

## 肺非小細胞癌における接着分子の発現と 骨髓液中サイトケラチン 18 陽性細胞の検出との関連

犬塚 学 四十坊 典 晴 平 澤 路 生  
札幌医科大学医学部内科学第3講座 (主任 阿部庄作 教授)

Immunocytological Detection of Cytokeratin 18-positive Cells  
in Bone Marrow Aspirates in Non-small Cell Lung Cancer  
with Reference to Adhesion Molecule Expression

Manabu INUZUKA, Noriharu SHIJUBO, Michio HIRASAWA  
*Third Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine*  
(Chief : Prof. S. ABE)

**ABSTRACT** In order to detect cancer cells in the bloodstream, we analyzed cytokeratin 18-positive cells in bone marrow aspirates obtained from 64 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) (adenocarcinoma 50, squamous cell carcinoma 10, large cell carcinoma 4) by immunocytochemical method using CK2 (monoclonal antibody to cytokeratin 18). The immunohistochemical expression of adhesion molecules was studied in 35 resected NSCLC tissues. Cytokeratin 18-positive cells in bone marrow aspirates were detected in 34 of the 64 patients. The detection rate of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow aspirates correlated with the grade of T factor, and that rate was significantly high in patients with nodal or distant metastasis when compared with patients without the above metastases. The  $\beta_1$  integrin subunit was found in almost all NSCLC specimens, and  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_v$  and  $\beta_4$  subunits, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and CD44 were frequently expressed and a minor population of tumors had expression of  $\alpha_1$  and  $\alpha_4$  subunits. The detection rate of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow aspirates of the  $\alpha_2$  subunit positive group (11/15) was significantly higher than that of the  $\alpha_2$  subunit negative group (5/20) ( $p < 0.01$ ). Regarding the other adhesion molecules examined in this study, there was no significant difference in detection rates of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow between the adhesion molecule positive and negative groups.

Integrins play important roles as adhesion molecules in the cell to cell and to extracellular matrix, and facilitate steps of migration from cancer nest and attachment to vascular endothelial cells in metastasis formation.  $\alpha_2\beta_1$  integrin may contribute to metastatic release from a primary site and migration into the bloodstream in NSCLC.

(Received December 2, 1996 and accepted December 16, 1996)

**Key words:** Non-small cell lung cancer, Hematogeneous metastasis, Cytokeratin 18, Integrin, Adhesion molecules

### 1 緒 言

原発性肺癌は現在も予後不良な疾患であり、病期I

期の手術例においても5年生存率は65%と報告され<sup>1)</sup>、術後に遠隔転移による再発がしばしば認められる。この場合、手術の時点で既に微小な潜在性の遠隔転移を

形成している可能性が高いと考えられるが、現在の画像診断のレベルでは  $10^8$  個以下の細胞数の転移巣は臨床的に検出困難であり<sup>2)</sup>、微小転移巣を形成している頻度は不明である。

担癌状態における血行性転移の成立機序に関しては分子生物学的解析の進歩にもかかわらず、いまだ不明な点が多い。最近の癌の浸潤、転移能に関する研究から、癌組織における血管新生<sup>3)</sup>、癌細胞上に発現する接着分子<sup>4-8)</sup>、癌細胞の matrix metalloproteinase をはじめとする蛋白分解酵素<sup>9)</sup> および標的臓器における血管内皮上に誘導される接着分子<sup>4-7)</sup> の重要性が注目されている。我々は肺癌細胞株を用い、肺癌細胞上に発現するインテグリンが細胞外マトリックスおよび血管内皮細胞との接着に重要な役割を果たしていることを報告した<sup>8)</sup>。この結果は標的臓器における血管内皮細胞への癌細胞の接着および侵入の段階においてインテグリンが重要であることを示唆している。

最近、上皮細胞に特異的なモノクローナル抗体を用いて癌患者の骨髄中に存在する腫瘍細胞を細胞単位で検出できるとの報告がなされ<sup>10-15)</sup>、臨床的に遠隔転移が認められない症例においても、すでに原発巣から癌細胞が遊離、遊走し、血管内へ侵入している過程を検出し得るとされている。

本研究では肺非小細胞癌の骨髄中における癌細胞の検出を上皮細胞に特異的なサイトケラチン 18 に対するモノクローナル抗体を用いて行い、さらに、原発巣からの癌細胞の遊離、遊走および癌細胞の血管内への侵入までの段階において、いかなる接着分子の関与が重要であるかを明らかにするため、肺非小細胞癌におけるインテグリンを中心とした接着分子の発現と骨髄液中の癌細胞の検出頻度との関連について検討した。

## 2 対象, 方法

### 2.1 対 象

対象は平成 5 年 10 月から平成 8 年 8 月まで当科に入院加療した原発性肺非小細胞癌患者 64 例 (45 歳-74 歳, 平均 55.7 歳) である。組織型は腺癌 50 例, 扁平上皮癌 10 例, 大細胞癌 4 例であった (Table 1)。臨床病期は TNM 分類に従い, 胸部 X 線写真, 気管支鏡, 胸部, 頭部及び腹部 CT, 骨シンチグラムにより決定した。臨床病期 I 期 31 例, II 期 2 例, IIIA 期 16 例, IIIB 期 6 例, IV 期 9 例であった。また肺非小細胞癌患者 64 例中 35 例に対して外科的切除術が施行された。病理学的病期は I 期 22 例, II 期 1 例, IIIA 期 11 例, IIIB 期 1 例であった。

