

Thesis

肺癌における組織内Thymidylate synthase (TS) および
Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 活性と予後に関する検討埼玉医科大学呼吸器外科
(指導：金子 公一助教授)

赤石 亨

Tissue Activities of Thymidylate Synthase (TS) and Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) and Their Prognostic Relevance in Primary Lung Cancer

Tissue expressions of thymidylate synthase (TS), a target enzyme for 5-fluorouacil (5-FU)-based anticancer agents, and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), a degradation enzyme for 5-FU-based anticancer agents, have been suggested to be potentially associated with not only antitumor efficacy in anticancer drugs but also tumor characteristics and prognosis. Tissue activities of TS and DPD were measured, and their relationships with tumor characteristics such as histological type, degree of cell differentiation, etc., and prognosis were examined. Further, the relationship between the levels of TS and DPD expressions and those of TS and DPD activities was investigated by immunohistological staining utilizing anti-TS antibody, anti-DPD antibody, cyclin A and ki-67. In a total of 55 patients with surgically resected primary lung cancer, enzymatic activities in cancerous tissues of their resected lung tumors as well as normal lung tissues were measured. TS activity in the tumor lung tissue and normal lung tissue was 0.031 pmol/mg protein (hereafter the unit omitted) and 0.022, respectively, and DPD activity in the tumor lung tissue and normal lung tissue was 302.6 031 pmol/min/mg protein (hereafter the unit omitted) and 90.1, respectively, exhibiting a trend toward an elevated level of both activities in the tumor lung tissues. TS activity showed no difference between the two types (squamous cell carcinoma and adenocarcinoma) but DPD activity was high in the cases of adenocarcinoma. TS activity was high at earlier disease stages I and II, while DPD activity was lower at stages I and II, compared to stages III and IV. TS and DPD activities in recurrent cases were 0.027 and 271.1, respectively, where in non-recurrent cases they were 0.037 and 290.1, respectively, thus showing a slightly elevated level of TS activity in the non-recurrent cases. On immunohistological staining of cancerous tissues, in both TS and DPD staining, the level of their activities tended to be high in cases stained positively, and a correlation was observed between enzymatic activity and expression of enzyme. In cases shown positive for TS staining, many cases were positive for cyclin A as well as Ki-67 and a similar pattern was observed in cases shown positive for DPD staining. However, in the DPD staining, marked tissue inhomogeneity was observed and, even in cases stained positively, there were some such cases as the negative part being mixed in a portion of the tissue, which even led us to consider this as the cause of fluctuations in the level of activity. The levels of TS and DPD activities in the lung cancer tissue were seen in part correlated with tumor characteristics and prognosis and, further, their usefulness was also suggested as markers for not only prognostic evaluation but also pre- and post-operative adjuvant chemotherapies.

Keywords: Thymidylate synthase, Dihydropyrimidine dehydrogenase, 5-fluorouacil, lung cancer, cyclinA, Ki-67

緒言

5-fluorouacil (5-FU) 系抗癌剤の標的酵素 thymidylate

医学博士 甲第920号 平成16年3月19日 (埼玉医科大学)

synthase (TS) は pyrimidine 生合成にかかわる DNA 合成経路の主要な律速酵素であり, 5-FU の作用機序は TS 阻害にある. 一方, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) は 5-FU を分解する律速酵素で 5-FU の不活化

因子であり、両酵素の組織内発現は5-FU系抗癌剤の抗腫瘍効果に關与しており、消化器癌については種々の研究がなされている¹⁻⁴⁾。一方に5-FU系抗癌剤の効果に乏しい肺癌についての本酵素の研究は少ないが、近年比較的病期の早い肺癌に対する5-FU系抗癌剤の有効性に関する臨床結果も出ていて¹³⁾、肺癌組織における両酵素の存在、活性については興味のもたれるところである⁵⁻⁷⁾。また腫瘍内の本酵素の発現量が各抗癌剤の腫瘍効果に關係するのみでなく、悪性度など腫瘍の特性や予後に關連があるとの報告もなされており^{8,9)}本酵素の存在は癌の治療のみでなく予後判定においても有用である可能性が考えられる^{10,11)}。手術により摘出された肺癌切除組織における組織内TS活性とDPD活性を測定し、組織型、分化度など腫瘍の特性および予後との關連について検討した。また免疫組織染色によりTS, DPDの発現量と活性値との關連についてもTS, DPD, cyclinA, ki-67を用いて比較し、原発性肺癌におけるTS, DPD活性が腫瘍の特性や予後と關連するののかについて検討した。

