

ORIGINAL ARTICLE

非小細胞肺癌におけるアポトーシス関連遺伝子 Survivin の 発現頻度の免疫組織化学的検討

星 史彦¹・遠藤千頭¹・桜田 晃¹・松村輔二¹・岡田克典¹・
星川 康¹・佐渡 哲¹・野田雅史¹・近藤 丘¹

Immunohistochemical Study of an Anti-apoptotic Protein, Survivin, in Lung Cancer

Fumihiko Hoshi¹; Chiaki Endo¹; Akira Sakurada¹; Yuji Matsumura¹; Yoshinori Okada¹;
Yasushi Hoshikawa¹; Tetsu Sado¹; Masafumi Noda¹; Takashi Kondo¹

¹Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** Survivin is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) family and is considered to play a significant role in the tumorigenesis and proliferation of various kinds of cancers. The purpose of this report is to clarify the relationship between the expression of survivin and prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods.** We examined 100 NSCLC patients who underwent lobectomy in Tohoku University Hospital between October 2000 and December 2004. Expression of survivin and p53 was evaluated by immunohistochemistry. **Results.** The patients consisted of 71 men and 29 women. The average age was 66.1 years old. There were 71 cases of adenocarcinoma and 29 cases of squamous cell carcinoma. Immunohistochemical analyses showed that 64 cases had survivin expression in the cytoplasm, 40 cases had survivin expression in the nucleus, and 36 cases had expression in both the cytoplasm and nucleus. p53-positive staining was detected in 57 cases. There was no significant relationship between expression of survivin and p53. A multivariate analysis with Cox's proportional hazards model showed expression of survivin in the nucleus was an independent poor prognostic factor. **Conclusion.** Expression of survivin in the nucleus is suggested to be an independent poor prognostic factor in NSCLC. Survivin has several spliced variants and immunohistochemistry can't distinguish among these variants, so immunohistochemistry can't show which variants are important. Further examination with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is needed to elucidate survivin variants expression.

(JLCC. 2009;49:12-16)

KEY WORDS — Survivin, Non-small cell lung cancer, Immunohistochemistry, Prognostic factor

Reprints: Fumihiko Hoshi, Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8575, Japan (e-mail: hohohoshi@idac.tohoku.ac.jp).

Received March 26, 2008; accepted August 12, 2008.

要旨 — **目的.** 抗アポトーシスタンパクの Survivin は、種々の癌細胞の発現に重要な役割を担っている。非小細胞肺癌における Survivin の発現形式が予後に与える影響について、免疫組織化学的に検討を行った。**方法.** 2000年10月～2004年12月までに東北大学病院にて肺切除術を施行した非小細胞肺癌100例を対象とし、Survivin および p53 の発現を免疫組織化学的に解析した。**結果.** 100例は、男性71例、女性29例、平均年齢66.1歳。腺癌

71例、扁平上皮癌29例であった。Survivin の発現は、64例で細胞質に、40例で核に、36例で両者に認められ、32例で核、細胞質ともに陰性であった。p53は57例で陽性であったが、Survivin の発現と相関を示さなかった。多変量解析の結果、核における Survivin の発現は独立した予後不良因子であることが認められた。**結論.** 核に存在する Survivin は予後に影響を与えるが、どの variants が重要なのかを確認することは免疫組織化学的解析では

¹東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野。

別刷請求先：星 史彦，東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野，〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町4-1 (e-mail:

hohohoshi@idac.tohoku.ac.jp)。

受付日：2008年3月26日，採択日：2008年8月12日。

不可能である。variants 毎の発現を RT-PCR によって評価するさらなる研究が必要と考えられた。

はじめに

Survivin は抗アポトーシスタンパクの一種で、胎生期の細胞には発現が認められ、細胞の分化増殖に関与しているが、成人正常細胞では一部の細胞を除いて発現していない。¹ しかし、乳癌、² 食道癌、^{3,4} 肝細胞癌、^{5,6} 非小細胞肺癌⁷⁻¹¹ などの各種癌細胞では高率に Survivin の発現が認められており、発癌およびその成長において重要な役割を担っていると考えられている。^{1,12} Survivin は細胞質と核に発現することがこれまで報告されており、それぞれ異なった作用を有し予後に対する影響も異なると考えられている。今回我々は非小細胞肺癌における Survivin の発現頻度と、Survivin の発現に関与していると考えられる p53^{9,13,14} の発現頻度を免疫組織化学的に検討し、p53 の発現ならびに Survivin の発現部位と予後の関係を検討した。

