

## 肺扁平上皮癌の組織発生と諸問題

武島幸男<sup>1</sup>・井内康輝<sup>1</sup>・風呂中修<sup>2</sup>・西阪 隆<sup>3</sup>

**要旨**—— **目的**. 肺扁平上皮癌の組織発生を中枢型および末梢型扁平上皮癌のそれぞれについて, 種々の遺伝子異常や蛋白発現の異常の面から検討する. **方法**. 中枢型扁平上皮癌の多段階発癌に関するモデルとして, 中枢気道の種々の過形成, 化生, 上皮内癌を蒐集し, これらの病変の p53 遺伝子を中心とする異常を明らかにする. また, 末梢型扁平上皮癌については, p14, p15, p16 遺伝子のメチル化や p16 の発現, また, Maspin, p63, TTF-1 などの分化抗原の発現を検討した. **結果**. 中枢気道の前がん性病変として指摘されている異形成, 上皮内癌では, その異型度が増すにつれ遺伝子異常の蓄積がみられた. また, 中枢型と末梢型の扁平上皮癌を比較した検討では, 中枢型で遺伝子の異常なメチル化の頻度が高い傾向があった. 末梢型では p16 遺伝子のメチル化と喫煙指数に関連がみられた. さらに, 末梢型では通常発現のみられない TTF-1 の発現を示す例が少数ながら存在した. **結語**. 異形成, 中枢型・末梢型扁平上皮癌のそれぞれの遺伝子異常や蛋白発現のプロファイルの差異の検討は, それらの組織発生を推論する上で有用である可能性がある. (肺癌. 2007;47:927-933)

**索引用語**—— 肺癌, 扁平上皮癌, 中枢型, 末梢型, 組織発生

## Problems in Histogenesis of Pulmonary Squamous Cell Carcinoma

Yukio Takeshima<sup>1</sup>; Kouki Inai<sup>1</sup>; Osamu Furonaka<sup>2</sup>; Takashi Nishisaka<sup>3</sup>

**ABSTRACT**—— **Objective**. To elucidate the histogenesis of pulmonary squamous cell carcinoma in terms of the location (central or peripheral) by analyzing the various genetic alterations and protein expressions. **Methods**. As a model of multistep carcinogenesis of central type squamous cell carcinoma, the various preinvasive lesions including hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma *in situ* were collected, and analyzed the abnormalities of tumor suppressor genes, especially p53 gene. Moreover, concerning the peripheral type squamous cell carcinoma, the abnormal methylation of p14, p15 and p16 genes and p16 expression were analyzed, and moreover, the expression of differentiation markers including Maspin, p63 and TTF-1 were also immunohistochemically analyzed. **Results**. The accumulation of genetic alterations was observed according to the atypia in dysplasias and squamous cell carcinoma *in situ*. The higher frequency of abnormal methylation of various genes in central type squamous cell carcinomas was observed comparing with peripheral type. In the peripheral type squamous cell carcinomas, the methylation of p16 gene and smoking index were well correlated. Some peripheral type squamous cell carcinomas showed positivity for TTF-1, usually not detected in squamous cell carcinomas. **Conclusion**. The analyses of profiles of genetic and epigenetic alterations and the expressions of various genes among dysplasia and squamous cell carcinomas would be useful to speculate on the histogenesis. (JJLC. 2007;47:927-933)

**KEY WORDS**—— Lung cancer, Squamous cell carcinoma, Central type, Peripheral type, Histogenesis

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 <sup>1</sup>病理学, <sup>2</sup>分子内科学; <sup>3</sup>県立広島病院臨床研究検査科.

別刷請求先: 武島幸男, 広島大学大学院医歯薬学総合研究科病理学, 〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 (e-mail: ykotake@hiroshima-u.ac.jp).

<sup>1</sup>Department of Pathology, <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Ja-

pan; <sup>3</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Hiroshima Prefectural Hospital, Japan.

Reprints: Yukio Takeshima, Department of Pathology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan (e-mail: ykotake@hiroshima-u.ac.jp).

