

氏名 (本籍)	新井 正 (大阪府)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1150 号
学位授与日付	平成 10 年 2 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Correlation between the immunohistochemical and mRNA expression of glutathione S-transferase- π and cisplatin plus etoposide chemotherapy response in patients with untreated primary non-small cell lung cancer
審査委員	(主査) 教授 藤原久義 (副査) 教授 森秀樹 教授 森脇久隆

論文内容の要旨

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) は、一群の分子種からなる多機能酵素であり、種々の薬剤に対するグルタチオン抱合活性、脂質や核酸の過酸化物に対するグルタチオンペルオキシダーゼ活性、およびステロイドホルモンやプロスタグランジンに対するイソメラーゼ活性の3種類の酵素活性を示す。近年、ラットやヒト癌組織でGST、特にその π クラスの分子種が発現、増加することが明らかにされ、さらに抗癌剤耐性癌細胞で、 π クラスを主としたGST分子種の増加が報告されGSTと耐性の関連も示唆されている。そこで今回我々は、手術不能の未治療時原発性非小細胞肺癌の経気管支的肺生検で得られた病理組織標本に、抗GST- π 抗体を用いた免疫組織化学染色を施し、さらに一部の病理組織のmRNAレベルでのGST- π の発現も考慮に入れ、これらとシスプラチンとエトポシドによる化学療法効果との関係について検討した。

1. 対象および方法

対象は1991年9月～1996年6月までに気管支鏡を実施し、手術不能と判定されたstageⅢbおよびⅣの原発性非小細胞肺癌患者のうち、患者の家族とインフォームドコンセントのとれた54～85歳までの60例 (男性49例、女性11例、平均年齢75.2歳) であり、組織型は扁平上皮癌35例、腺癌25例である。全症例に第1日目にcisplatin100mg/m²を、第1～3日にetoposide100mg/m²を点滴静注し、28日を1クールとして全例2クール実施し、その時点でWHOの基準に従って効果を判定した。免疫組織化学検索は各症例材料ごとに、10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋ブロックを作成し、各ブロックはHE染色による腫瘍の病理組織学的検討と同時に、抗GST- π 抗体 (ONCOR) を用い免疫組織化学染色を施行した。100倍希釈の抗GST- π 抗体を4℃で一晩反応させ、DAKO社のLSABkitを使用して、DABを基質として発色させて顕微鏡観察を行った。GST- π の染色性は、ヒト胎盤を陽性対照標本として置き、胎盤合体細胞に染色されるのと同様の変化を肺癌細胞部の細胞質にびまん性にみられるものを陽性とし、他は陰性と判定した。一方、上記免疫組織化学的検討をし得た経気管支肺生検材料のうち新鮮凍結し得た11例については、ChromczynskiとSacchiの方法に基づいてRNA抽出を行い、続いて総RNA1 μ gから逆転写酵素によりcDNAを作成し、GST- π のmRNAレベルでの発現状況を検討した。作成したcDNAに対してGST- π は、センス側に5'-GGCAGCTCCCCAAGTTCCA-3'、アンチセンス側に5'-TCCACGCCGTCATTCACCAT-3'を用い、アニール温度59℃、又、 β -actinはセンス側に、5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3'、アンチセンス側に5'-TGTCACCTTCACCGTTCACAG-3'、アニール温度56℃にてPCR法により増幅を行った。第1PCR反応後に [α -³²P]-dCTPを添加して、8回のPCR反応を追加したのち、2～3%アガロースゲルにて電気泳動を行った。目的のバンドはエチジウムブロマイド液にて染色し、紫外線照射にて確認し、その部をくりぬいてシンチレーション溶液内に溶解した後、液体シンチレーションカウンター (RACKARD) を用いて取り込まれた放射線レベルを測定した。 β -actin量に対するGST- π 量の比を計算して、免疫組織化学染色の結果の状況と比較検討を行った。