対 象

1999年から2003年までの間に埼玉医科大学呼吸器外科において切除手術の施行された原発性肺癌のうちインフォームド・コンセントの得られた55例を対象とした。組織型は腺癌37例、扁平上皮癌18例で、男性33例、女性22例、平均年齢は37~83(平均67.2)歳であった。手術は全例肺葉切除と縦郭リンパ節2群廓清を施行した。病理病期はI A期11例、I B期14例、II A期1例、II B期7例、III A期11例、III B期9例、IV期2例であった。

方 法

1. 組織内TS活性, DPD活性の測定

肺葉切除後直ちに標本より癌組織および癌組織と連続しない正常肺組織を0.4 g以上採取して氷冷した生理食塩水による脱血、ガーゼによる血液除去処理をして容器に入れマイナス80℃にて凍結保存してから後日酵素活性を測定した。TS活性はligand binding assay法にてTSへのfluorodeoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP)の結合量からTS量を算出して測定した。DPD活性は組織に5-FU溶液を加えて酵素反応を行い分解産物をradio-enzymatic assay法により算出して測定した。

2. 免疫組織学的染色

ホルマリン固定後のパラフィン包埋材料より連続切片を作製し、一次抗体として抗リコンビナントヒトThymidylate synthase (TS) ポリクローナル抗体RTSSA, 抗リコンビナントヒトdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) ポリクローナル抗体RDPDPAを使用し、ABC法による免疫組織学的染色を施行した。なお免疫組織学的染色はVENTANA HX system

BENCHIMARK法を用いた。染色性の評価は、陽性癌細胞が癌組織に占める割合を用いて、20%以上のものを強陽性、10%以上のものを陽性、5%以下のものを陰性とした。細胞分裂学的因子Ki-67の染色は抗Ki-67抗体を使用してABC法で免疫染色した。同様にcyclinAの染色は抗cyclinA抗体を使用してABC法で免疫染色した。

3. TS・DPD活性値と免疫染色の比較

Fukushimaらの消化器癌を中心とした2592例の癌組織内TS, DPD活性値の中央値はTS活性0.041 pmol/mg protein, DPD活性110.1 pmol/min/mg proteinである¹²⁾。これを基準として設定し、測定したTS活性値, DPD活性値を各々基準値より低値, 高値に分けて4群を分類した。すなわちTS活性高値かつDPD活性低値を第1群, TS活性低値かつDPD活性低値を第2群, TS活性高値かつDPD活性高値を第3群, TS活性低値かつDPD活性高値を第4群とした。症例数の多い第2, 3, 4群から扁平上皮癌, 腺癌症例を各々免疫染色し、症例の最も多い第4群から無作為に30検体を抽出し、ki-67染色, cyclinA染色を行い細胞分裂学的因子について検討した。Ki-67染色は全標本から無作為に10箇所抽出し、癌染色核数/総癌核数で比率を示し、MIB indexとした。(以下MIB indexと記載)

結 果

1. 組織内TS, DPD活性値

全症例の癌組織と正常肺組織の酵素活性値はTS活性が癌組織0.031 pmol/mg protein, 正常組織0.022 pmol/mg protein, DPD活性は癌組織302.6 pmol/min/mg protein, 正常組織90.1 pmol/min/mg proteinでいずれも癌組織に高く、DPD活性は有意に高値であった(表1)。組織型別では腺癌37例でTS活性は癌組織0.031 pmol/mg protein, 正常組織0.021 pmol/mg protein, DPD活性は癌組織355.6 pmol/min/mg protein, 正常組織93.0 pmol/min/mg proteinで、扁平上皮癌18例では癌組織でTS活性は癌組織0.032 pmol/mg protein, 正常組織0.023 pmol/mg protein, DPD活性は癌組織193.8 pmol/min/mg protein, 正常組織84.1 pmol/min/mg proteinで、いずれの組織型でも正常組織より癌組織に高値であった(表1)。癌組織内TS活性は組織型による差はみられなかったが、DPD活性は腺癌において有意に高値を示した(図1)。