© 2007 The Japan Lung Cancer Society

## はじめに

肺癌の発生率、死亡率は依然として増加傾向を示しているが、<sup>1</sup> これは主として末梢型肺癌の増加によるものである。一方、扁平上皮癌は、肺癌全体に占める割合は漸減傾向を示しているが、手術材料でみると、末梢型扁平上皮癌の占める割合が増加していることが指摘されている。

肺の扁平上皮癌は従来より、その発生部位により「中枢型」と「末梢型」に大別されている。「中枢型」は、主気管支、葉気管支、区域気管支、亜区域気管支から発生する場合を指し（区域気管支、亜区域気管支に発生するものは「中間層部型」とする場合もある）、それより末梢に発生する場合を「末梢型」としている。<sup>2</sup>

中枢型扁平上皮癌は、形態学的な観察から、気道上皮の扁平上皮化生 squamous metaplasia, 異形成 dysplasia, 上皮内癌 carcinoma *in situ*, 浸潤癌の経過をとる多段階的な発がん過程を示すものと、*de novo* に発生する例が存在することが知られている。<sup>3</sup>

一方、末梢型扁平上皮癌は、臨床癌として発見される時点では既に浸潤癌であることが多く、その前癌性病変として位置づけられる明確な病変はいまだ明らかにされていないと言え難く、その発生要因、発生機序についての解明が急がれるところである。

そこで、本ワークショップでは、教室で行ってきた肺扁平上皮癌に関する研究の中から、中枢型および末梢型扁平上皮癌の分子病理学的研究の結果を紹介し、その組織発生について考察したい。

1. 中枢型肺扁平上皮癌の多段階的な発がん過程における遺伝子異常<sup>4</sup>

## 材料と方法

手術的に摘出された肺癌例の 29 例にみいだされた気道上皮の過形成性病変 6 病巣、扁平上皮化生 5 病巣、異形成（軽度 16 病巣、中等度 12 病巣、高度 9 病巣）、および上皮内癌 4 病巣を対象に、病変の microdissection, DNA 抽出を行い、p53 蛋白の発現は抗 p53 抗体 (DO-7, Novocastra 社) を用いて検索した。また、p53 gene のエクソン 5~8 の点突然変異は、PCR-SSCP 法にてスクリーニング後、異常バンドを示す例について、dideoxy 法を用いて検索した。さらに、9p, 3p, 17p 上の計 9 つの microsatellite marker (D3S643, D3S663, D3S1007, D3S1110, D3S1228, INFA, D9S144, D9S171, TP53) を用いて loss of heterozygosity (LOH) の検討を行った。

## 結果 (Table 1, Figure 1)

p53 蛋白の過剰発現は、過形成性病変や扁平上皮化生ではほとんどみられず、異形成および上皮内癌では過剰発現は高頻度に見られたが、p53 遺伝子の点突然変異は高度異形成以上の病変に認めた。また、3p あるいは 9p の LOH は軽度あるいは中等度異形成の段階からみられ、これらは発がん過程の早期のイベントであることが示唆された。また、中枢型扁平上皮癌では、気道上皮の遺伝子異常の蓄積に伴って、より増殖能あるいは悪性度の高い病変に進展していく可能性を示唆した。また、「円柱上皮過形成」の 1 病巣に遺伝子異常の存在が認められたが、従来から指摘されている、扁平上皮化生、異形成以外の前がん性病変が存在することがうかがわれた。こ

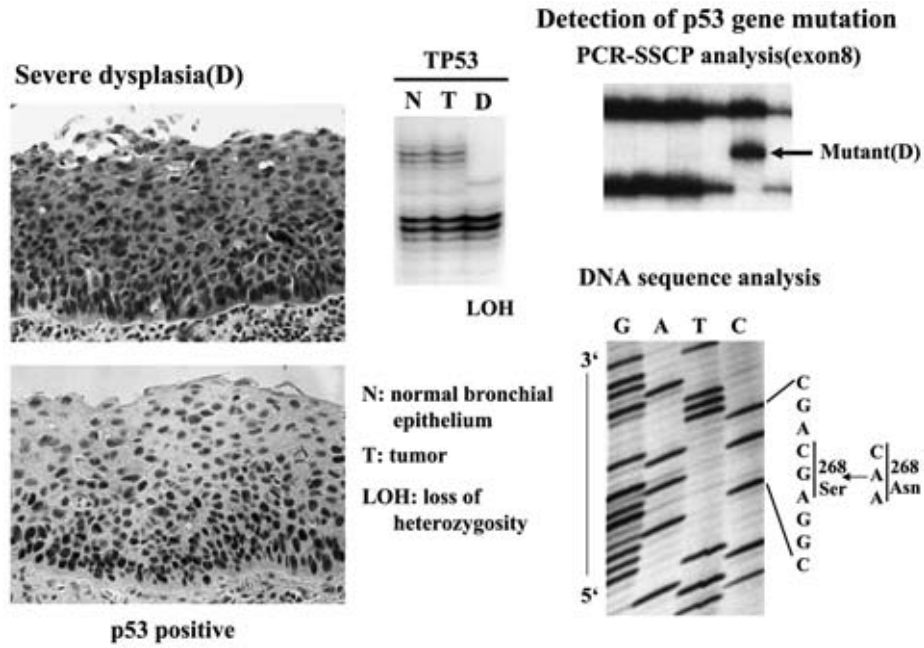
**Table 1.** Overexpression of Oncoprotein and Mutation of p53 Gene, and Loss of Heterozygosity of 3p, 9p and 17p in Various Bronchial Lesions