対象と方法

対象

2000 年 10 月～2004 年 12 月までに東北大学病院呼吸器外科で肺切除術を施行した非小細胞肺癌症例 322 例のうち、その後の追跡調査が可能で免疫染色に適した標本が得られた 100 例を対象とした。100 例の内訳は男性 71 例、女性 29 例、平均年齢 66.1 歳、平均観察期間 1187 日であった。肺癌の組織は腺癌 71 例、扁平上皮癌 29 例、病期は I 期 58 例、II 期 16 例、III 期 26 例であった (Table 1)。

免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋された手術標本を 3 μ m に薄切し、キシレンで脱パラフィン、アルコールにて脱水を行った。10 mM のクエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸し、6 分間加熱処理をして抗原の賦活化を行った。3% エタノールで内因性ペルオキシダーゼの処理を行い、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。一次抗体は anti-survivin rabbit polyclonal antibody (No.500-201; Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-p53 mouse monoclonal antibody (NP010; DAKO, Tokyo, Japan) を使用した。histofine immunostaining kit (SAB-PO; Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を用いて標識ストレプトアビジン—ビオチン法を行い、diaminobentidin (DAB) にて発色を行った。さらにヘマトキシリンにて対比染色を行った。

染色標本の評価は、盲検法により全体の 10% 以上の細

索引用語—— Survivin, 非小細胞肺癌, 免疫染色, 予後不良因子

胞が染まっている症例を陽性と判断した。

統計解析

解析は JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Tokyo, Japan) を用いた。二元表に対しては Fisher 検定を行った。生存率の評価は Kaplan-Meier 生存曲線を作成した上で logrank 検定を行った。さらに Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を施行した。

結果

Survivin は報告されているとおり核および細胞質にその発現が認められた (Figure 1)。Survivin が細胞質に発現していたのは 64 例、核に発現していたものは 40 例で、どちらにも発現していたのは 36 例、どちらにも発現が認められなかったのは 32 例であった。Survivin の発現と、性別、組織型、T 因子、N 因子の間には統計学的に有意な相関は得られなかった (Fisher 検定, p 値 > 0.05)。

また p53 陽性例は 57 例であった。Survivin と p53 の発現との間には有意な相関は認められなかった (Fisher 検定, p 値 > 0.05)。

核または細胞質における Survivin の発現が予後に与

Table 1. Patient Characteristics

	n	age mean \pm SD	follow up (day) mean \pm SD
total	100	66.1 \pm 10.4	1187 \pm 539
sex			
male	71	66.8 \pm 8.9	1204 \pm 579
female	29	64.5 \pm 13.3	1145 \pm 443
histology			
adenocarcinoma	71	65.4 \pm 11.2	1219 \pm 516
squamous cell carcinoma	29	68.1 \pm 8.2	1106 \pm 603
pT			
T1	43	67.7 \pm 10.9	1268 \pm 545
T2	41	65.1 \pm 9.6	1198 \pm 495
T3	6	67.0 \pm 13.4	1097 \pm 739
T4	10	63.0 \pm 10.1	842 \pm 527
pN			
N0	66	68.2 \pm 9.3	1257 \pm 524
N1	13	60.7 \pm 11.8	910 \pm 511
N2	21	63.2 \pm 11.4	1137 \pm 579
pStage			
IA	33	69.4 \pm 9.3	1308 \pm 555
IB	25	66.0 \pm 9.2	1224 \pm 469
IIA	5	54.6 \pm 15.0	830 \pm 499
IIB	11	67.9 \pm 9.0	1033 \pm 623
IIIA	16	64.1 \pm 11.7	1311 \pm 495
IIIB	10	63.0 \pm 10.1	843 \pm 527

