

喫煙習慣から観た上皮内腺癌 (adenocarcinoma in situ) の 生物学的特徴についての検討

佐藤 征二郎

新潟大学大学院医歯学総合研究科
生体機能調節医学専攻呼吸循環外科学分野
(主任：土田正則教授)

**Pulmonary Adenocarcinoma in Situ is not Simply a Precursor of Invasive Tumor:
Evidence by Status of Smoking, Driver Mutations and
Receptor Tyrosine Kinase Pathway Activation**

Seijiro SATO

*Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Masanori TSUCHIDA)*

要 旨

【目的】喫煙は肺癌の主要な原因であるが、肺腺癌特に上皮内癌である AIS は非喫煙者にも多く生じる。本研究では、AIS と喫煙習慣の関連性について臨床病理学的因子、TTF-1 陽性細胞系列か否か、EGFR、KRAS 遺伝子変異、受容体チロシンキナーゼ (RTK) 経路の活性化という点から検討し、AIS の生物学的・原因論的特徴を理解することを目的とする。

【対象・方法】1995 年から 2010 年までに外科的切除を施行された 111 症例の AIS を対象とした。遺伝子変異はホルマリン固定パラフィン包埋切片より腫瘍細胞を顕微鏡下で採取した後、ゲノム DNA を抽出し nested PCR 法にて遺伝子増幅を行った。EGFR 遺伝子変異 exon 18 及び 21 に関してはダイレクトシーケンス法を用い、exon 19 及び 20 についてはフラグメント解析にて同定した。KRAS 遺伝子変異は codon 12, 13 及び 61 につきダイレクトシーケンス法にて同定した。RTK 経路は代表的な下流分子である Akt, ERK, Stat3 のリン酸化状況について免疫染色を用いて判定した。

【結果】AIS 症例は同時期に手術を施行された浸潤性肺腺癌と比較して女性と非喫煙者の割合が有意に高かった。しかし、AIS 症例のうち男性に限ってみると、75% は喫煙者であった。喫煙者の AIS と非喫煙者の AIS とでは、性別こそ差を認めたが、年齢、細胞系列マーカーである TTF-1 等の臨床病理学的因子においては違いを認めなかった。また、EGFR 遺伝子検索においては非喫煙者 71 例のうち 41 例 (58%) に変異を認めたが、喫煙者 31 例のうち 19 例 (61%) でも変異を認め喫煙習慣では違いを認めなかった。KRAS 遺伝子変異率も非喫煙者で 1.4%、喫煙者で 5.9% と、差はあったが有意ではなかった。RTK 下流発現解析では喫煙習慣に関わらず、

Reprint requests to: Seijiro SATO
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科学分野
佐藤 征二郎

p-Akt, p-ERK は 40-50% 陽性であり, p-Stat3 は 83% の陽性率であった。

【結論】非喫煙者, 喫煙者から生じる AIS の生物学的特徴は TTF-1 細胞系列を含む臨床病理学的因子, ドライバー遺伝子変異, RTK 下流シグナル経路の活性化という観点においては明らかな違いはないことが分かった。つまり, 喫煙は AIS の発がん原因ではなく, むしろ, AIS から AIS の形態を伴う浸潤性肺腺癌の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

キーワード: 上皮内腺癌, 肺腺癌, 喫煙, 遺伝子変異, 受容体チロシンキナーゼ

緒 言

肺癌は, 世界的に男性, 女性とも癌死の主要な原因の 1 つである。肺癌の約 80% は腺癌, 扁平上皮癌と大細胞癌を含む非小細胞肺癌である¹⁾。そのうち, 腺癌は最も多く認められる組織型であり, 一般的には非常に heterogeneity に富んでいる²⁾³⁾。2011 年に IASLC/ATS/ERS 合同で提唱された肺腺癌の新分類⁴⁾では, 浸潤性肺腺癌はいくつかの亜型に分けられており, 例えば, 置換性増殖優位型 (lepidic predominant), 乳頭状増殖優位型 (papillary predominant), 腺房性増殖優位型 (acinar predominant), 微小乳頭状増殖優位型 (micro-papillary predominant), 充実性増殖優位型 (solid predominant) などがある。一方, adenocarcinoma in situ (AIS, 以前は細気管支肺胞上皮癌 BAC と呼ばれていた) は腺癌の非浸潤性形態であり, 比較的同一の性質があり, 浸潤性肺腺癌の前癌状態と位置付けられるようになった。そこで今回われわれは, 喫煙習慣と遺伝子変異そして受容体チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase: RTK) シグナル経路の活性化状況という観点から AIS の生物学的特徴を検討しようと考えた。

喫煙は肺癌において最も重要な原因のひとつであり, 世界的に観ても原因の 80% 程度は喫煙と考えられている⁵⁾⁶⁾。肺癌の亜型の中でも, 腺癌と喫煙との関わりは, それ以外の組織型と比較すると少ないと報告されているが, それでも腺癌の発生に多少なりとも関連性があるとされる⁷⁾。というのも, 喫煙者肺腺癌と非喫煙者肺腺癌では臨床病理学的に異なった背景が認められているからである。喫煙者に生じる腺癌の特徴としては, 男