Bronchial lesions	No. of lesions	No. of lesions with positive p53 overexpression (%)	No. of lesions with mutation of p53 gene (%)	No. of lesions with LOH (%)		
				3p	9p	17p
Normal	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Squamous metaplasia	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Columnar cell hyperplasia	6	1 (17)	0 (0)	1 (17)	0 (0)	1 (17)
Dysplasia						
Mild	16	5 (31)	0 (0)	0 (0)	1 (6)	0 (0)
Moderate	12	6 (50)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)
Severe	9	6 (67)	2 (22)*	1 (11)	1 (11)	2 (22)
Squamous cell carcinoma <i>in situ</i>	4	2 (50)	1 (25)†	2 (50)	1 (25)	0 (0)
Early stage squamous cell carcinoma	5	3 (60)	1 (20)‡	1 (20)	1 (20)	1 (20)

\*case 4, exon 6/codon 196 (CGA→CCA), case 14, exon 8/codon 268 (AAC→AGC).

†case 6, exon 8/codon 270 (TTT→TGT).

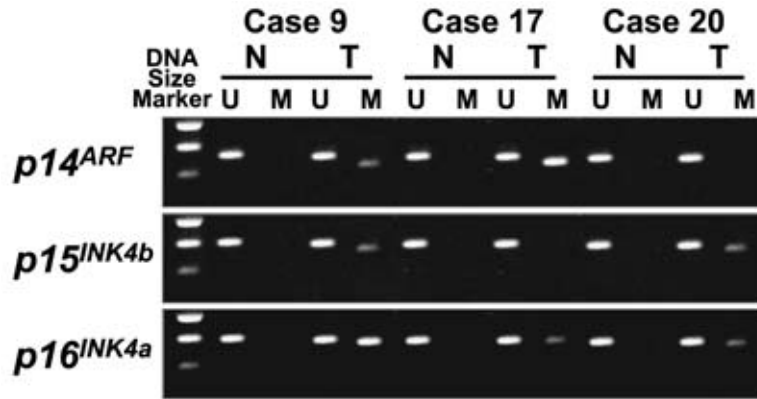
‡case 17, exon 8/codon 298 (GAG→GTG).



**Figure 1.** p53 overexpression and gene mutation in severe dysplasia. This severe dysplasia lesion showed positive reaction for DO-7. There was loss of heterozygosity at TP53 microsatellite marker locus. DNA sequence analysis indicates the presence of missense mutation at codon 268.

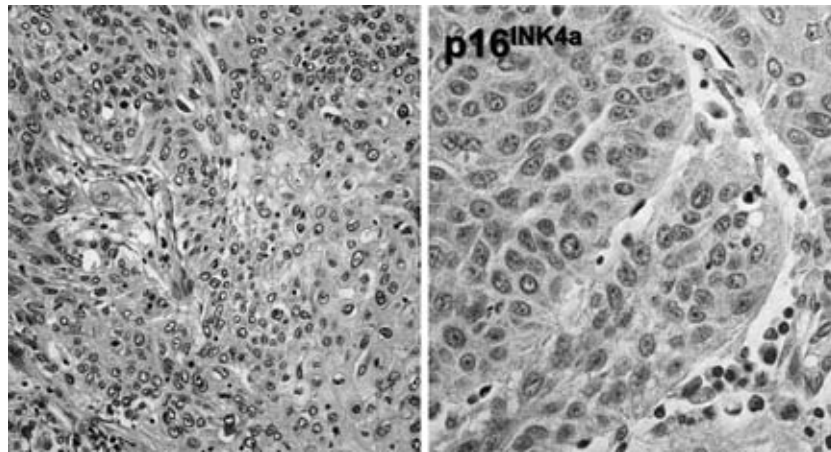
**Table 2.** Aberrant Methylation of the 9p21 Gene Cluster and Immunohistochemistry in Pulmonary Squamous Cell Carcinomas