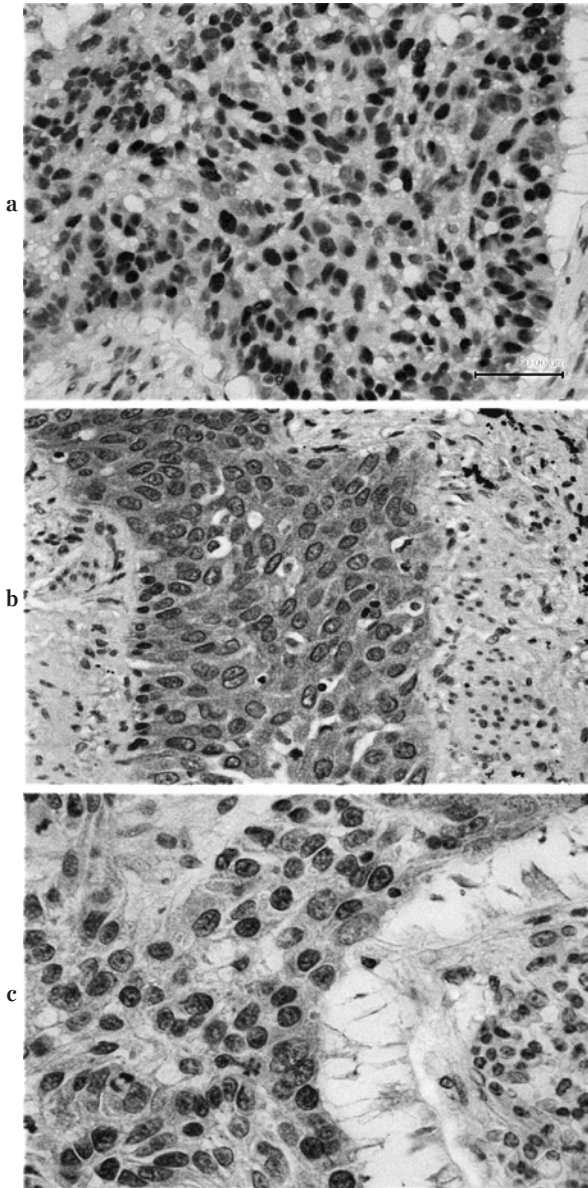


Figure 1. a) Expression of survivin in nucleus. b) Expression of survivin in cytoplasm. c) Expression of survivin in nucleus and cytoplasm.

える影響を検討する目的で、それぞれ Survivin 陽性群、陰性群に分けて Kaplan-Meier 生存曲線を作成したところ、核における発現において、5年生存率が Survivin 陽性群で 60.4% なのに対し陰性群では 80.4% であり、陽性群では陰性群に比べて予後不良な傾向を示すが、統計学的有意差は得られなかった (logrank 検定, p 値 = 0.25) (Figure 2, 3).

年齢, 性別, 組織型, N 因子, 核および細胞質における Survivin の発現, p53 を共変量として Cox の比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行ったところ, N 因子陽性群, Survivin 核陽性群はそれぞれハザード比 2.46

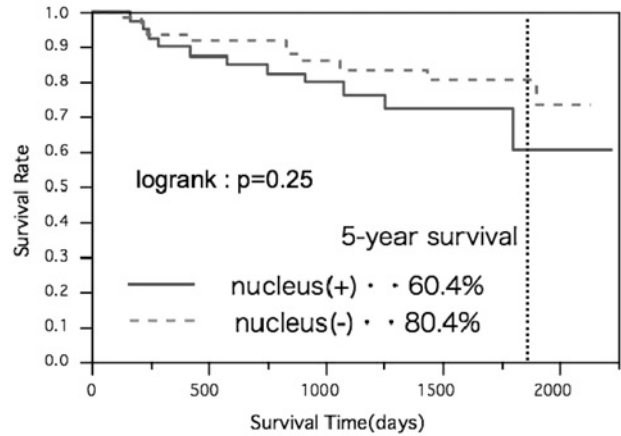


Figure 2. Survival curves of non-small-cell lung cancer patients stratified according to expression of survivin in the nucleus. The survival curve of case with survivin in cell nuclei is lower than that of survivin negative.