性に多い⁸⁾, 組織学的分化度が低い⁹⁾¹⁰⁾, 円柱/立方体様細胞型である²⁾, 充実性増殖の組織亜型が多い¹¹⁾, EGFR 遺伝子変異が少ない^{12) - 14)}, KRAS 遺伝子変異を有する^{15) - 17)}, II 型肺胞上皮の cell lineage に関与する TTF-1 発現が少ない¹⁸⁾, そして粘液産生がある¹⁹⁾, などである。一方, 非喫煙者に起きる腺癌の特徴としては, 女性に多い⁸⁾, 分化度が高い⁹⁾¹⁰⁾, 鉾釘 (クララ細胞) 様細胞型である²⁾, 置換性増殖もしくは乳頭状増殖の組織亜型が多い¹¹⁾, EGFR 遺伝子変異が多い^{12) - 14)}, KRAS 遺伝子変異を有さない^{15) - 17)}, TTF-1 発現が多い¹⁸⁾, 粘液産生に乏しい¹⁹⁾, などがある。しかしながら, 上記所見はほとんど浸潤癌でのものであり, AIS において喫煙習慣と cell lineage マーカーを含んだ臨床病理学的因子, 遺伝学的因子に関してはいまだ説明されていない。

RTK シグナル経路は, 肺腺癌の発生に重要な役割を果たしている。主な下流シグナル経路は, Ras/Raf/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 経路, janus kinase (Jak)/signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) 経路の 3 つである。最近の報告では cell lineage, 浸潤程度, 遺伝子変異状況, 病理病期そして予後を含む臨床病理学的因子によって活性化される経路が異なるとされている²⁰⁾。喫煙習慣の観点からは, リン酸化 (phosphorylated (p-)) Akt と p-Stat3 発現が非喫煙者に多く認められていたとする報告や^{21) - 23)}, その一方で, pERK の発現は喫煙状況に影響がないとする報告がある²⁴⁾。しかしながら, AIS における詳細な検討, 特に Jak/Stat3 経路に関するものは報告がない。

表1A Primer sets of exons 18, 19, 20 and 21 of the EGFR gene

Primer sets	Forward	Reverse
First of exon 18	5'-ACTGCTTTCCAGCATGGTGA-3'	5'-AGGCCTGTGCCAGGGACCTTA-3'
Second of exon 18	5'-TGTCTCTGTGTTCTTGTC-3'	5'-AGGCCTGTGCCAGGGACCTTA-3'
First of exon 19	5'-GCATGTGGCACCATCTCACAA-3'	5'-ACACAGCAAAGCAGAAACTCAC-3'
Second of exon 19	fluorescently labeled 5'-GTCTTCCTTCTCTCTGTGCAT-3'	5'-ACACAGCAAAGCAGAAACTCAC-3'
First of exon 20	5'-ATCGCATTTCATGCGTCTTCA-3'	5'-TCCTTATCTCCCTCCCGTAT-3'
Second of exon 20	fluorescently labeled 5'-ACCATGCGAAGCCACACTGA-3'	5'-TCCTTATCTCCCTCCCGTAT-3'
First of exon 21	5'-GATGCAGAGTCTTCCCAT-3'	5'-TGACCTAAAGCCACCTCT-3'
Second of exon 21	5'-TCACAGCAGGTCTTCT-3'	5'-TGACCTAAAGCCACCTCT-3'

表1B Primer sets of codon 12, 13 and 61 of the KRAS gene

Primer sets	Forward	Reverse
First of codon 12, 13	5'-GTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCT-3'	5'-TTGTTGGATCATATTCGTC-3'
Second of codon 12, 13	5'-GGCTGCTGAAAATGACTGA-3'	5'-TTGTTGGATCATATTCGTC-3'
First of codon 61	5'-GACTGTGTTTCTCCCTTCTCA-3'	5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCA-3'
Second of codon 61	5'-TTCCTACAGGAAGCAAGTAG-3'	5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCA-3'

本研究では、喫煙者に生じる AIS と非喫煙者に生じる AIS との生物学的特徴を、臨床病理学的因子、遺伝子変異、RTK 下流シグナル発現の観点から評価し、検討した。欧米では AIS の手術例が少なく、本研究のように 100 例以上の手術症例における詳細な検討は例がない。

対象と方法

対象

1995 年 1 月から 2010 年 12 月までに公益財団法人がん研究会有明病院呼吸器外科で切除された連続する非小細胞肺癌 2087 例を 2004 年の WHO 分類²⁵⁾に基づいて、病理専門医(石川)が組織診断を行った。そのうち 1549 例が腺癌と診断され、538 例がそれ以外の非小細胞肺癌であった。腺癌 1549 例のうち 111 例(7.2%)が AIS 症例であった。1438 例(対照群 1)が浸潤性肺腺癌で、唾液腺型腫瘍やカルチノイド腫瘍を除いた 438 例(対照群 2)が腺癌以外の非小細胞肺癌であった。従って、対照群 2 はほとんどが扁平上皮癌か大細胞癌から構成されることとなった。