表1. 正常組織および癌組織のTS活性値とDPD活性値

	症例数	TS活性		DPD活性	
		癌組織	正常組織	癌組織	正常組織
全症例	55	0.031	0.022	302.59	90.11
腺癌	37	0.031	0.021	355.6	93.02
扁平上皮癌	18	0.032	0.023	193.76	84.14

単位; TS値(pmol/mg protein), DPD値(pmol/min/mg protein)

病理病期ではTS活性は I, II 期31例で0.045 pmol/mg protein, III, IV期24例で0.025 pmol/mg protein, DPD活性は I, II期270.5 pmol/min/mg protein, III, IV期336.5 pmol/min/mg proteinで病期の早い I, II 期でTS活性が高く, DPD活性が低かった(図2). 特に原発巣の腫瘍径による比較で, 腫瘍径3 cm以下(T1)と腫瘍径3 cm以上(T2)においてTS活性はT1で0.045 pmol/mg protein, T2で0.025 pmol/mg protein, DPD活性はT1で266.3 pmol/min/mg protein, T2で354.9 pmol/min/mg proteinであり, いずれもT1でTS活性が高く, DPD活性が低かった. 癌組織の分化度でみると, TS活性は高分化(19例)0.025 pmol/mg protein, 中分化(22例)0.028 pmol/mg protein, 低分化(14例)0.043 pmol/mg protein, DPD活性は高分化326.0 pmol/min/mg protein, 中分化379.3 pmol/min/mg protein, 低分化361.0 pmol/min/mg proteinでTS活性が低分化癌に高い傾向であったが有意差はみられなかった(図3). しかし, 乳頭状増殖を示す高分化腺癌8例ではTS活性0.019 pmol/mg protein, DPD活性419.2 pmol/min/mg proteinとTS活性低値でDPD活性高値であった.

2. 予後との関連

予後の追跡可能であった50例(無再発例は最短で6ヶ月以上)中, 術後再発22例と無再発生存28例とで癌組織内TS活性, DPD活性を比較すると, TS活性は再発例で0.027 pmol/mg protein, 無再発例で0.031 pmol/mg protein, DPD活性は再発例で271.1 pmol/min/mg protein, 無再発例で290.1 pmol/min/mg proteinであった(図4). 同一症例において癌組織内TS, DPD活性の正常肺組織内TS, DPD活性に対する比率, すなわち癌組織が正常組織の何倍の酵素活性を有していたかを求め, 各々活性比率 Δ TS, 活性比率 Δ DPDとして比較した. Δ TSは再発例で1.49, 無再発例で1.57, Δ DPDは再発例4.73, 無再発例4.02で無再発例では正常肺組織の部分より癌組織内TS活性は高く, DPD活性は低い傾向にあったが有意差は認められなかった(図5).

5年経過例がないため, 全体の4年生存率は63.5%であり, 腺癌では66.1%, 扁平上皮癌では62.4%であった(図6).

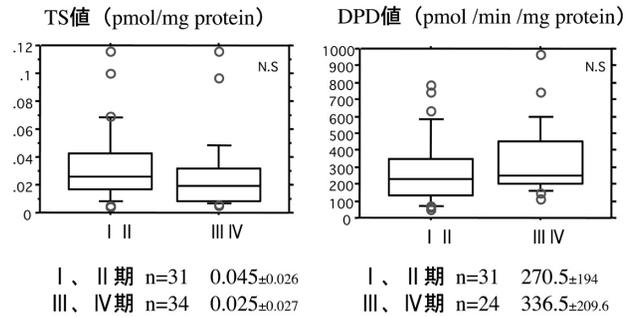


図2. 病理病期別活性値. 病理病期ではTS活性は I, II 期31例で0.045, III, IV期24例で0.025, DPD活性は I, II 期270.5, III, IV期336.5で病期の早い I, II 期でTS活性が高く, DPD活性が低かった.