## 2.2 方 法

### 2.2.1 単クローン抗体

免疫組織学的及び免疫細胞学的染色に用いた単クローン抗体および入手先を Table 2 に示す。インテグリンは細胞表面に存在する膜貫通型糖蛋白質で  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖により形成されるヘテロダイマーで、インテグリンスーパーファミリーに分類される接着分子であり、いままでに 16 個の  $\alpha$  鎖と 8 個の  $\beta$  鎖の存在が明らかになっており、少なくとも 20 種のヘテロダイマーが知られている<sup>4-6,16)</sup>。今回の検討では、 $\beta$  インテグリンに関しては 2 種 ( $\beta_1$  と  $\beta_4$ )、 $\alpha$  インテグリンに関しては 7 種 ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  と  $\alpha_V$ ) の抗体を使用した<sup>17-25)</sup>。Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) に関しては札幌医科大学医学部第 1 内科今井浩三教授より供与された HA58 抗体を使用し<sup>26)</sup>、CD44 に対する単クローン抗体 BU52 は Binding Site 社 (Birmingham England) より購入した。CD44H (標準型) を認識することが報告されている<sup>27)</sup>。

Table 1 Characteristics of patients

	No. of patients
sex	
male	40
female	24
tumor histology	
adenocarcinoma	50
squamous cell carcinoma	10
large cell carcinoma	4
tumor extension	
T1	23
T2	22
T3	12
T4	7
lymph-node metastasis	
N0	39
N1	4
N2	15
N3	6
distant metastasis	
M0	55
M1	9
total number	64

### 2・2・2 検体採取

原発性肺非小細胞癌患者 64 例に対し、臨床診断確定時に骨髄穿刺を施行した。勝沼式骨髄穿刺針を用いて患者の腸骨稜より骨髄液を 5 ml 吸引採取した。従来報告した方法に準じて<sup>28)</sup>、Ficoll-Conray 液 (比重 1.081) を用いて、1500 rpm 20 分間遠心し有核細胞を分離した。0.01 M 燐酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で 2 回洗浄、血球計算板で細胞数を算定し、1 スライドガラス当り  $8 \times 10^4$  個の細胞になるようにスライドガラス標本を作製した。16 時間室温にて乾燥、染色まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。骨髄穿刺については全例患者の承諾を得て施行した。

骨髄穿刺を行った 64 例中 35 例に外科的腫瘍切除術が施行された。切除された肺癌組織の最大割面部を病理学的検索のため 10%ホルマリン液で固定し、同時に一部を AMeX 固定<sup>29)</sup> した。すなわち、組織片を  $4^\circ\text{C}$  のアセトンに浸漬し、それを  $-20^\circ\text{C}$  で 16 時間固定、次に  $4^\circ\text{C}$  のアセトン 15 分間、室温のアセトンで 15 分間脱水した。その後室温の安息香酸メチルで 15 分間 2 回、室温のキシレンで 15 分間 2 回洗浄し、パラフィン包埋後切片標本を作製した。

### 2・2・3 免疫細胞学的手法による検討

骨髄穿刺液標本を用い、抗サイトケラチン 18 単クローン抗体 CK2 ( $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 1 次抗体とし、アルカリフォスファターゼ複合体、抗アルカリフォスファターゼ (APAAP) 抗体により腫瘍細胞の検出を行った。骨髄穿刺液標本は室温で 1 次抗体を 30 分間反応させ、Tris-HCl 緩衝液を用いて、5 分間 2 回洗浄、2 次抗体として抗マウスビオチン化抗体を室温で 30 分間反応さ



**Fig. 1** Immunocytochemistry of cytokeratin 18 in bone marrow of a patient with non-small cell lung cancer (NSCLC). Arrow shows a cytokeratin-18 positive cell. Magnification  $\times 1000$ .

せた。APAAP 抗体を使用し、ニューフクシン基質により発色した。正常マウス IgG を陰性コントロールとして使用した場合、有意な反応は認められなかった。サイトケラチン 18 陽性細胞の評価は各症例について、5 スライドガラス (総細胞数、 $4 \times 10^5$ ) で行い、細胞質が赤紫色に染色された場合を陽性とし (Fig. 1)、陽性細胞が 1 個でもあれば、骨髄液中にサイトケラチン 18 陽性細胞が検出されたと判定した。

### 2・2・4 免疫組織学的手法による検討

AMeX 固定し、パラフィン包埋したブロックを用いて作製した切片標本をキシレンで脱パラフィンした後、インテグリン、ICAM-1 および CD44 に対する単クローン抗体 (Table 2) を 1 次抗体として、室温で 30 分間反応させ、PBS で 5 分間 3 回洗浄、次に抗マウスまた