AIS 群、対照群 1、対照群 2 における患者について、以下の臨床病理学的データを収集した：診

断時の年齢・性別・喫煙状況・病理病期・腫瘍径・多発 AIS 存在の有無・進行肺癌の共存・粘液産生の有無・免疫組織染色による TTF-1 発現。多発腫瘍に関しては Martini と Melamed の基準によって診断した²⁶⁾。今回の研究では“非喫煙者”は厳密に喫煙をしたことがない者とし、一方それ以外は“喫煙者”の範疇に含めることとした。

すべての患者において、検体を研究に使用することのインフォームド・コンセントは得られており、この研究計画は公益財団法人がん研究会の倫理審査委員会によって承認されている。

EGFR と KRAS 遺伝子変異

EGFR 遺伝子変異および KRAS 遺伝子変異の検索はホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた。10 μm 厚の標本から針を用いて、手動的に腫瘍組織をマイクロダイセクションした。DNA はプロテイナーゼ K による消化とフェノールクロロホルムによる処理にて抽出した。EGFR では exon 18, 19, 20, 21 を検索するために nested PCR を用いた。Exon 18 と 21 の変異検索ではダイレクトシーケンシング法にて、exon 19 と 20 ではフラグメント解析にて変異検索を行った。KRAS 遺伝子

表2 Clinical characteristics of adenocarcinoma in situ (AIS), invasive adenocarcinoma (Comparison Group 1) and other NSCLC (Comparison Group 2).

Variables	Category	AIS	Comparison Group 1	Comparison Group 2	p-value
Number of patients		111	1,438	438	
Age (year; mean±S.D.)		61±10	64±10	67±9	0.043 ^a
Gender					<0.001 ^b
	Male	32 (29%)	723 (50%)	382 (87%)	
	Female	79 (71%)	715 (50%)	56 (13%)	
Smoking status					<0.001 ^b
	Never smokers	74 (67%)	748 (52%)	35 (8%)	
	Smokers	37 (33%)	690 (48%)	403(92%)	

Comparison Group 1: invasive adenocarcinomas, Comparison Group 2: other non-small cell lung carcinoma, mainly squamous or large cell carcinomas

^a ANOVA

^b Chi-square test

変異に関しては, codon 12, 13, 61 に対して nested PCR 法にて増幅させた. EGFR と KRAS における各 exon, codon に対するプライマーは表 1 (A・B) に示した.

First および second PCR では, 94 °C 15 分間の initial denaturation の後, 98 °C 10 秒間の denaturation, 57 °C 30 秒間の annealing, 68 °C 30 秒間の elongation をそれぞれ 38 サイクル KOD FX DNA ポリメラーゼ (KFX-101, TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて行った. 抽出物はシーケンスの前に Sephadex G75 column (GE Healthcare UK Ltd. Amersham Place, Little Chalfont Buckinghamshire HP7 9NA, England) を用いて精製した. シーケンストフラグメント解析は ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, U.S.A.) を用いて行った. シーケンスの評価には Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software v5.2 を使用した.

RTK 下流シグナル経路の活性化

RTK 下流シグナルの活性化は免疫組織学的に p-Akt, p-ERK, p-Stat3 の発現を組織マイクロアレイを用いることで検索した. 組織マイクロアレイの手順としては, 組織マイクロアレイ作製器 (KIN-1, Azumaya Inc, Japan) を用いて, 腫瘍最大断面のドナーパラフィンブロックから直径 2mm の coring 針を用いて手動でくり抜き, レシピエントブロックに移した. 本研究において, 著者らは腫瘍当たり 1 か所のみ選別することとしたが, それは, 浸潤癌と比較して AIS の腫瘍は非常に小さく, また heterogeneity があまりないことが理由である. レシピエントブロックを 4µm の厚さに切り出し, キシレンとアルコールを用いて処理をし, 表 2 の条件下において p-Akt, p-ERK, p-Stat3 を染色した. 抗原賦活は p-ERK は pH 6.0, p-Akt と p-Stat3 は pH 9.0 のクエン酸バッファーで 97 °C 40 分施行した. 抗原-抗体複合体は Envision +/HRP system (DAKO, Carpinteria, California, U.S.A.) を用いて標識し, 検出した.