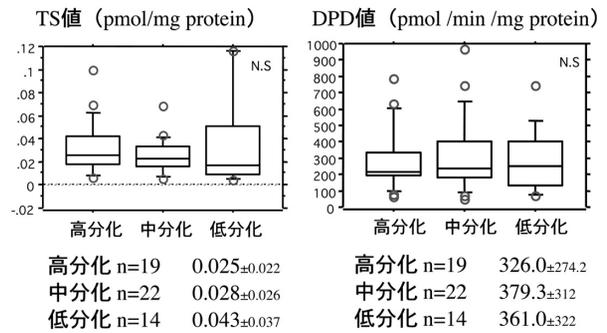


図3. 分化度別活性値. 癌組織の分化度でみると, TS活性は高分化(19例)0.025, 中分化(22例)0.028, 低分化(14例)0.043, DPD活性は高分化326.0, 中分化379.3, 低分化361.0でTS活性が低分化癌に高い傾向であったが有意差はみられなかった. しかし, 乳頭状増殖を示す高分化腺癌8例ではTS活性0.019, DPD活性419.2とTS活性低値でDPD活性高値であった.

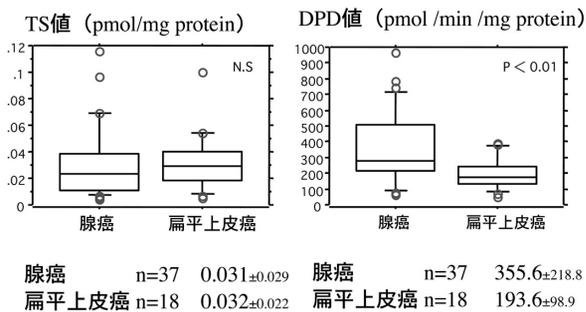


図1. 病理組織型別活性値. 癌組織内TS活性は組織型による差はみられなかったが, DPD活性は腺癌において有意に高値を示した.

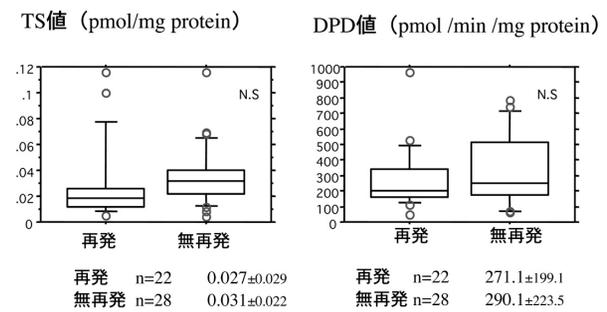


図4. 再発, 無再発別活性値. 再発例, 無再発例のTS活性, DPD活性に有意差なかった.

3. TS, DPD発現と活性値との関連(免疫組織学的染色)

免疫組織染色によるTS陽性例33例, 陰性例7例およびDPD陽性例33例, 陰性例6例について癌組織内酵素活性値との関連を検討した. 各染色による陽性例, 陰性例を図7~10に示す. TS活性はTS陽性例で0.030 pmol/mg protein, TS陰性例で0.024 pmol/mg protein, DPD活性はDPD陽性例が362.7 pmol/min/mg protein, DPD陰性例が274.1 pmol/min/mg proteinで染色陽性例に活性値が高かった(表2).

TS陽性の症例ではcyclinA陽性が94%, Ki-67陽性が92%であったが, TS陰性例の一部でも, cyclinA陽性, Ki-67陽性がみられた. DPD陽性例では96%がcyclinA陽性, 91%がKi-67陽性であったが同様にDPD陰性例にもcyclinA陽性, Ki-67陽性がみられた. しかしDPD陽性例では組織内に陰性部分が不均一に散在している症例がみられた.

MIB indexは, 扁平上皮癌では50%以上を示したのに対して, 腺癌では20~40%であった. TS活性値,

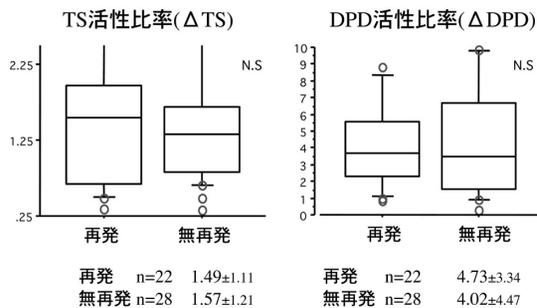


図5. 再発, 無再発の活性比率(ΔTS, ΔDPD). 同一症例において癌組織内TS, DPD活性の正常肺組織内TS, DPD活性に対する比率, すなわち癌組織が正常組織の何倍の酵素活性を有していたかを求め, 各々活性比率を比較した. 活性比率TSは再発例で1.49, 無再発例で1.57, 活性比率DPDは再発例4.73, 無再発例4.02で無再発例では正常肺組織の部分より癌組織内TS活性は高く, DPD活性は低い傾向にあったが有意差は認められなかった.