**Table 2** Monoclonal antibodies used for immunohistological and immunocytological stainings

	Mo Ab	source
integrin $\alpha_1$ subunit	TS2/7	Dr. Martin E. Hemler <sup>17)</sup>
integrin $\alpha_2$ subunit	12F1	Dr. Virgil Wood <sup>18)</sup>
integrin $\alpha_3$ subunit	J134	Dr. Tony Albino <sup>19)</sup>
integrin $\alpha_4$ subunit	8F2	Dr. Martin Hemler <sup>20)</sup>
integrin $\alpha_5$ subunit	GIIG2	Dr. Caroline Damsky <sup>21)</sup>
integrin $\alpha_6$ subunit	GoH3	Dr. Arnoud Sonnenberg <sup>22)</sup>
integrin $\alpha_v$ subunit	VNR147	Dr. Tony Hunter <sup>23)</sup>
integrin $\beta_1$ subunit	AJ-2	Dr. Tony Albino <sup>24)</sup>
integrin $\beta_4$ subunit	439-9B	Dr. Stephen J. Kennel <sup>25)</sup>
ICAM-1	HA58	Dr. Kozoh Imai <sup>26)</sup>
CD44	Bu52	Binding Site, Birmingham, England
cytokeratin 18	CK2	Boehringer Mannheim, Tutzing, Germany

は抗ラットビオチン化抗体を2次抗体として、室温で30分間反応させ、PBSで5分間3回洗浄した。次いで、ABC法により免疫組織化学的染色を行った。ABC試薬 (Vecstastain ABC kit, Burlingam CA, USA) を室温で30分間反応させた後、0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)および0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色した。核染色はヘマトキシレンで行った。また、正常マウスまたはラットIgGを陰性対照抗体として用いた場合、有意な反応は認められなかった。発現の判定は以下の基準を設けて判定した。すなわち、染色強度を0=染色されず、1=弱、2=中等度、3=強、の4段階のスコアに、発現陽性細胞の割合を0=発現陽性細胞10%未満、1=10-29%、2=30-59%、3=60%以上の4段階のスコアに分類し、両因子のスコアの和が4以上の場合、発現陽性とした。

### 2.3 統計処理

統計学的有意性の検討は $\chi^2$ 検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

## 3 結 果

### 3.1 骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞に関する検討

#### 3.1.1 骨髄液におけるサイトケラチン18陽性細胞の出現数

肺非小細胞癌患者64例中34例(53.1%)で、 $4 \times 10^5$ 個の骨髄単核細胞中にサイトケラチン18陽性細胞を1-19個認めた。サイトケラチン18陽性細胞は孤立散在性でcluster形成を示さなかった。骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞を1-3個認めた患者が15例、4-6個認めた患者が9例、7個以上認めた患者が10例であった。男性では40例中21例(52.5%)、女性では24例中12例(50%)にサイトケラチン18陽性細胞を認めたと有意な性差は認めなかった (Table 3)。

#### 3.1.2 組織型別サイトケラチン18陽性細胞の検出率

組織型別に検討すると、腺癌では50例中26例(52.0%)、扁平上皮癌で10例中6例(60.0%)、大細胞癌で4例中2例(50.0%)に骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞が検出された (Table 3)。組織型別によるサイトケラチン18陽性細胞の検出頻度に有意差を認めなかった。

#### 3.1.3 臨床病期別サイトケラチン18陽性細胞の検出率

骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率と腫瘍の進展度、リンパ節及び遠隔転移の有無との関係を

検討した。T因子では T1症例23例中10例(43.5%)、T2症例22例中8例(36.4%)、T3症例12例中9例(75.0%)、T4症例7例中7例(100%)に骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞が検出された。骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞が検出される頻度はT因子の進展と共に高率となる傾向を認めた。リンパ節転移を認めないN0群では39例中16例(41.0%)に、N1群では4例中3例(75.0%)、N2群では15例中11例(73.3%)、N3群では6例中4例(66.7%)で、骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞が検出された。リンパ節転移を認めるN1-3群では25例中18例(72.0%)においてサイトケラチン18陽性

**Table 3** Cytokeratin18-positive cells in bone marrow of patients with non-small cell lung cancer

	cytokeratin18 positive rate	
tumor histology		
adenocarcinoma	26/50	(52.0%)
squamous cell carcinoma	6/10	(60.0%)
large cell carcinoma	2/4	(50.0%)
tumor extension		
T1	10/23	(43.5%)
T2	8/22	(36.4%)
T3	9/12	(75.0%)
T4	7/7	(100%)
lymph-node metastasis		
N0	16/39	(41.0%)
N1-3	18/25	(72.0%)
distant metastasis		
M0	25/55	(45.5%)
M1	9/9	(100%)
stage		
stage I	10/31	(32.3%)
stage II	1/2	(50.0%)
stage IIIA	10/16	(62.5%)
stage IIIB	4/6	(66.7%)
stage IV	9/9	(100%)
total number	34/64	(53.1%)

Values are n/total population. The values in parentheses are percentages.

stage I-IV  $p < 0.01$

stage II-IV, IIIA-IV, IIIB-IV  $p < 0.05$

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

細胞が検出され、N0群39例中16例(41.0%)に比較して、検出率は有意に高率であった( $p=0.015$ )。臨床的に遠隔転移を認めないM0群では55例中25例(45.5%)にサイトケラチン18陽性細胞を認めたが、遠隔転移を認めるM1群では9例中9例(100%)に陽性であり、M1群で有意にサイトケラチン18陽性細胞の検出率が高かった( $p=0.0024$ )。

病期別では病期がI期31例中10例(32.3%)、II期2例中1例(50%)、III期22例中14例(63.6%) (IIIA期16例中10例(62.5%)、IIIB期6例中4例(66.7%))、IV期9例中9例(100%)の骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞を検出した。病期の進行に従い、骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率は高くなり、病期I期に比較し、病期III期および病期IV期で有意に高かった(それぞれ $p=0.024$ と $p=0.00034$ )。