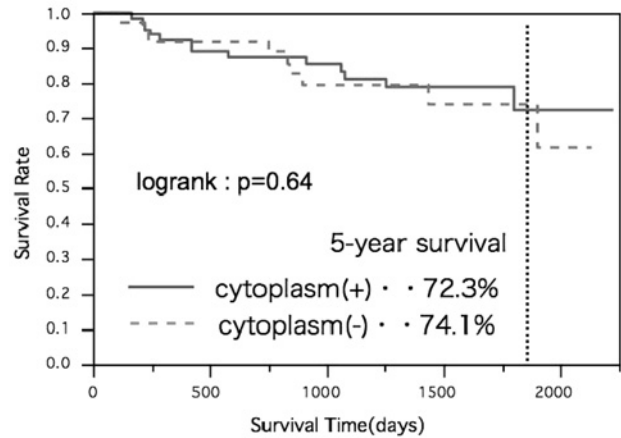


Figure 3. Survival curves of non-small-cell lung cancer patients stratified according to expression of survivin in cytoplasm.

{1.53, 4.14} p 値 = 0.0002, 1.73 {1.04, 2.97} p 値 = 0.036 となり, 独立した予後不良因子であることが認められた (Table 2).

考 察

Survivin は 17q25 に存在する遺伝子でコードされており, 142 個のアミノ酸からなる 16.5 kDa のタンパク質である. 1997 年 Ambrosini らによって最初に報告されている.¹ Survivin は inhibitor of apoptosis (IAP) family に属しており, ヒトにおいて IAP は現在までに Survivin を含めて 8 つのタンパク質が報告されている. IAP は内部に約 70 のアミノ酸からなる baculoviral IAP repeat (BIR) domain を 1 つ以上有しており, これが抗アポトー

Table 2. Multivariate Analysis Using the Cox Proportional Hazards Model Determined by Age, Sex, Histology, N Factor, Expression of Survivin in Nucleus and Cytoplasm, and Expression of p53

	Hazard ratio	P value
Age	0.99 [0.95, 1.03]	0.653
Sex (Female)	0.69 [0.36, 1.18]	0.185
Histology (adenocarcinoma)	0.89 [0.52, 1.60]	0.684
pN (+)	2.46 [1.53, 4.14]	0.0002
Survivin in nucleus (+)	1.73 [1.04, 2.97]	0.036
Survivin in cytoplasm (+)	0.84 [0.49, 1.41]	0.513
p53 (+)	0.70 [0.41, 1.18]	0.180

シス作用を発揮していると考えられている。Survivin は BIR を 1 つしか持たない最小の IAP である。¹⁵

胎生期の細胞では Survivin は高発現し、その生育に関与しているが、成人の正常細胞では一部を除き Survivin の発現はほとんど認められない。一方食道癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、肺非小細胞肺癌などの各種癌細胞やリンパ腫などでは Survivin が高率に発現しており、Survivin の発癌への影響が示唆されている。免疫染色を用いたこれまでの報告では、Survivin は細胞内で細胞質および核に存在しており、今回の我々の免疫染色でも同様の結果が得られている。核における Survivin の発現と予後の関係はこれまででも多数の報告例があるが、癌の種類によって予後へ与える影響は異なっている。食道癌、³ 卵巣癌、¹⁶ 非小細胞肺癌⁷ などでは核 Survivin 陽性例に予後不良な傾向が認められており、胃癌、¹⁷ 膀胱癌、¹⁸ 乳癌² などではむしろ予後良好であるという報告も認められる。一方細胞質における Survivin の発現と予後との関係の報告は少なく、細胞質における発現は予後へ影響を与えていないと考えられている。¹⁹ 我々の検討では、核陽性例は生存曲線上では統計学的有意差はみられなかったが、予後不良な傾向であることが示唆された。また、多変量解析では核陽性例が独立した予後不良因子であることが認められた。Survivin 発現の有無のみで生存率の差をみる単変量解析で有意差が出ず、多変量解析で有意差が出たのは、単変量解析では予後に強く影響を与えている N 因子が交絡因子として働いたためと考えられる。細胞質陽性例は生存曲線上でも多変量解析でも予後への影響は認められなかった。

分子レベルにおいて Survivin は caspase-3、-7 を直接阻害することによって抗アポトーシス作用を発揮するが、^{13,20} それ以外にもアポトーシスに関連する他の細胞内タンパク質と相互に作用し、間接的にアポトーシスを抑制していると考えられている。癌抑制作用を持つ p53 は Survivin 遺伝子の転写を抑制し、タンパク質の発現を