	Central type		Peripheral type		P-value
	(n = 20)	(%)	(n = 40)	(%)	
Methylation status					
p14 <sup>ARF</sup>	6	(30)	10	(25)	0.76
p15 <sup>INK4b</sup>	4	(20)	4	(10)	0.28
p16 <sup>INK4a</sup>	8	(40)	15	(38)	1.00
Methylation of					
One gene	5		20		0.02
Two of three genes	6		4		
Details					
Specific p14 <sup>ARF</sup>	2		7		
Specific p15 <sup>INK4b</sup>	0		1		
Specific p16 <sup>INK4a</sup>	3		12		
p14 <sup>ARF</sup> + p15 <sup>INK4b</sup>	1		1		
p14 <sup>ARF</sup> + p16 <sup>INK4a</sup>	2		1		
p15 <sup>INK4b</sup> + p16 <sup>INK4a</sup>	2		1		
p14 <sup>ARF</sup> + p15 <sup>INK4b</sup> + p16 <sup>INK4a</sup>	1		1		
p16 <sup>INK4a</sup> expression					
Positive	6	(30)	18	(45)	0.40
Negative	14	(70)	22	(55)	
Ki-67 expression					
< 10%	0	(0)	4	(10)	0.32
10-50%	8	(40)	16	(40)	
> 50%	12	(60)	20	(50)	



The presence of a visible PCR product in lane U indicates the presence of unmethylated DNA, and the presence of a product in lane M indicates methylated DNA.

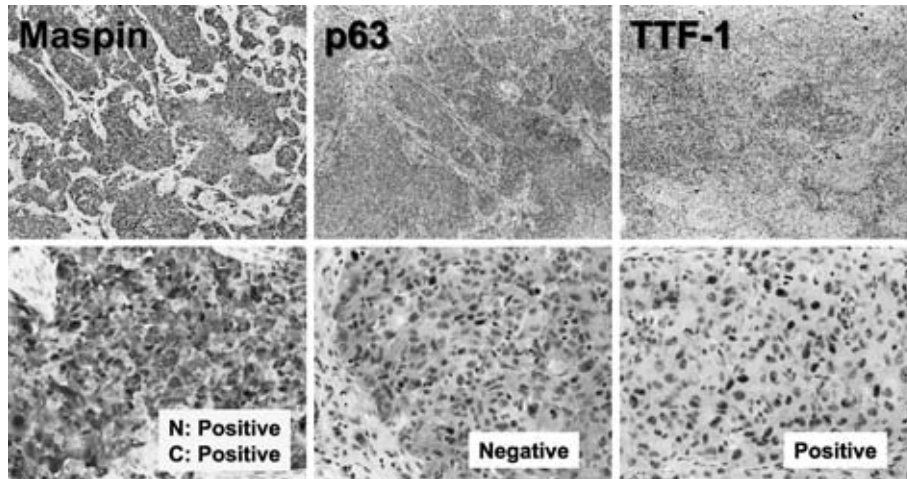
**Figure 2.** Representative methylation-specific PCR of 9p21-22 gene cluster. There were multiple abnormal methylation bands at p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, and p16<sup>INK4a</sup> in each cases.



**Figure 3.** The loss of p16 expression in peripheral type squamous cell carcinoma. The loss of p16 expression in peripheral type squamous cell carcinoma (72 years old, male, T2N0M0 (stage IB) case). This case showed abnormal methylation of the promoter of p16 gene.

**Table 3.** The Expression of Maspin, p63, and TTF-1 in Pulmonary Squamous Cell Carcinomas and Adenocarcinomas

	Squamous cell carcinoma		Adenocarcinoma
	Central type	Peripheral type	
Maspin			
Nucleus	16/19 (84%)	35/40 (88%)	23/26 (88%)
Cytoplasm	19/19 (100%)	40/40 (100%)	11/26 (42%)
p63	19/19 (100%)	36/40 (90%)	3/26 (12%)
TTF-1	0/19 (0%)	4/40 (10%)	23/26 (88%)



**Figure 4.** Maspin, p63 and TTF-1 expression in peripheral type squamous cell carcinoma. This peripheral type squamous cell carcinoma showed positivity for Maspin (nucleus and cytoplasm), and TTF-1. However, less than 10% tumor cells showed positivity for p63.