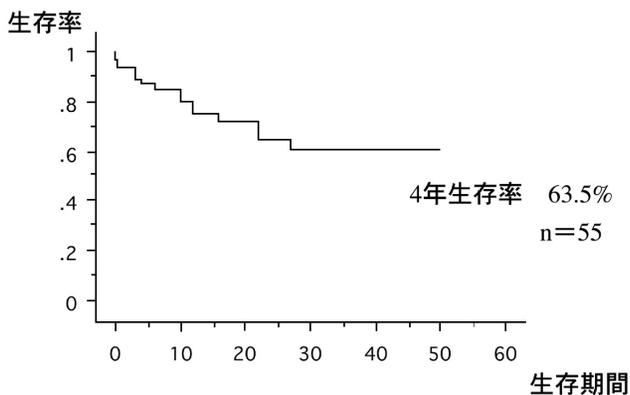


図6. 全体の生存曲線.

DPD活性値の基準値による分類では第4群すなわちTS活性低値, DPD活性高値群が69%を示した(図11).

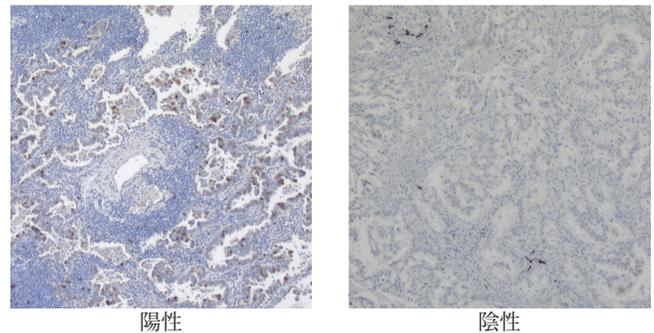


図7. 抗TS抗体染色.

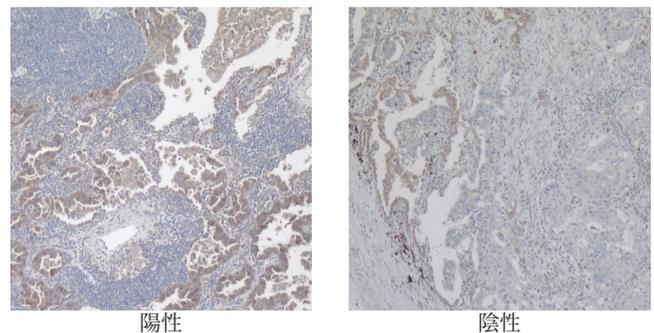


図8. 抗DPD抗体染色.

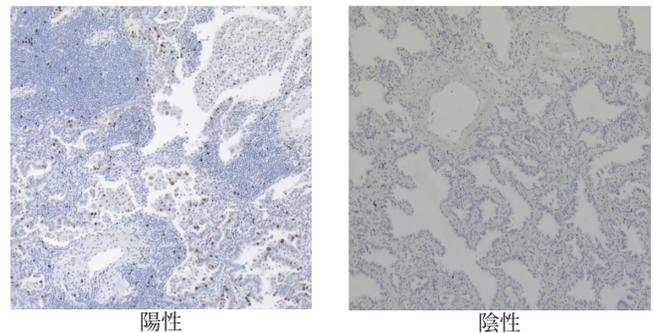


図9. ki-67染色.

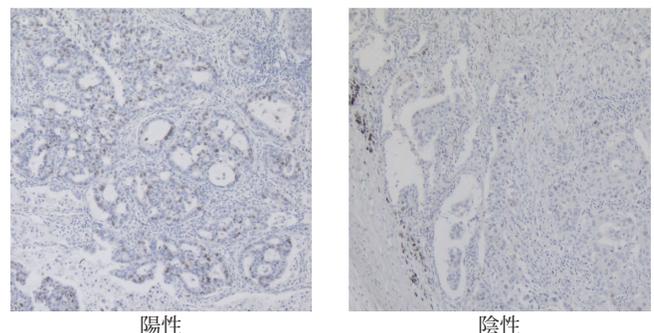


図10. cyclinA染色.