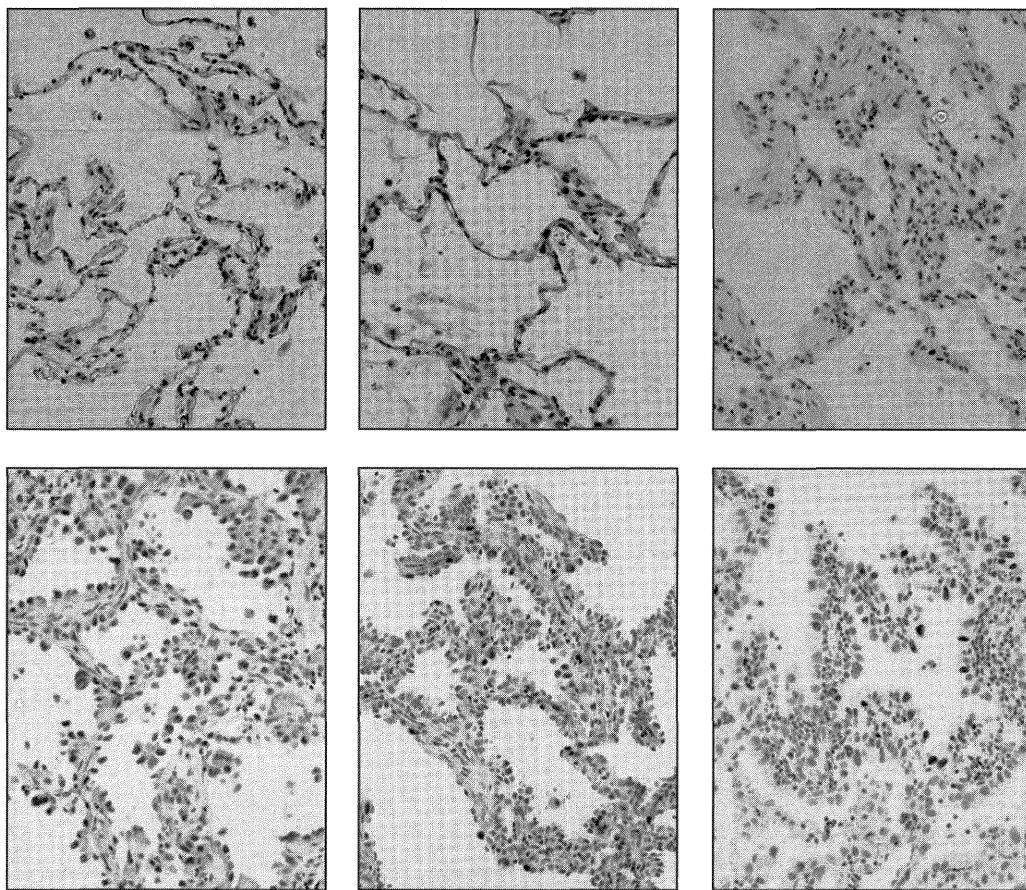


図1 Immunohistochemical staining of resected lung specimen with specific antibodies against pAkt (left), pERK (middle), and pStat3 (right). The upper row shows normal lungs with type II pneumocytes and the lower row is AIS.

p-Akt と p-ERK 発現の判定は以前に出版された論文²⁰⁾と同じ方法を用いた。p-Stat3 では内因性コントロールとして正常肺胞上皮細胞を用いた。p-Akt は細胞質もしくは核の染色を判定し、p-ERK と p-Stat3 は核の染色をそれぞれ判定し、腫瘍細胞の10%以上が染色されている腫瘍を最終的に陽性であると判断した(図1)。

統計学的解析

非喫煙者と喫煙者との間の臨床病理学的因子の評価は、 χ^2 検定、Fisherの正確検定、Studentのt検定を用いて行った。なお、 $p < 0.05$ を統計学的

に有意であると判断し、全ての統計学的解析はSPSS Version 19.0 (SPSS, Inc., an IBM Company)を用いた。

結 果

組織学的に観る肺癌の現状

平均年齢、性別の割合、喫煙率をそれぞれAIS群、対照群1(浸潤性肺腺癌)、対照群2(その他の非小細胞肺癌)において比較した(表2)。AIS群は他の浸潤癌と比較して男性の比率が有意に低かった。また、発症年齢では、AIS群はその他の