制御している。²¹ p53 陽性細胞では Survivin の発現が抑制されていると予想されたが、今回の結果では両者に有意な相関は認められなかった。

Survivin にはこれまでに少なくとも 5 つの splice variants が存在していることが報告されている。Survivin, Survivin-deltaEx3, Survivin-2B, Survivin-3B, Survivin-2alpha の 5 つである。^{20,22} これらの variants の中には mRNA の splicing によって、抗アポトーシス作用の中心的役割を担っていると考えられている BIR 領域の構造が変化しているものも存在している。Survivin, Survivin-3B は BIR 構造が保たれており抗アポトーシス作用を有している。Survivin-deltaEx3 は BIR 構造が変化しているものの、抗アポトーシス作用は失われていないと考えられている。一方 Survivin-2B, Survivin-2alpha は BIR 構造が保たれておらず抗アポトーシス作用を失っていると考えられている。^{20,22-24} また 5 つの variants は N 末端の構造は全て同じであるが、C 末端の構造は互いに異なっている。この C 末端の構造の違いによりそれぞれの variants の発現部位が異なっている可能性を示す報告もある。²⁴⁻²⁷ 今回我々が使用した一次抗体がどの variants を染色しているのかは不明であり、variants 毎の予後に与える影響を免疫組織化学的に判断するのは限界があると思われる。今後は RT-PCR を行い variants 毎の細胞内 mRNA の発現量を測定し、それらの予後に与える影響を解析する必要があると思われる。

おわりに

今回我々は非小細胞肺癌における抗アポトーシスタンパク Survivin の発現頻度を免疫染色を用いて検討した結果、Survivin 核陽性群は独立した予後不良因子であることが判明した。

REFERENCES

1. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3:917-921.
2. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer*. 2003;88:1077-1083.
3. Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003;88:115-119.
4. Mega S, Miyamoto M, Li L, Kadoya M, Takahashi R, Hase R, et al. Immunohistochemical analysis of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2006;19:355-359.
5. Moon WS, Tarnawski AS. Nuclear translocation of survivin in hepatocellular carcinoma: a key to cancer cell growth? *Hum Pathol*. 2003;34:1119-1126.

6. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000;31:1080-1085.
7. Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, et al. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:537-540.
8. Tanabe H, Yagihashi A, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S, Watanabe N. Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004; 46:299-304.
9. Nakano J, Huang CL, Liu D, Ueno M, Sumitomo S, Yokomise H. Survivin gene expression is negatively regulated by the p53 tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2005;27:1215-1221.
10. Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2004;15: 1654-1660.
11. Shinohara ET, Gonzalez A, Massion PP, Chen H, Li M, Freyer AS, et al. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2005;103:1685-1692.
12. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer*. 2005;114:509-512.
13. Akyürek N, Memiş L, Ekinci O, Köktürk N, Öztürk C. Survivin expression in pre-invasive lesions and non-small cell lung carcinoma. *Virchows Arch*. 2006;449:164-170.
14. Tsuji N, Furuse K, Asanuma K, Furuya M, Kondoh K, Kamagata C, et al. Mutations of the p53 gene and loss of heterozygosity at chromosome 17p13.1 are associated with increased survivin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;87:23-31.
15. Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol*. 2003;197:8-29.
16. Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, Lawson D, Santoianni R. Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis. *Mod Pathol*. 2003;16:574-583.
17. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett*. 2001;163:109-116.
18. Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, McGregor JA, et al. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10:134-138.
19. Atikcan S, Unsal E, Demirag F, Köksal D, Yilmaz A. Correlation between survivin expression and prognosis in non-small cell lung cancer. *Respir Med*. 2006;100:2220-2226.
20. Végran F, Boidot R, Oudin C, Defrain C, Rebutti M, Lizard-Nacol S. Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene*. 2007;26:290-297.
21. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*. 2002;277:3247-3257.
22. Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer*. 2005;4:11.
23. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. *Int J Oncol*. 2005;27:1151-1157.
24. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res*. 1999;59:6097-6102.
25. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, et al. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ*. 2002;9:1334-1342.
26. Bria E, Visca P, Novelli F, Casini B, Diodoro MG, Perrone-Donnorso R, et al. Nuclear and cytoplasmic cellular distribution of survivin as survival predictor in resected non-small-cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2008; 34:593-598.
27. Rodríguez JA, Span SW, Ferreira CG, Kruyt FA, Giaccone G. CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin. *Exp Cell Res*. 2002;275:44-53.