考 察

癌組織内TS活性, DPD活性は消化器癌を中心に多くの研究がなされており, 消化器癌, 乳癌などではTS活性は高く, DPD活性は低いとの報告が多い¹⁻⁴⁾. それに比較して, 肺癌組織においてはTS活性が低くDPD活性は低いとの報告があり^{5-7, 11, 12)}, 抗癌剤の臨床的効果が低い理由と考えられる. 本研究において, TS活性は肺癌組織0.031 pmol/mg proteinであり, 胃癌, 大腸癌, 乳癌の組織内活性値0.058~0.094 pmol/mg protein¹²⁾ に比して低値である一方, DPD活性は肺癌組織 302.6 pmol/min/mg proteinに対して胃癌, 大腸癌, 乳癌の組織内活性値は106.9~140.8 pmol/min/mg protein¹²⁾ であり3倍近い癌組織内活性を示しており同様の結果が得られた. 一方, TS活性値は正常肺組織に比して肺癌組織でやや高い傾向にあるもののDPD活性値が正常肺組織より肺癌組織に有意に高値であり, 5-FU系抗癌剤の効果をさらに弱

くするものと推測される. しかし, I期, II期症例や, 腫瘍径3 cm以下のT1症例のように比較的早い時期の肺癌症例ではTS活性は0.045 pmol/mg protein, DPD活性は270.5 pmol/min/mg proteinと肺癌全体活性値TS活性は0.031 pmol/mg protein, DPD活性は302.6 pmol/min/mg proteinに比べて消化器癌, 乳癌に近い活性を示し, 肺癌の中でも5-FU系抗癌剤の効果が期待出来ると考えられる. 和田らによる臨床試験では, 病期の早い肺癌に対する5-FU系抗癌剤による補助化学療法の有用性も指摘されており¹³⁾, この酵素活性値の結果に一致すると思われる.

今回の検討では肺癌の組織型や分化度による酵素活性値に大きな差はみられなかったが, DPD活性については腺癌が扁平上皮癌より有意に高値であった. またTS活性は, 乳頭状増殖を示す高分化腺癌で他の組織よりTS活性値が低値であった. しかし免疫染色では高分化腺癌の先進部分にKi-67, TSともによく染色され, 肺胞上皮でもTSがよく染色されることより, こうした部分では酵素活性が高いものと考えられる. こうした事実は酵素活性と染色の間にはより複雑な関係があることも示唆していると考えられる.

予後と本酵素の発現, 活性との間に一定の関連は見出せなかったが, 無再発生存例では癌組織内DPD活性の同一症例正常組織部分のDPD活性に比した上昇の割合△DPDが4.02と低く抑えられていた. すなわち癌組織内DPD活性が正常部分の4倍程度の上昇にとどまる症例が無再発で経過していた. 今回の検討でも明らかかなように, 全体として予後不良である肺癌組

表 2. TS, DPD免疫染色とTSおよびDPD活性値の比較

		症例数	TS活性値	DPD活性値
TS	陽性	33	0.03	359.8
	陰性	7	0.024	284.9
DPD	陽性	33	0.032	362.7
	陰性	6	0.014	274.1

単位: TS値 (pmol/mg protein), DPD値 (pmol/min/mg protein)