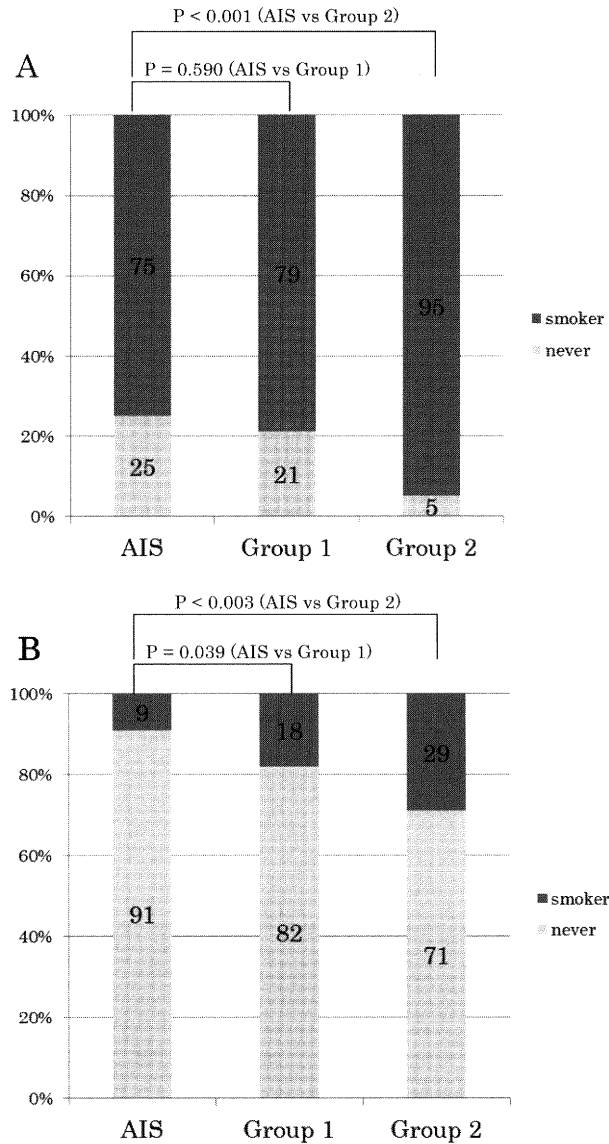


図 2 The smoking rates for males (A) and females (B) in AIS, Comparison Groups 1 and 2. Note that smokers' rates are very different between males and females, but they are significantly low in AIS than in Comparison Group 2 (mainly squamous cell and large cell carcinomas) for both sexes. Also, it is notable that 75 % of male AIS arise in smokers.

浸潤癌と比較して若い傾向を認めた ($p = 0.043$). 男女間の喫煙率には大きな違いがあり, 男性では AIS 群では対照群 2 よりも有意に喫煙率が低く, 女性では AIS 群は対照群 1, 対照群 2 のいずれよ

りも喫煙率が低かった. AIS は一般的に非喫煙者と関連があると広く認められているが, 図 2 の通り, 男性では 75 % が喫煙者であった.

表3 Clinicopathological and mutational features of AIS compared between never- and ever- smokers.

	Never smokers	Ever smokers	p-value
Age (yr)			0.583
Mean±S.D.	61±10	60±10	
Range	30-80	43-77	
Gender (number)			<0.001
Male	8	24	
Female	66	13	
Tumor size (mm)			0.351
Mean±S.D.	13.7±7.3	15.6±13.5	
Multiplicity (multiple AIS) (number)			0.607
No	68	32	
Yes	6	4	
Coexistence of advanced tumor (number)			0.684
No	66	33	
Yes	8	3	
mucin production (number)			0.369
No	67	35	
Yes	7	2	
TTF-1 (number)			0.388
Negative	5	2	
Positive	54	29	

喫煙習慣から観る AIS の臨床病理学的特徴

喫煙習慣の違いによる AIS の臨床病理学的特徴を表3に示した。全体では74例(67%)は非喫煙者であり、37例(33%)が喫煙者であった。喫煙習慣と性別との間には強い相関を認めたので、男女別に検討すると、男性の喫煙率は75%であったのに対し、女性では16%であり、有意に男性に多かった($p < 0.001$)。しかしながら、性別を除くと、年齢・腫瘍径・多発AIS・進行肺癌の共存・粘液産生性そして、TTF-1発現においては喫煙習慣との間に違いを認めなかった。すなわち、臨床病理学的・生物学的には、喫煙者のAISと非喫煙者のAISとの間に差は見られなかった。

腺癌組織亜型から観た遺伝子変異解析

肺腺癌をAISと浸潤癌(対照群1)という組織亜型に分類し、比較検討した(表4)。対照群1のうち216症例をランダムに選択し遺伝子解析を行った。EGFR遺伝子変異は非喫煙者88例中61例(69%)に認められ、喫煙者128例中52例(41%)に認められた。また、KRAS遺伝子変異は非喫煙者88例中2例(2.3%)に認められ、喫煙者128例中12例(9.4%)に認められた。以前の報告と同様、浸潤性肺腺癌においてはEGFRおよびKRAS遺伝子変異は喫煙習慣によりそれぞれ有意差を認めた($p < 0.001$, $p = 0.04$)。

AIS群111例において、EGFRとKRAS遺伝子

表 4 Comparisons of mutation rates of EGFR and KRAS between never - and ever - smokers for AIS and invasive adenocarcinoma (Comparison Group 1)

	AIS (%)			Comparison Group 1 (%) (n=216)		
	never smokers	ever smokers	p-value	never smokers	ever smokers	p-value
EGFR			0.738			<0.001
Mutation	41/71 (58%)	19/31 (61%)		61/88 (69%)	52/128 (41%)	
Wild type	30/71 (42%)	12/31 (39%)		27/88 (31%)	76/128 (59%)	
KRAS			0.198*			0.04*
Mutation	1/71 (1.4%)	2/34 (5.9%)		2/88 (2.3%)	12/128 (9.4%)	
Wild type	70/71 (99%)	32/34 (94%)		86/88 (97%)	116/128 (91%)	

* Fisher's exact test

表 5 Activation status of RTK signal pathways including Akt, ERK and STAT pathways in AIS (n = 89), compared between never and ever smokers

Phosphorylated Proteins		never smokers	ever smokers	p-value
pAkt				0.589
	positive	24/59 (41%)	14/30 (47%)	
pERK				0.494
	positive	25/59 (42%)	15/30 (50%)	
pStat3				0.973
	positive	49/59 (83%)	25/30 (83%)	

検索が行えたのはそれぞれ 102 例と 105 例であった。EGFR 遺伝子変異は非喫煙者 71 例中 41 例 (58%) に認められ、喫煙者 31 例中 19 例 (61%) に認められた。また、KRAS 遺伝子変異は非喫煙者 71 例中 1 例 (1.4%)、喫煙者 34 例中 2 例 (5.9%) に認められた。注目すべきことに、両遺伝子変異の割合と喫煙習慣との間には有意差を認めなかった。すなわち、遺伝子変異の点からも、喫煙者の AIS と非喫煙者の AIS との間には差はなかった。