### 3.2 原発性肺非小細胞癌における接着分子の発現

#### 3.2.1 インテグリン、ICAM-1およびCD44の発現および組織型別検討

外科的腫瘍切除術が施行された原発性肺非小細胞癌35例におけるインテグリン、ICAM-1およびCD44の発現を免疫組織化学的に検討した。Fig. 2に示すようにいずれの接着分子も細胞膜に発現していた。 $\beta$ インテグリン分子に関しては、 $\beta_1$ 分子は35例中33例(94.3%)に発現を認め、 $\beta_4$ 分子は35例中14例(40.0%)に発現を認めた。 $\alpha$ インテグリンに関しては、 $\alpha_1$ 分子は35例中5例(14.3%)、 $\alpha_2$ 分子は35例中15例(42.9%)、 $\alpha_3$ 分子は35例中24例(68.6%)、 $\alpha_4$ 分子は35例中0例(0%)、 $\alpha_5$ 分子は35例中18例(51.4%)、 $\alpha_6$ 分子は35例中25例(71.4%)、 $\alpha_v$ 分子は35例中25例(71.4%)に発現を認めた。 $\alpha_2$ 分子、 $\alpha_3$ 分子、 $\alpha_5$ 分子、 $\alpha_6$ 分子と $\alpha_v$ 分子の発現が高率であったが、 $\alpha_1$ 分子の発現は低率であり、 $\alpha_4$ 分子の発現は認めなかった。ICAM-1分子は35例中22例(62.9%)で発現を認め、CD44分子は35例中23例(65.7%)で発現を認めた。各組織型別の接着分子の発現についてはFig. 3に示した。扁平上皮癌および大細胞癌の症例数は少ないが、腺癌、扁平上皮癌および大細胞癌の各組織型では、検討した接着分子の発現について有意差を認めなかった。

#### 3.2.2 接着分子の発現と骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率との関連

癌細胞の接着分子の発現と骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率との関連を検討した(Fig. 4)。その結果、 $\alpha_2$ 分子の発現している肺非小細胞癌で骨髄

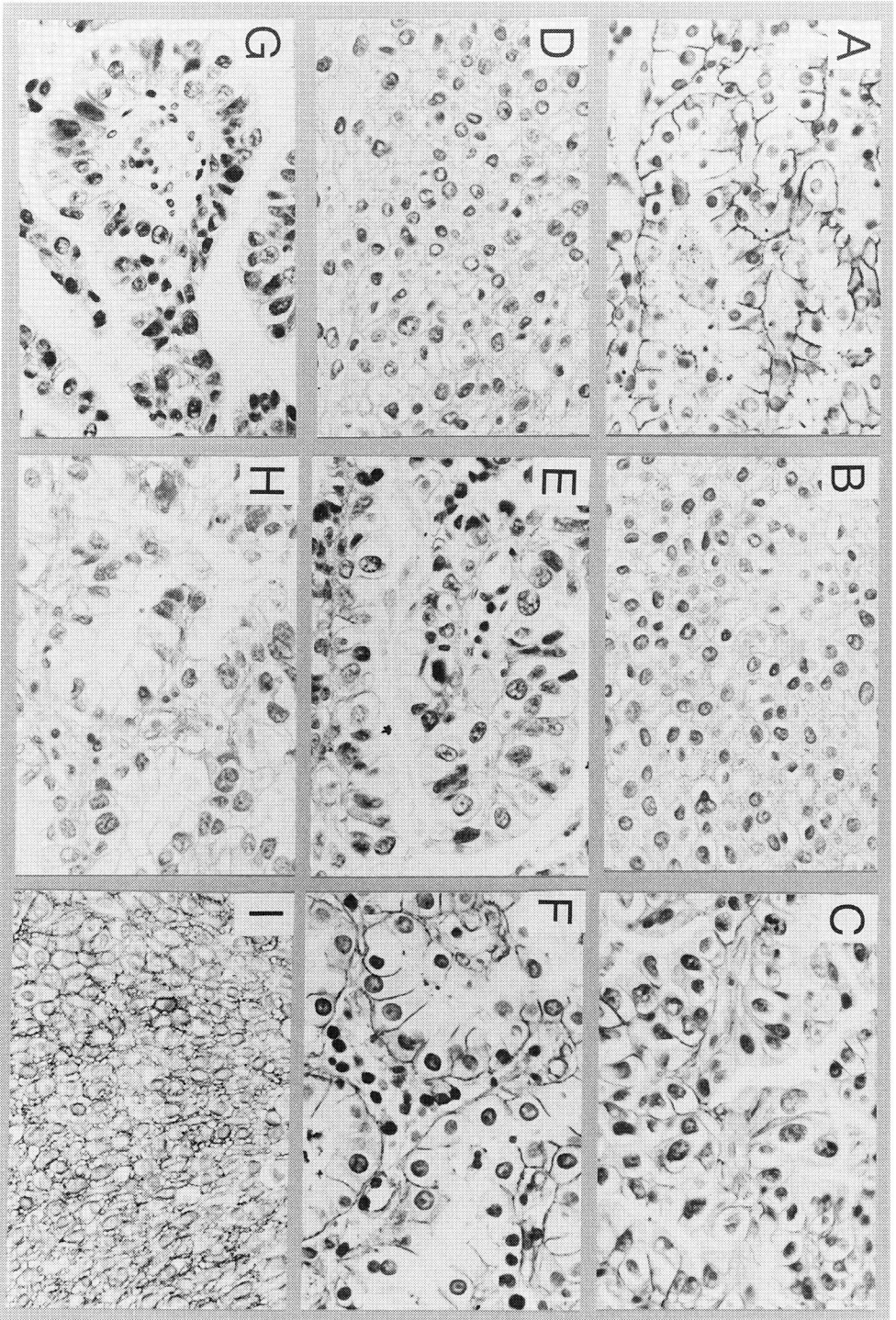
液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出は15例中11例(73.3%)に認められた。 $\alpha_2$ 分子の発現していない肺非小細胞癌における骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率(20例中5例(25.0%))に比較し、有意に骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率が高かった( $p=0.0045$ )。しかし、その他の接着分子の発現と骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞の検出率に有意な関連を認めなかった。