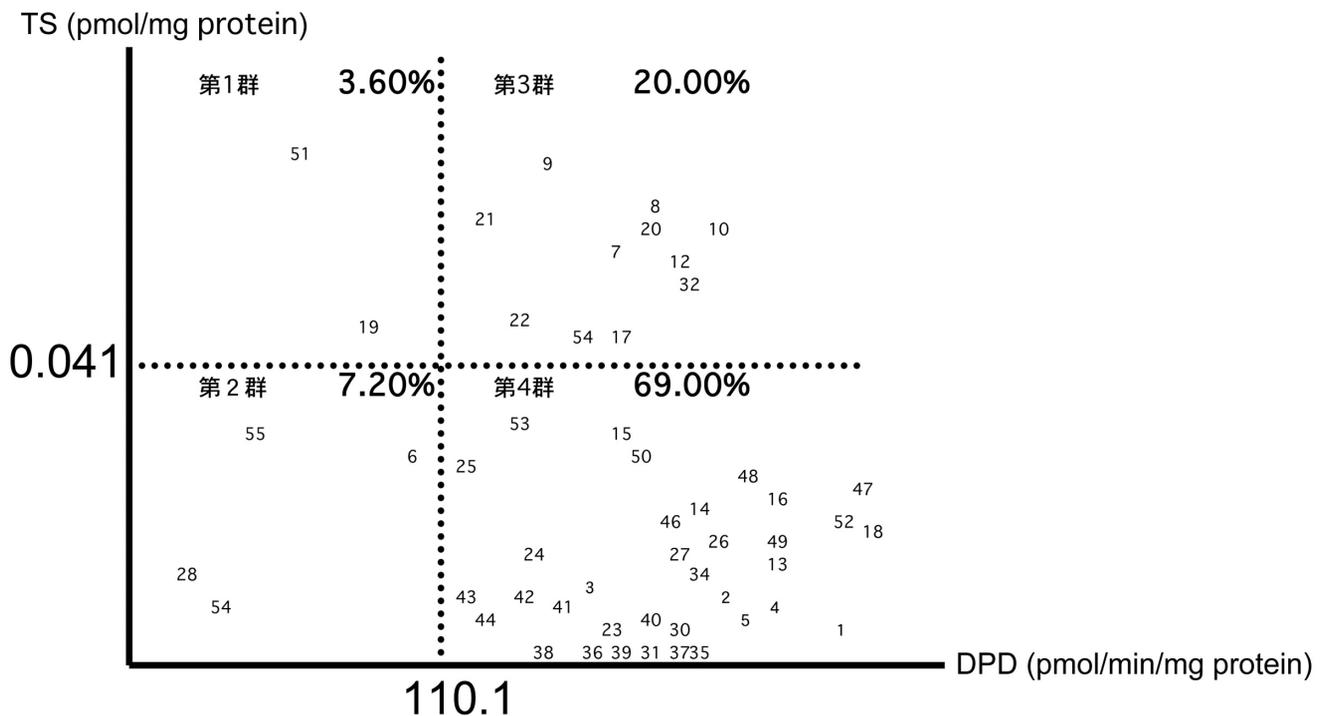


図 11. 正常組織, 癌組織におけるTS活性値, DPD活性値の分布.

織内DPD活性は他の癌に比べて3倍以上の活性を示しており、DPD活性値と予後の間に何らかの関係を見出せる可能性は考えられる。癌組織の免疫組織学的染色ではTS染色、DPD染色いずれも染色陽性例で活性値が高い傾向にあり酵素活性と酵素の発現には関係がみられた。したがって、免疫組織染色によりTS、DPDが陽性であれば、活性値もそれに応じて高いものと考えてよいと示唆される。ただし、DPD染色では組織の不均一性が目立ちDPD染色陽性例であっても組織の一部に陰性部分が混在している症例があり採取標本の違いにより染色と活性値にばらつきのある可能性があり注意を要すると思われた。さらに、細胞分裂周期を反映するKi-67, cyclinAを使用した免疫組織染色では、TS染色陽性例ではKi-67, cyclinAともに陽性が多く、DPD染色陽性例でも同様であり、TS、DPDとKi-67, cyclinAに関連が示され、こうした染色や活性値が増殖細胞のマーカーのKi-67, 細胞合成期のマーカーのcyclinAをよく反映しており、細胞分裂周期に基づいて現れていることが確認された。

TS活性値、DPD活性値の基準値による分類では第4群すなわちTS活性低値、DPD活性高値群が69%を示しており、Fukushimaらが報告している2592例の結果とほぼ同様であった。すなわちTS活性低値、DPD活性高値が多いことにより、5-FU系抗癌剤の効きにくい癌が多いことが分かる。ただDPD活性高値群の中でも組織の不均一性が目立ち組織の一部に陰性部分が混在している症例も含まれており、その陰性部分を究明することにより5-FU系抗癌剤の有効性も上昇すると考えられる。

結 論

- 1) 肺癌組織内TS活性、DPD活性は正常肺組織より高値であり、特に肺癌組織内DPD活性が高かった。
- 2) 胃癌、大腸癌、乳癌に比べて肺癌では組織内TS活性は低く、DPD活性は高かい傾向にあった。
- 3) TS、DPD活性値と予後とに関連は見出せなかったが、無再発生存例では同一症例において正常組織に比べた肺癌組織におけるDPD活性の上昇がほかの症例より4倍程度に抑えられていた。
- 4) 免疫染色によるTS、DPD陽性例は陰性例より組織内TS、DPD活性値が高い傾向にあった。
- 5) DPD陽性例の免疫染色では組織内に陰性部分が不均一に広がっている症例が多かった。