2. 結果

PR (partial response) と判定した25例中、16例 (扁平上皮癌8例、腺癌8例) でGST- π の染色性は陰性であ

り、残りの9例（扁平上皮癌5例，腺癌4例）は，GST- π の染色性は陽性であった。一方，NC（no change）と判定した35例中，27例（扁平上皮癌19例，腺癌8例）でGST- π の染色性は陽性であった。すなわち，GST- π の染色性が陰性である24例中16例，66.7%でPRとなったが，GST- π が陽性である症例では，36例中9例，わずかに25%にPRがみられるのみであった。このことからGST- π の免疫組織化学の染色性と，シスプラチンとエトポシドによる化学療法効果には，密接な関係があると考えられた（ $P=0.0019$ by Fisher's exact test）。一方，一部の症例について，mRNAレベルでのGST- π の発現を検討した。GST- π 陰性の症例でのGST- π / β -actin比は， 71.2 ± 21.6 であり，陽性症例では 139.0 ± 26.4 であった。これらからGST- π の染色性が陽性である症例では，GST- π のmRNAレベルでの発現が有意に高かった。（ $P < 0.005$ by Student's-test）。

3. 考案

GSTは多くの抗癌剤の解毒に働くとして推定されている。種々のヒト癌細胞株では，doxorubicin, cisplatin, chlorambucil, mitomycinCなどへの耐性に伴い，GST- π が増加し，エタクリン酸などのGST阻害剤やGSTの発現を阻害する薬剤の併用により耐性が解除あるいは低下することから，GSTと薬剤耐性の密接な関係が示唆されてきた。そこで今回我々は，経気管支肺生検にて得られた原発性非小細胞肺癌の病理組織標本に対して，抗GST- π 抗体を用いた免疫組織化学染色を施し，シスプラチンとエトポシドによる化学療法効果との関係について検討した。本研究で最も興味ある結果は，GST- π の染色性と化学療法効果に密接な関係があるということである。すなわち，GST- π の染色性が陰性であれば，約66.7%でPRが得られるが，GST- π の染色性が陽性であれば，PRはわずかに25%であるということである。このことはHowie, TerrierやHidaらがGST- π レベルの低い肺癌株はシスプラチンに強く反応するとして報告を強く支持している。一方，癌とGST- π との関係は，肺癌のみならず種々の癌で研究され報告されている。Niitsuらは大腸癌，Tsutsumiらは胃癌で，Mannervicらは黒色腫で検討しているが，いずれの報告においてもGST- π とシスプラチンやアドリアマイシンなどの化学療法効果との間には密接な関係があると報告している。さらに今回我々は，GST- π のmRNAレベルの発現を検討したが，免疫組織化学染色の結果に一致した。すなわち，GST- π の染色性やmRNAレベルでの発現を検討することは，シスプラチンとエトポシドによる肺癌化学療法の治療効果予測に，極めて有用であると考えられた。しかしシスプラチンなどの抗癌剤により獲得されると考えられる耐性に対して，GST- π がどのように関わっているかはさらなる検討が必要と思われる。

4. 結論

未治療時原発性非小細胞肺癌病理組織において，抗GST- π 抗体による免疫組織化学染色を施行し，陰性症例の66.7%，陽性症例ではわずかに25%でPRであった。このことから，GST- π の染色性およびmRNAレベルでの発現を評価することは，手術不能の未治療時原発性非小細胞肺癌のシスプラチンとエトポシドによる化学療法効果を予測できる可能性が示唆されたと結論した。

論文審査の結果の要旨

申請者 新井 正は，ヒトの非小細胞肺癌においてGST- π ならびにそのmRNAの測定が化学療法の適応決定に重要であることを明らかにした。

この新知見は呼吸器学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Correlation between the immunohistochemical and mRNA expression of glutathione S-transferase- π and cisplatin plus etoposide chemotherapy response in patients with untreated primary non-small cell lung cancer

平成9年7月発行 International Journal of Oncology 11 : 127~131