## 4 考 察

サイトケラチンは酸性のI型と塩基性のII型に垂分類され、サイトケラチン1から8はI型、サイトケラチン9から20はII型とされている<sup>30</sup>。サイトケラチンはいずれも上皮細胞に特異的であるが、特にサイトケラチン18は上皮性腫瘍のほぼ全例で陽性になると報告されており<sup>13,30</sup>、さらに、サイトケラチン18は血液細胞など間葉系細胞では発現しておらず<sup>15</sup>、また、非担癌患者において骨髄液中のサイトケラチン18陽性細胞を検索した場合、サイトケラチン18陽性細胞の検出率は1%以下と報告されている<sup>15</sup>。担癌患者の骨髄中の腫瘍細胞を細胞単位で検出することに利用されている<sup>10-15</sup>。

今回の検討では、原発性肺非小細胞癌患者64例中34例(53.1%)の骨髄液中に肺癌細胞と考えられるサイトケラチン18陽性細胞が検出された。外科的腫瘍切除術が施行された症例でも35例中16例(45.7%)に骨髄液中でサイトケラチン18陽性細胞が検出された。これまでの報告では肺非小細胞癌手術症例の18.4%から59.3%で骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞を検出されている<sup>13-15</sup>。本研究ではサイトケラチン18陽性細胞の検出率とT因子の進展、リンパ節転移、遠隔転移の有無とで有意な相関を示した。病期ではI期で32.3%(31例中10例)、II期で50.0%(2例中1例)、III期で63.6%(22例中14例)、IV期で100%(9例中9例)に骨髄液中でサイトケラチン18陽性細胞が検出され、病期の進行とともに骨髄中の検出率が高くなった。この結果はPantel *et al*の報告<sup>13,15</sup>と一致している。

病期I期においてもすでに32.3%の症例で骨髄液中にサイトケラチン18陽性細胞が検出され、血行性転移形成の過程のうち血管内侵入まで進行していることが明らかになった。しかし、サイトケラチン18を用いた骨髄中の肺癌細胞の検出の精度について、Pantel *et al*<sup>15</sup>は肺非小細胞癌66例について検討し、サイトケラチン18陽性細胞を認めなかった54例中19例(35%)に再発を認めたと報告している。実際には微小転移が



**Fig. 2** Immunohistochemistry of adhesion molecules of NSCLC ( $\times 200$ ). (A) integrin  $\alpha_2$  subunit, (B) integrin  $\alpha_3$  subunit, (C) integrin  $\alpha_5$  subunit, (D) integrin  $\alpha_6$  subunit, (E) integrin  $\alpha_v$  subunit, (F) integrin  $\beta_1$  subunit, (G) integrin  $\beta_2$  subunit, (H) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and (I) CD44. These adhesion molecules are found on the cellular surface of NSCLC cells.

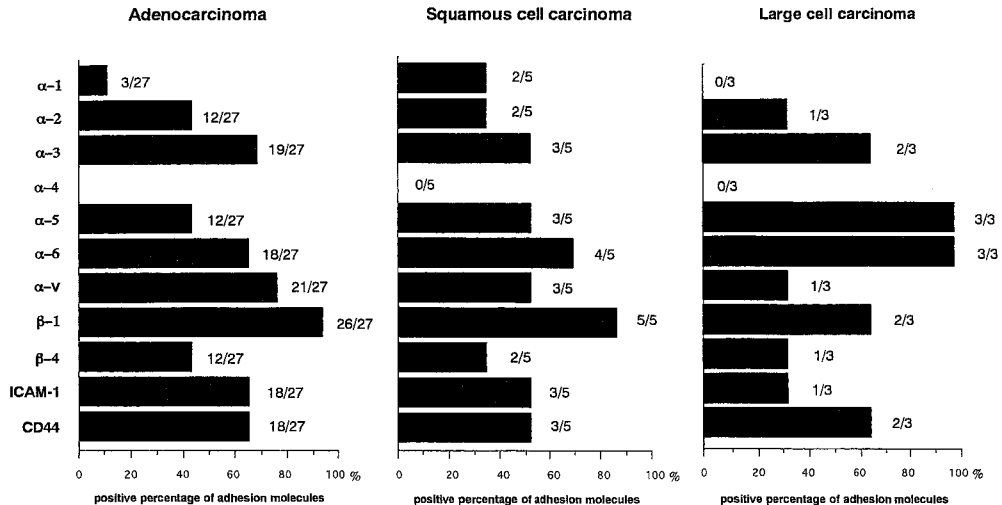


Fig. 3 Expression of adhesion molecules in NSCLC. The  $\beta_1$  integrin subunit is found in almost all NSCLC specimens, and  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_V$  and  $\beta_4$  subunits, ICAM-1 and CD44 are frequently expressed and a minor population of tumors had expression of  $\alpha_1$  and  $\alpha_4$  subunits.