以上より、肺癌組織においてはTS、DPDの発現には特徴がみられたが、症例によるばらつきも多く、活性値と予後の間に一定の関連は見出せなかった。TS、DPD活性値の検討によりTS活性高値、DPD活性低値の集団が特定できれば、有効な5FU系抗癌剤選択も可能になると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり直接ご指導、ご校閲をいただきました埼玉医科大学呼吸器外科金子公一助教授に深謝いたします。また免疫染色について直接御指導頂いた病理学教室清水禎彦講師、後藤義也助手に深謝いたします。またTS・DPD活性値の測定に際して御協力頂いた大鵬薬品工業薬剤応答解析研究所に感謝いたします。

引用文献

- 1) Hiroyasu S, Shiraishi M, Samura H, Tokashiki H, Shimoji H, Isa T, et al. Clinical relevance of concentrations of both pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) and dihydroprimidine dehydrogenase (DPD) in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2001;31:65-8.
- 2) Hisamitsu K, Fukuda K, Oka S, Yamaguchi K, Katano K, Ikeguchi M, et al. Immunohistochemical study dihydroprimidine dehydrogenase (DPD) and p53 in biopsied specimens of esophageal cancer before chemoradiotherapy. *Jpn J Cancer Chemother* 2001;28:1527-9.
- 3) Takanishi K, Matsumoto J, Minami T. Thymidine phosphorylase expression in hepatic metastasis from colorectal carcinoma. *Jpn J Cancer Chemother* 2001;28:1519-22.
- 4) Hoque MO, Kawamata H, Nakashiro K, Omotehara F, Shinagawa Y, Hino S, et al. Dihydroprimidine dehydrogenase mRNA level correlates with the response to 5-fluorouracil-based chem-immuno-radiation therapy in human oral squamous cell cancer. *Int J Oncol* 2001;19:953-8.
- 5) Ho DH, Townsend L, Luna MA, Bodey GP. Distribution and inhibition of dihydroprimidine dehydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as a substrate. *Anticancer Res* 1986;6:781-4.
- 6) Okayasu T, Sugiyama K, Miyauchi S. Inhibition of catabolic pathway of 5-fluorouracil by 3-cyano-2,6-dihydroxypyridine in human lung cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 1999;85:2386-9.
- 7) Higashiyama M, Kodama K, Yokochi H, Takami K, Fukushima M, Minamigawa K, et al. Thymidylate synthase and dihydroprimidine dehydrogenase activities in non-small cell lung cancer tissues: relationship with in vitro sensitivity to 5-fluorouracil. *Lung cancer* 2001;34:407-16.
- 8) Okabe H, Arakawa K, Takechi T, Fukushima M. Expression of recombinant human dihydroprimidine

- dehydrogenase and its aprepation of anti-DPD antibodies for immunochemical detection. *Jpn J Cancer Chemother* 2000;27:891-8.
- 9) Okabe H, Tsujimoto H, Fukushima M. The correlation between thymidylate synthase expression and cytotoxicity of 5-fluororacil in human cancer cell lines :study using antibody against recombinant human thymidylate synthase. *Jpn J Cancer Chemother* 2000;24:705-12.
- 10) Huang CL, Yokomise H, Kobayashi S, Fukushima M, Hitomi S, Wada H. Intertumoral expression thymidylate synthase and dihydroprimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy. *Int J Oncol* 2000;17:47-54.
- 11) Yano T, Koga T, Ninomiya S, Takeo S. Dihydroprimidine dehydrogenase levels in non-small-cell lung cancer tissues. *J Clin Oncol* 2002;7: 361-4.
- 12) Fukushima M, Morita M, Ikeda K, Nagayama S. Population study of expression of thymidylate synthase and dihydroprimidine dehydrogenase in patients with solid tumors. *Int J Mol Med* 2003;12:839-44.
- 13) Wada H, Hitomi S, Teramatsu T. Adjuvant treatment of early stage non-small-cell lung cancer. *Oncology (Huntingt)* 1999;13(7 Suppl 3):102-5.