のような genetic な異常については、これまで比較的多くの報告があり、<sup>5-7</sup> 同様の結論を述べている。しかし、epigenetic な異常に関する報告は、technical な問題からほとんどないと思われる。Lamy ら<sup>8</sup> は扁平上皮化生や異形成でも p16 遺伝子のプロモーター領域の異常なメチル化が存在し、その異型度が高くなるにつれて異常の頻度が増加することを報告している。今後、p16 遺伝子以外の遺伝子の epigenetic な異常についても検討を行う必要がある。

## 2. 末梢型および中枢型扁平上皮癌の各種がん抑制遺伝子 (p14, p15, p16 遺伝子) プロモーター領域のメチル化・発現の異常<sup>9,10</sup>

### 材料と方法

中枢型扁平上皮癌 20 例、末梢型扁平上皮癌 40 例の外科的に切除された肺癌組織を対象とした。これらのホルマリン固定パラフィン材料から DNA を抽出後、bisulfate 処理後 methylation specific PCR (MSP) 法にて、p14, p15, p16 遺伝子の promoter 領域の異常なメチル化の有無を検討した。また、p16 の発現については抗 p16 抗体 (Novocastra 社) を用いて免疫組織化学的に検討し、10% 以上の腫瘍細胞の核に陽性を示す例を陽性とし、それ以下の発現を示す場合、発現の消失とした。

### 結果 (Table 2, Figure 2, 3)

p14, p15, p16 遺伝子の promoter 領域の異常なメチル化と種々の臨床病理学的因子との相関をみると、末梢型では p16 遺伝子のメチル化は喫煙指数が高い症例で高率にみられた。免疫組織化学的染色による蛋白発現の検討では p16 遺伝子のメチル化とその産物の蛋白の発

現の減少・消失に相関があることが確認できた。また、3つの遺伝子のうち2つ以上の遺伝子に異常のある例の割合は、末梢型より中枢型で大きい傾向があった。このような結果は、中枢型と末梢型の扁平上皮癌における epigenetic な遺伝子制御の差異を示すと推測される。また、末梢型扁平上皮癌では特に p16 遺伝子のメチル化がその発生に関与していることが推測されたが、メチル化の程度と喫煙指数に相関があったことから、末梢型においても喫煙の影響を無視できないと考えられた。

## 3. 末梢型および中枢型扁平上皮癌における各種分化抗原 (Maspin, p63, TTF-1) の発現<sup>11</sup>

### 材料と方法

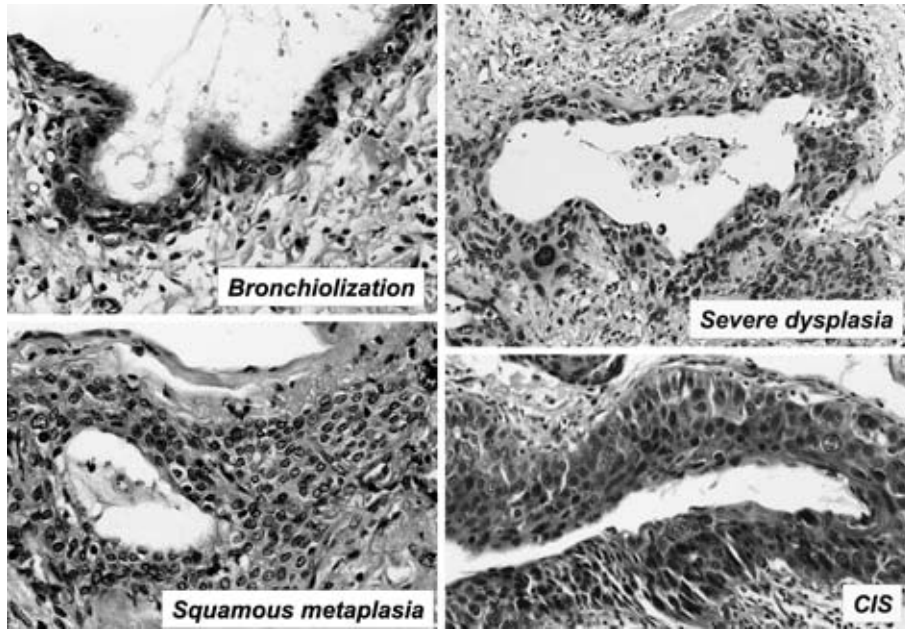
19 例の中枢型、40 例の末梢型扁平上皮癌、および 26 例の肺腺癌の切除例に Maspin (a mammary homologue of serine protease inhibitors の略で、腫瘍の進展・転移を抑制するとされる)、p63 (気管支・細気管支の基底細胞マーカー)、TTF-1 (クララ細胞、II 型上皮細胞のマーカー) の発現を免疫組織化学的に検討した。