形成されているにもかかわらず、サイトケラチン 18 陽性細胞を検出し得なかった症例が 35% 存在したことを示している。また、骨髄液中にサイトケラチン 18 陽性細胞を認めた 12 例中 3 例 (25%) で再発を認めていないと報告している。これは骨髄液中にサイトケラチン 18 陽性細胞が存在する場合でも宿主の免疫担当細胞等の作用により転移巣が形成するとは限らないことを示しており、骨髄液中にサイトケラチン 18 陽性細胞が存在しても、その 25% は再発を認めていないということである。Pantel *et al* の結果に基づいて計算すると、病期 I 期でも、その 60-70% に腫瘍細胞が血管内に侵入し、血流中に存在していると考えられる。

インテグリンは細胞表面に存在する膜貫通型糖蛋白質で  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖により形成されるヘテロダイマーで、インテグリンスーパーファミリーに分類される接着分子である<sup>4-7,16</sup>。本研究では  $\alpha$  鎖 7 種と  $\beta$  鎖 2 種の抗体を用い、免疫組織化学的検討を行った。インテグリンの発現は  $\beta_1$  分子の発現はほぼ全例に認められ、 $\beta_4$  分子は 40% で発現を認めた。 $\beta$  分子の発現率は従来の報告と同様である。 $\alpha$  インテグリンに関しては、 $\alpha_2$  分子 (42.9%)、 $\alpha_3$  分子 (68.6%)、 $\alpha_5$  分子 (51.4%)、 $\alpha_6$  分子 (71.4%) および  $\alpha_V$  分子 (71.4%) が高率に発現しており、 $\alpha_1$  分子 (14.3%) と  $\alpha_4$  分子 (0%) の発現は極めて低率であった。我々が以前、肺癌細胞培養株で検討したインテグリン分子の発現パターンの成績と同様であった<sup>8</sup>。

ICAM-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり、tumor necrosis factor- $\alpha$  や interleukin-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインにより誘導されることが報告されている<sup>31</sup>。肺癌における ICAM-1 の発現に関する報告はほとんど見られず、その発現率は明らかになっていないが、腎癌で 82.1%<sup>32</sup>、膀胱癌で 38.6%<sup>33</sup>、悪性黒色腫で 55.2%<sup>34</sup> に発現を認めたと報告されている。今回の検討では肺非小細胞癌では 62.9% に発現を認めている。悪性黒色種において、ICAM-1 の発現と病期の進行とに相関があり、ICAM-1 の発現が原発巣からの癌細胞の遊離、遊走に重要であると推定している<sup>34</sup>。肺非小細胞癌において、ICAM-1 の発現の有無と骨髄中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率とに有意な関連が認められなかった。ICAM-1 は肺癌細胞の遊離、遊走、血管内侵入に関連している可能性は低いと考えられた。

CD44 分子はコラーゲン、フィブロネクチンやヒアルロン酸などをリガンドとする膜貫通型の糖蛋白質である<sup>5,6</sup>。肺癌における CD44 分子の意義は明らかではないが、非小細胞肺癌における発現は Penno *et al* の報告<sup>35</sup> と同様に我々の検討でも 65.7% と高率に認めている。CD44 分子の発現の有無により骨髄中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率に差が認められなかった。CD44 分子は癌細胞の原発巣からの遊離、遊走に重要性が低いと考えられた。

悪性腫瘍においては原発巣からの癌細胞の遊離、遊

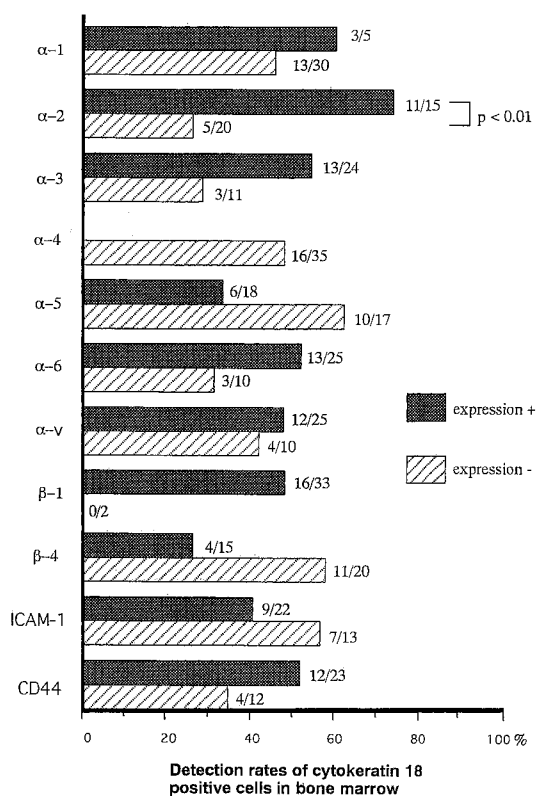


Fig. 4 Relationship between detection rates of cytokeratin-18 positive cells and expression of adhesion molecules. The detection rate of cytokeratin18-positive cells in bone marrow aspirates of the  $\alpha_2$  subunit positive group is significantly higher than that of the  $\alpha_2$  subunit negative group ( $p < 0.01$ ). Regarding the other adhesion molecules examined in this study, there are no significant differences in detection rates of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow between the adhesion molecule positive and negative groups.