AIS における喫煙習慣と RTK 下流シグナル発現

111 例の AIS 群のうち、p-Akt、p-ERK、p-Stat3 の発現データが得られた症例は 89 例であった (表 5)。喫煙習慣に関わらず、p-Akt と p-ERK は 40-50% 程度の発現率であり、p-Stat3 は 80% を超える発現率であった。つまり、RTK 下流シグナル発現の点からも、喫煙者の AIS と非喫煙者の AIS との間には差はなかった。

以上より、臨床病理学的側面、遺伝子変異、

RTK 下流シグナル経路の活性化という観点からは、喫煙者の AIS と非喫煙者の AIS には違いがないという結果であった。

考 察

喫煙と肺腺癌との関係性は他の非小細胞肺癌のそれよりも弱いと考えられているが、ある程度においては喫煙も肺腺癌の発がんに起因しているとされている⁷⁾。実際、喫煙者から生じた肺腺癌は非喫煙者から生じたものと異なった生物学的特徴を持っているとの報告は多い^{2)8)–19)}。しかしながら、上述した喫煙習慣との関係が AIS にも適応されるのかどうかについては未だ明らかではない。本研究では、100 例を超える AIS 症例について検討し、喫煙者に生じる AIS と非喫煙者に生じる AIS は生物学的特徴に大きな違いがないことを見出した。すなわち、喫煙者の腺癌と非喫煙者の腺癌との間で差が見られるのは、浸潤癌だけであり、AIS では差がないことが判明した。

喫煙と AIS の関係に関しては、本研究において AIS は他の非小細胞肺癌と比較して女性および非喫煙者に非常に強い関係があり、以前の報告と合致するものであった^{27)–29)}。更に、AIS は浸潤性肺腺癌と比較しても、女性および非喫煙者に多いという傾向を認めた。しかし、それでも AIS における喫煙率は 30% を超えていた。

本研究では、EGFR と KRAS 遺伝子変異による遺伝子解析を行った。EGFR 遺伝子変異に関しては約 60% 程度と、概ね以前の報告³⁰⁾³¹⁾と同様の結果であったが、KRAS 遺伝子変異の割合は低かった。一般的には KRAS 遺伝子変異は喫煙者に強い相関があり、腺癌症例の 10–30% 程度と報告³²⁾³³⁾されているが、今回は検索可能であった 105 例中 3 例 (2.9%) であった。それに関しては、今回の研究において AIS は喫煙者の癌ではなかったという点を考えると喫煙者の癌に多い KRAS 遺伝子変異の割合が低いことも妥当ではないかと思われる。遺伝子変異に関しては、喫煙は TP53 遺伝子変異や p16^{INK4a} 遺伝子抑制などを介して、AIS から AIS の形態を伴った浸潤性肺腺癌への進展

に大きく関与しているのではないかと過去に報告²⁵⁾³⁴⁾³⁵⁾があり、本研究結果はそれらの結果と軌を一にしている。従って、アスベスト、クロム、ラドン、副流煙の曝露といった環境因子や性ホルモン³⁶⁾³⁷⁾、ウイルスなど、喫煙とは違った原因分子が AIS の発がんには関与しているのかもしれない。

本研究では、RTK 下流シグナルの活性化を、主要な 3 つの経路である Ras/Raf/ERK 経路、PI3K/Akt 経路、Jak/Stat3 経路について検討した。以前の報告²⁰⁾によると、p-ERK は腺癌のうち非喫煙者と関連があるとされる。p-Akt の活性においては、West ら³⁸⁾は喫煙曝露によって誘導されるとしているが、他の報告では p-Akt の発現は主に非喫煙者肺腺癌に生じているとされる²¹⁾²²⁾。もともとは、細胞内においてサイトカインシグナルと転写発現とを結び付けている主要な要素であったが、Stat3 は発がんにおいても重要な役割を果たしている³⁹⁾。その p-Stat3 の発現は強く非喫煙者と関連があると報告されている²²⁾。しかし、AIS を対象とした本研究においては、喫煙習慣と RTK 下流シグナル分子の発現との間に違いがなかった。その理由としては、以前の報告は全て非小細胞肺癌もしくは浸潤性肺腺癌であったことが考えられる。以上の観点からも著者らは、喫煙は AIS から浸潤性肺腺癌の進展を制御しているのではないかと考えるのである。

外科的切除を受けた 100 症例を超す AIS の研究報告はかつてなく、その点からも本研究は意義が深いと考えている。しかし、この後ろ向き研究にはいくつかの不十分な点がある可能性がある。1 つめは、本研究においては、女性の非喫煙者の割合と比較して男性のそれがかかなり低いことに注意しなければならない。このような肺癌での不均衡は以前にも報告されており²²⁾⁴⁰⁾、今回は AIS の生物学的特徴をより明らかにするために同期間に連続する外科切除症例全てを選択することとした。2 つめは、パラフィンブロックから得ることができる組織検体が、浸潤癌と比較すると少ないため、十分な病理学的評価と、満足できる量の DNA を抽出することができたのかという点であ

