の蛋白質発現に基づき数値化し、この3つの座標で腫瘍の性格を示すことも可能になるのではないかと考える。境界的病変の存在が明らかになっている現在、肺癌をいくつかのカテゴリーに無理に分類するのではなく、上記のような表記の方が腫瘍の生物学的性格をより客観的に明確にできるのではないかと考えている。癌におけるプロテオーム解析の大きな目的の1つは腫瘍の生物学的特性を明確にし、治療に反映させることにある。例えば、腺癌では他の組織型関連の蛋白質発現が混在する症例や腺癌関連蛋白質の発現が弱い症例(非典型的蛋白質発現症例)は典型的な腺癌パターンの蛋白質発現様式を示す症例に比較し予後が悪いことが知られている。³ 今後、今回示すことができた各組織型関連サイトケラチン発現も同様に予後に関しての相関が認められるならば、より術後補助化学療法に必要な症例選択などに応用の可能性がでてくると考える。癌の個別化治療の必要性が強調される中、癌細胞の生物学的特性を明らかにすることは今後の肺癌治療において不可欠なことになるに違いない。

謝辞：本稿を終えるにあたり、本論文作成に御指導賜りまし

た当院病理診断学講座の芹澤博美准教授、並びに国際医学情報センター J. P. Barron 教授に深謝いたします。

本論文の要旨は第 47 回日本肺癌学会総会 (2006 年 12 月京都)、第 12 回世界肺癌学会 (2007 年 9 月 Seoul, Korea) において報告した。

REFERENCES

- Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. *Histological Typing of Lung and Pleural Tumours*. 3rd ed. Heidelberg: Springer; 1999.
- Hirano T, Franzén B, Uryu K, Okuzawa K, Alaiya AA, Vanky F, et al. Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br J Cancer*. 1995;72:840-848.
- 平野 隆, 竹川広三, 日吉利光, 田口史子, 大平達夫, 池田徳彦, 他. 2 次元電気泳動法による肺癌蛋白質解析結果に基づく原発性肺腺癌の生物学的悪性度評価. *肺癌*. 2000;40:195-200.
- Hirano T, Gong Y, Yoshida K, Kato Y, Yashima K, Maeda M, et al. Usefulness of TA02 (napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2003;41:155-162.
- Franzén B, Linder S, Okuzawa K, Kato H, Auer G. Nonenzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1993;14:1045-1053.
- Zamecnik J, Kodet R. Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch*. 2002;440:353-361.
- Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:598-606.
- Blobel GA, Moll R, Franke WW, Vogt-Moykopf I. Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. I. Adenocarcinomas, squamous cell carcinomas and cultured cell lines. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1984;45:407-429.
- Broers JL, Ramaekers FC, Rot MK, Oostendorp T, Huysmans A, van Muijen GN, et al. Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1988;48:3221-3229.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31:11-24.
- Gharib TG, Chen G, Wang H, Huang CC, Prescott MS, Shedden K, et al. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2002;4:440-448.
- Li C, Chen Z, Xiao Z, Wu X, Zhan X, Zhang X, et al. Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309:253-260.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:150-158.
- Kaufmann O, Fietze E, Mengers J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2001;116:823-830.
- Lyda MH, Weiss LM. Immunoreactivity for epithelial and neuroendocrine antibodies are useful in the differential diagnosis of lung carcinomas. *Hum Pathol*. 2000;31:980-987.
- Wetzels RH, Schaafsma HE, Leigh IM, Lane EB, Troyanovsky SM, Wagenaar SS, et al. Laminin and type VII collagen distribution in different types of human lung carcinoma: correlation with expression of keratins 14, 16, 17 and 18. *Histopathology*. 1992;20:295-303.
- Seike M, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, Matsuno Y, et al. Proteomic signatures for histological types of lung cancer. *Proteomics*. 2005;5:2939-2948.
- Nhung NV, Mirejovský P, Mirejovský T, Melínová L. Cytokeratins and lung carcinomas. *Cesk Patol*. 1999;35:80-84.
- Young GD, Winokur TS, Cerfolio RJ, Van Tine BA, Chow LT, Okoh V, et al. Differential expression and bio-distribution of cytokeratin 18 and desmoplakins in non-small cell lung carcinoma subtypes. *Lung Cancer*. 2002;36:133-141.
- Rossi G, Marchioni A, Milani M, Scotti R, Foroni M, Cesinaro A, et al. TTF-1, cytokeratin 7, 34βE12, and CD56/NCAM immunostaining in the subclassification of large cell carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:884-893.
- Sturm N, Rossi G, Lantuejoul S, Papotti M, Frachon S, Claraz C, et al. Expression of thyroid transcription factor-1 in the spectrum of neuroendocrine cell lung proliferations with special interest in carcinoids. *Hum Pathol*. 2002;33:175-182.
- Cho NH, Koh ES, Lee DW, Kim H, Choi YP, Cho SH, et al. Comparative proteomics of pulmonary tumors with neuroendocrine differentiation. *J Proteome Res*. 2006;5:643-650.