走や転移形成における血管内皮細胞への接着に悪性腫瘍細胞上のインテグリンが重要な役割を担っていると報告されている<sup>4-8)</sup>。また、血管新生においても血管内皮細胞上のインテグリンが重要な役割を果たしており、各種抗インテグリン抗体を使用した転移抑制効果は血行性転移形成のどの段階を抑制しているかは *in vivo* の実験では判定が困難な場合が多い。本研究では、肺癌細胞が原発巣からの遊離、遊走し、血管内侵入を起こしている段階までで、いかなる接着分子が強く関連しているかを明らかにするため、骨髓液中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率と肺癌組織の接着分子の発現との関連を比較検討した。その結果、 $\alpha_2$  分子の発現が

肺癌組織にみられる場合にのみ有意に骨髓中のサイトケラチン 18 陽性細胞が高く検出されており、その他の検討した接着分子では有意差を認めなかった。 $\alpha_2$  分子は  $\beta_1$  分子とのみヘテロダイマーを形成するので、 $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの発現が肺癌細胞の原発巣からの遊離、遊走及び血管内侵入に重要な役割を果たしていることを明らかにした。肺癌における  $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの接着分子としての重要性は不明な点が多いが、骨肉腫細胞での検討では  $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの発現レベルが高いものが発現の低いものより浸潤性が強いとの報告があり<sup>36)</sup>、また転移能についてはヒト悪性黒色腫細胞において原発巣と転移巣とで  $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの発現を比較したところ転移巣において  $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの発現が多く観察されたとの報告されている<sup>37)</sup>。Chan *et al*<sup>38)</sup> は元来インテグリン  $\alpha_2$  分子を発現しないヒト横紋筋肉腫細胞にインテグリン  $\alpha_2$  分子 cDNA を遺伝子導入し  $\alpha_2$  分子を細胞表面に強制的に発現させた場合、この細胞は元の細胞と比較して、コラーゲンとラミニンに対する接着性の亢進が認められ、さらに、腫瘍の形成、増殖速度には差を認めなかったが、肺、骨、副腎、リンパ節など多くの臓器への血行性の転移能が著明に亢進したと報告している。インテグリン  $\alpha_2$  分子が癌細胞の血行性転移を促す因子であることを示唆する。本論文では肺非小細胞癌において癌細胞の血管内侵入をサイトケラチン 18 陽性細胞を検出することにより、病期 I 期においても 32.3% で肺癌細胞が血管内に侵入していることが示され、インテグリン  $\alpha_2$  分子を発現しているもので癌細胞の血管内侵入の頻度が高いことが明らかとなった。今後、サイトケラチン 18 陽性細胞を骨髓中に検出した症例および  $\alpha_2\beta_1$  インテグリンの発現を認める肺癌症例のうち何パーセントに転移形成を認めるか検討する必要がある。

## 5 ま と め

1. 肺非小細胞癌患者 64 例中 34 例で骨髓液中にサイトケラチン 18 陽性細胞が検出された。
2. 骨髓液中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率は T 分類の進展と相関を認め、リンパ節転移を認める N1-3 群では、N0 群に比較してサイトケラチン 18 陽性細胞検出率は有意に高率であった。また、遠隔転移を認めない M0 群に比較し、M1 群で有意に検出率が高かった。
3. 肺非小細胞癌のインテグリン分子の発現に関して、 $\beta_1$  分子はほぼ全例に、 $\beta_4$  分子、 $\alpha_2$  分子、 $\alpha_3$  分子、 $\alpha_5$  分子、 $\alpha_6$  分子、 $\alpha_v$  分子が高率に発現しており、 $\alpha_1$  分



子と  $\alpha_4$  分子の発現は極めて低率であった。また、ICAM-1 分子および CD44 分子の発現を高率に認めた。

4. 肺非小細胞癌における接着分子の発現と骨髓液中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率との関連を検討した結果、 $\alpha_2$  分子の発現している肺癌では発現していない肺癌に比して、有意に骨髓液中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率が高かった。しかし、その他の接着分子の発現の有無と骨髓液中のサイトケラチン 18 陽性細胞の検出率とに統計学的有意差を認めなかった。

5. 肺非小細胞癌において、 $\alpha_2\beta_1$  インテグリンが癌細胞の遊離、遊走および血管内侵入までの段階に重要であることが示された。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました札幌医科大学医学部内科学第 3 講座阿部庄作教授に深甚なる感謝の意を表します。