る。しかしこの点に関しては、本研究における EGFR 遺伝子変異の割合は 60 % 程度と以前の報告³⁰⁾³¹⁾ とほぼ同程度であり、必ずしも DNA の不足を示唆する結果ではないと考える。

最後に、本研究では 3 つの注目すべき新しい知見があった。1 つめは、AIS が浸潤性肺腺癌と比較して女性と非喫煙者に多いということ。2 つめは、喫煙習慣と臨床病理学的因子、ドライバー遺伝子変異、RTK 下流シグナル経路の活性化との間には明らかな相関は認めないということ。3 つめは、上述の結果を受け、AIS は浸潤性肺腺癌とは性質を異にしており、浸潤癌のシンプルな前駆病変ではないということが分かった。

結 論

本研究では、肺腺癌の中の非浸潤癌と位置付けられる AIS につき、喫煙習慣と臨床病理学的、遺伝子学的、分子生物学的因子について検討した。浸潤性肺腺癌では喫煙の重要性は既知のことであるが、前癌病変である AIS の発がんでは喫煙は関与していなかったことは興味深い。言い換えると、喫煙は前癌病変から浸潤性肺腺癌への進展に重要な役割を果たしていると言えるであろう。症例をさらに蓄積していくことにより未だ明確ではない AIS の原因を検討していくことは今後の課題である。

謝 辞

本研究を行うにあたり御指導賜りました (公財) がん研究会がん研究所病理部・石川雄一部長、新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科分野・土田正則教授に深謝の意を表します。また、手術材料と臨床情報を御提供いただきました (公財) がん研究会有明病院呼吸器外科部長・奥村 栄先生、実験につき御指導いただきました (公財) がん研究会がん研究所病理部の皆様にも併せて心から御礼申し上げます。

参 考 文 献

1) Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP and Parkin DM: International lung cancer trends by histologic

type: male: female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 117: 294 - 299, 2005.

- 2) Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, Ishikawa Y, Nakagawa K, Hayashi J and Tsuchiya E: Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiological factors. Evidence from p53 mutational spectra. *Am J Pathol* 157: 2133 - 2141, 2000.
- 3) Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T and Takahashi T: Expression profile - defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol* 24: 1679 - 1688, 2006.
- 4) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M and Yankelwitz D: International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6: 244 - 285, 2011.
- 5) Godtfredsen NS, Prescott E and Osler M: Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *JAMA* 294: 1505 - 1510, 2005.
- 6) Dresler CM: Is it more important to quit smoking than which chemotherapy is used? *Lung cancer* 39: 119 - 124, 2003.
- 7) Yun YH, Lim MK, Jung KW, Bae JM, Park SM, Shin SA, Lee JS and Park JG: Relative and absolute risks of cigarette smoking on major histologic types of lung cancer in Korean men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2125 - 2130,

- 2005.
- 8) Kabat GC: Aspects of the epidemiology of lung cancer in smokers and nonsmokers in the United States. *Lung cancer* 15: 1 - 20, 1996.
 - 9) Suzuki T, Sobue T, Fujimoto I, Doi O and Tateishi R: Association of adenocarcinoma of the lung with cigarette smoking by grade of differentiation and subtype. *Cancer Res* 50: 444 - 447, 1990.
 - 10) Ishikawa Y, Furuta R, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K and Tsuchiya E: Loss of heterozygosity and the smoking index increase with decrease in differentiation of lung adenocarcinoma: etiologic implications. *Cancer Letter* 187: 47 - 51, 2002.
 - 11) Maeda R, Ishii G, Yoshida J, Hishida T, Nishimura M and Nagai K: Influence of cigarette smoking on histological subtypes of stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6: 743 - 750, 2011.
 - 12) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J and Haber DA: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129 - 2139, 2004.
 - 13) Ninomiya H, Hiramatsu M, Inamura K, Nomura K, Okui M, Miyoshi T, Okumura S, Satoh Y, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Miyata S, Tsuchiya E, Fukayama M and Ishikawa Y: Correlation between morphology and EGFR mutations in lung adenocarcinomas Significance of the micropapillary pattern and the hobnail cell type. *Lung cancer* 63: 235 - 240, 2009.
 - 14) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE and Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497 - 1500, 2004.
 - 15) Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu Yr YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, Haasler GB, Kajdacsy-Balla A, Demeure MJ and Sidransky D: Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 92: 1525 - 1530, 2001.
 - 16) Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, Wiencke JK, Wain JC and Kelsey KT: Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 91: 2032 - 2038, 1999.
 - 17) Soung YH, Lee JW, Kim SY, Seo SH, Park WS, Nam SW, Song SY, Han JH, Park CK, Lee JY, Yoo NJ and Lee SH: Mutational analysis of EGFR and K-RAS genes in lung adenocarcinomas. *Virchows Arch* 446: 483 - 488, 2005.
 - 18) Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T and Mitsudomi T: EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 29: 633 - 639, 2005.
 - 19) Sakuma Y, Matsukuma S, Yoshihara M, Nakamura Y, Noda K, Nakayama H, Kameda Y, Tsuchiya E and Miyagi Y: Distinctive evaluation of nonmucinous and mucinous subtypes of bronchioloalveolar carcinomas in EGFR and K-ras gene-mutation analyses for Japanese lung adenocarcinomas: confirmation of the correlations with histologic subtypes and gene mutations. *Am J Clin Pathol* 128: 100 - 108, 2007.
 - 20) Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T and Ishikawa Y: Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. *Lung cancer* 70: 94 - 102, 2010.
 - 21) Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Ligorio C, Cancellieri A, Damiani S, Spreafico A, Paties CT, Lombardo L, Calandri C, Bellezza G, Tonato M and Crinò L: Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 1133 - 1141, 2004.
 - 22) Dutu T, Michiels S, Fouret P, Penault-Llorca F, Validire P, Benhamou S, Taranchon E, Morat L,