### 結果

正常肺では、Maspin, p63 は気管支あるいは比較的大い細気管支の基底細胞に発現がみられた。また、TTF-1 は細い細気管支から肺胞のクララ細胞あるいは II 型上皮に発現がみられ、それぞれの蛋白の発現は、気道における種々の上皮細胞のマーカーとなる可能性を示唆した。

腫瘍組織における Maspin の核での発現、Maspin の細胞質での発現、p63 の発現、TTF-1 の発現は、中枢型扁平上皮癌では、それぞれ、84%, 100%, 100%, 0%, 末





**Figure 5.** Squamous cell carcinoma *in situ* (CIS) in UIP. The patient was 81 years old, male. During the follow ups of UIP, abnormal shadow appeared, and VATS was undertaken. As the result, squamous metaplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma *in situ* (CIS) was detected in the same lesion of the peripheral lung tissue.

梢型扁平上皮癌では、それぞれ、88%、100%、90%、10%であった。なお、26例の腺癌の検討では、それぞれ88%、42%、12%、88%であった (Table 3)。

扁平上皮癌全体と腺癌を比較すると、Maspinの細胞質での発現、p63の発現は扁平上皮癌で、TTF-1の発現は腺癌で高い傾向があった。また、中枢型と末梢型扁平上皮癌における3つのマーカーの発現の有意な差はみられなかったが、少数例(10%)の末梢型でのTTF-1発現を示す症例が存在した (Figure 4)。このことは末梢型肺扁平上皮癌のあるsubsetには、その発生母地としてII型肺胞上皮あるいはクララ細胞が想定される例があることを示唆する。

## 結 語

以上、中枢型と末梢型扁平上皮癌の各種遺伝子の発現異常、蛋白発現のパターンに差異があることを示してきたが、このことは両者の組織発生や発がん因子が異なることを示唆している。また、従来より、中枢型扁平上皮癌の前がん性病変として異形成や上皮内癌の存在が指摘されてきたが、末梢型についてはその組織発生に関して我々の研究において明確な差のあるマーカーを明らかにすることができなかった。最近、我々は、間質性肺炎の経過観察中に、末梢肺組織が改築され細気管支化された上皮を置換するように増殖する、上皮内癌と言わざるを

得ない例を経験した (Figure 5)。今後、このような早期の末梢型扁平上皮癌の病変を集積・検討することも、末梢型扁平上皮癌の発生要因を明らかにするうえで重要であろう。

## REFERENCES

1. 財団法人厚生統計協会. 人口動態 厚生 の指標. 臨時増刊 国民衛生の動向. 東京: 財団法人厚生統計協会; 2006:46-47.
2. Tomashefski JF Jr, Connors AF Jr, Rosenthal ES, Hsiue IL. Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114:468-474.
3. World Health Organization. International histological classification of tumours. *Histological typing of lung and pleural tumours.* 3rd ed. Berlin: Springer; 1999.
4. Nishisaka T, Takeshima Y, Inai K. Evaluation of p53 gene mutation and loss of heterozygosity of 3p, 9p, and 17p in precancerous lesions of 29 lung cancer patients. *Hiroshima J Med Sci.* 2000;49:109-116.
5. Bennett WP, Colby TV, Travis WD, Borkowski A, Jones RT, Lane DP, et al. p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res.* 1993;53:4817-4822.
6. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, et al. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene.* 1992;7:

- 1989-1997.
7. Kishimoto Y, Sugio K, Hung JY, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD, et al. Allele-specific loss chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1224-1229.
  8. Lamy A, Sesboüé R, Bourguignon J, Dautréaux B, Métayer J, Frébourg T, et al. Aberrant methylation of the CDKN2a/p16INK4a gene promoter region in preinvasive bronchial lesions: a prospective study in high-risk patients without invasive cancer. *Int J Cancer.* 2002;100:189-193.
  9. Furonaka O, Takeshima Y, Awaya H, Ishida H, Kohno N, Inai K. Aberrant methylation of p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup> genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma. *Pathol Int.* 2004;54:549-555.
  10. 井内康輝, 風呂中修. 末梢肺の扁平上皮癌の発生機序 発癌因子との関連. MOOK 肺癌の臨床 2005-2006. 東京: 篠原出版新社; 2006:23-31.
  11. 風呂中修, 武島幸男, 服部 登, 河野修興, 井内康輝. 肺扁平上皮癌と腺癌における Maspin, p63, TTF-1 発現の検討. 肺癌. 2006;46:532.