#### 参 考 文 献

- Naruke T, Goya T, Tsuchiya R, Suemasu K. Prognosis and survival in resected lung carcinoma based on the new international staging system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988, 96: 440-447.
- 平口悦郎, 岡安健至, 大阪喜彦, 大久保哲之, 加藤鉦之, 田辺達三. 病理病期 I 期非小細胞肺癌の術後早期再発例の検討. *日本呼吸器外科学会雑誌* 1994, 8: 2-6.
- Liotta L, Steeg P, Stetler-Stevenson SW. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991, 64: 327-336.
- Albelda S. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 4: 195-203.
- Honn K, Tang D. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metastasis Rev* 1992, 11: 353-375.
- Albelda S. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993, 68: 4-17.
- Zetter B. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993, 4: 219-229.
- Hirasawa M, Shijubo N, Uede T, Abe S. Integrin expression and ability to adhere to extracellular matrix proteins and endothelial cells in human lung cancer lines. *Br J Cancer* 1994, 70: 466-473.
- Aznavoorian S, Murphy A, Stetler-Stevenson W, Liotta L. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993, 71: 1368-1383.
- Mansi J, Berger U, Coombes R. Micrometastasis in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *BMJ* 1987, 295: 1093-1096.
- Schlimok G, Funke I, Holzmann B. Micrometastatic cancer cells in bone marrow; in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84: 8672-8676.
- Lindemann F, Schlimok G, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992, 340: 685-689.
- Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993, 53: 1027-1031.
- Passlick B, Izbicki J, Kubuschok B, Nathrath W, Thetter O, Pichlmeier U, Schweiberer L, Riethmuller G, Pantel K. Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1994, 12: 1827-1832.
- Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996, 347: 649-653.
- 松浦成昭, 高田義一. インテグリンスーパーファミリーの分類, 分子構造, 機能と各リガンド. *日本臨床* 1995, 53: 1623-1630.
- Hemler E, Sanchez-Madrid F, Flotte J, Krensky M, Burakoff J, Bhan K, Springer A, Strominger L. Glycoproteins of 210,000 and 130,000 m.w. on activated T cells: cell distribution and antigenic relation to components on resting cells and T cell lines. *J Immunol* 1984, 132: 3011-3018.
- Pischel D, Hemler E, Huang C, Blustein G, Woods L. Use of monoclonal antibody 12F1 to characterize the differentiation antigen VLA-2. *J Immunol* 1987, 138: 226-233.
- Fradet Y, Cordon-Cardo C, Thomson T, Daly E, Whitmore F, Lloyd O, Melamed R, Old J. Cell surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81: 224-228.

20. Hemler E, Huang C, Takada Y, Schwarz L, Strominger L, Clabdt L. Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* 1987, 262: 11478-11485.
21. Web Z, Tremble M, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky H. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol* 1989, 109: 877-899.
22. Sonnenberg A, Daams H, van der Valid A, Hilkiens J, Hilger J. Development of mouse mammary gland: identification of stages in differentiation of luminal and myoepithelial cells using monoclonal antibodies and polyvalent antiserum against keratin. *J Histochem Cytochem* 1986, 34: 1037-1046.
23. Vogel B, Tarone G, Giancotti F, Gailit J, Ruoslahti E. A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition ( $\alpha_v\beta_1$ ). *J Biol Chem* 1990, 265: 5934-5937.
24. Carneross G, Matles J, Bersersford R, Albino P, Houghton N, Lloyd O, Old J. Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal antibodies; identification of astrocytoma subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, 79: 5641-5645.
25. Kennel J, Foote J, Flynn M. Tumor antigen on benign adenomas and on murine lung carcinomas quantitated by a two-site monoclonal antibody assay. *Cancer Res* 1986, 46: 707-712.
26. Tsujisaki M, Imai K, Hirata H, Hanzawa Y, Masuya J, Nakano T, Sugiyama T, Matsui M, Hinoda Y, Yachi A. Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 in malignant diseases. *Clin Exp Immunol* 1991, 81: 3-8.
27. 田中良哉, 小山芳伸, 江藤澄哉編. CD44 構造と機能の多様性. 宮坂昌之監修. 接着分子ハンドブック. 東京, 秀潤社, 1994, 298-306.
28. Inoue Y, Shijubo N, Uede T. Induction of killer cells from lymphocytes in pleural effusion of advanced lung cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 1990, 81: 1012-1020.
29. Sato Y, Mukai K, Matsuno Y. The AMeX method; A multipurpose tissue-processing and paraffin-embedding method. *Am J Pathol* 1990, 136: 267-271.
30. Osborn M, Weber K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 1983, 48: 372-394.
31. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule-1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory cytokines: regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988, 141: 1665-1669.
32. Tomita Y, Nishiyama T, Watanabe H, Fujiwara M, Sato S. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on renal cell cancer. *Int J Cancer* 1990, 46: 1001-1006.
33. Tomita Y, Watanabe H, Kobayashi H, Nishiyama T, Tsuji S, Imai K, Abo T. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on transitional cell cancer. *Am J Pathol* 1993, 143: 191-198.
34. Johnson J, Stade B, Holzmann B, Schwable W, Rithmuller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 641-644.
35. Penno M, August J, Baylin S, Mabry M, Linnoila R, Lee V, Croteau D, Yang X, Rosada C. Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Res* 1994, 54: 1381-1387.
36. Languino L, Gehlsen K, Ruoslahti E, Carter W, Engvall E. Endothelial cells use  $\alpha_2\beta_1$  integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol* 1989, 109: 2455-2462.
37. Plantefaber LC, Hynes RD. Changes in integrin receptors on oncologically transformed cells. *Cell* 1989, 56: 281-290.
38. Chang BM, Matsuura N, Takada Y, Zetter BR, Hemler ME. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 1991, 251: 1600-1602.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第3講座 犬塚 学