- Grunenwald D, Le Chevalier T, Sabatier L and Soria JC: Differential expression of biomarkers in lung adenocarcinoma: a comparative study between smokers and never - smokers. *Ann Oncol* 16: 1906 - 1914, 2005.
- 23) Haura EB, Zheng Z, Song L, Cantor A and Bepler G: Activated epidermal growth factor receptor - Stat - 3 signaling promotes tumor survival in vivo in non - small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 8288 - 8294, 2005.
- 24) Mountzios G, Planchard D, Besse B, Validire P, Girard P, Devisme C, Dimopoulos MA, Soria JC and Fourret P: Mitogen - activated protein kinase activation in lung adenocarcinoma: a comparative study between ever smokers and never smokers. *Clin Cancer Res* 14: 4096 - 4102, 2008.
- 25) Travis WD, Brambilla E and Muller - Hermelink HK: World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC; 2004.
- 26) Martini N and Melamed MR: Multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70: 606 - 612, 1975.
- 27) Gandara DR, West H, Chansky K, Davies AM, Lau DH, Crowley J, Gumerlock PH, Hirsch FR and Franklin WA: Bronchioloalveolar carcinoma: a model for investigating the biology of epidermal growth factor receptor inhibition. *Clin Cancer Res* 10: 4205s - 4209s, 2004.
- 28) Miller VA, Kris MG, Shah N, Patel J, Azzoli C, Gomez J, Krug LM, Pao W, Rizvi N, Pizzo B, Tyson L, Venkatraman E, Ben - Porat L, Memoli N, Zakowski M, Rusch V and Heelan RT: Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non - small - cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22: 1103 - 1109, 2004.
- 29) Zell JA, Ou SH, Ziogas A and Anton - Culver H: Epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma: improvement in survival after release of the 1999 WHO classification of lung tumors. *J Clin Oncol* 23: 8396 - 8405, 2005.
- 30) Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Jänne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanoovic D, Stinson JA, Zhang YR, Seshagiri S and Hillan KJ: Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non - small - cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23: 5900 - 5909, 2005.
- 31) Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, Lam WK, Chiu SW, Girard L, Minna JD, Gazdar AF and Wong MP: Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non - small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 12: 1647 - 1653, 2006.
- 32) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD and Gazdar AF: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97: 339 - 346, 2005.
- 33) Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majumdar K, Suzuki M, Lee H, Wistuba II, Fong KM, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Minna JD and Gazdar AF: Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 65: 1642 - 1646, 2005.
- 34) Kitamura H, Kameda Y, Nakamura N, Inayama Y, Nakatani Y, Shibagaki T, Ito T, Hayashi H, Kimura H and Kanisawa M: Atypical adenomatous hyperplasia and bronchoalveolar lung carcinoma. Analysis by morphometry and the expressions of p53 and carcinoembryonic antigen. *Am J Surg Pathol* 20: 553 - 562, 1996.
- 35) Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M and Kitamura H: Morphometric profiling of lung cancers - its association with clinicopathologic, biologic, and molecular genetic features. *Am J Surg Pathol* 34: 243 - 255, 2010.
- 36) Ali G, Donati V, Loggini B, Servadio A,

- Dell'Omodarme M, Prati MC, Camacci T, Lucchi M, Melfi F, Mussi A and Fontanini G: Different estrogen receptor beta expression in distinct histologic subtypes of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 39: 1465 - 1473, 2008.
- 37) Kreuzer M, Gerken M, Heinrich J, Kreienbrock L and Wichmann HE: Hormonal factors and risk of lung cancer among women? *Int J Epidemiol* 32: 263 - 271, 2003.
- 38) West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S and Dennis PA: Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 111: 81 - 90, 2003.
- 39) Yu H and Jove R: The STATs of cancer - new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4: 97 - 105, 2004.
- 40) Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLerran D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zochbauer - Muller S, Tsukuda K, Sugio K, Shimizu N, Shimizu K, Lee H, Chen CY, Fong KM, Gilcrease M, Roth JA, Minna JD and Gazdar AF: Smoke exposure, histologic type and geography - related differences in the methylation profiles of non - small cell lung cancer. *Int J Cancer* 103: 153 - 160, 2003.

(平成25年1月9日受付)
