

## *p53* 遺伝子変異からみた肺がんの組織型別、 亜型別発がん原因の相違

土屋 永寿\*

### はじめに

我が国において、肺がんは最も発生率、死亡率の高いがんの一つで、現在も発生率、死亡率とも増加している。このため、その発がん原因や発がん機序を明らかにすることは、がんの予防にとって重要である。また、発がん原因の違いから生じる発生部位の違いや、組織学的特徴の違いを明らかにすることで早期発見にも応用可能である。

肺がんの原因として現在喫煙が重要視されているが、それは扁平上皮がんや小細胞がんにあてはまることであって、男女合わせて肺がんの約 50% を占める腺がんでは喫煙との関係が弱い。このため、腺がんの発がん原因については現在多くの議論がある。我々は、腺がんは組織型が多彩であることから、組織亜型により喫煙との関係が異なるのではないかと、この仮説を持っている。また、扁平上皮がんについてみると、従来肺門部の太い気管支に発生するものが多いとされてきたが、近年、末梢肺組織に発見される扁平上皮がんが多くなっている。その原因として、たばこに含まれるニコチンやタールの含量が減少し、たばこ煙を深く吸い込むこと、或は自動車の排気ガスなど、喫煙以外の外因性発がん物質の寄与の拡大が推測されている。しかし、これまで扁平上皮がんは発生部位の違いによって、発がん機序が異なるか否かについて人体材料を用いた検討はなされていない。

*p53* 遺伝子は肺がんでも最も高頻度に遺伝子変

異が報告されている遺伝子で、変異の頻度、塩基変異の種類（スペクトラム）、および、DNA 2 重鎖における strand bias から、発がん原因を特定できるといわれている。即ち、CpG 部位の G/C→A/T 変異（CpG→A）は内因性の原因で生じ strand bias を示さない、G/C→T/A 変異（G→T）は外因、殊にたばこ煙中の発がん物質により生じ、strand bias を示す一非転写鎖に偏って変異が認められる一とされている。そこで、喫煙歴の明らかな切除肺腺がんと扁平上皮がん、計 300 例以上を集め、腺がんは亜型に分類、扁平上皮がんは発生部位別に分類し、全症例の *p53* 遺伝子変異を解析し、それらと喫煙歴との関係を検討して、それぞれの発がん原因や発がん機序の相違を明らかにすることを試みた。

### 検索症例、遺伝子解析方法、及び喫煙歴

癌研病院で切除された非小細胞肺がん 313 例（扁平上皮がん 74、腺がん 239）を検索した。喫煙量は一日の喫煙本数×喫煙年数（SI）で計算し、SI 0 を非喫煙者、喫煙者は SI 1-400 を軽喫煙者、400 以上を重喫煙者とした。*p53* 遺伝子の検索は、腫瘍凍結材料より DNA を抽出し、PCR でエクソン 4-8、10 を増幅し、SSCP 後、シーケンスを行った。なお、このように一施設同一基準で手術された 300 例以上の症例を、同じ病理医が診断し、*p53* 遺伝子解析した報告は世界でも認められない。

倫理面への配慮については、特定の個人が同定されないように、連結可能匿名化して解析を行った。

\* 神奈川県立がんセンター臨床研究所

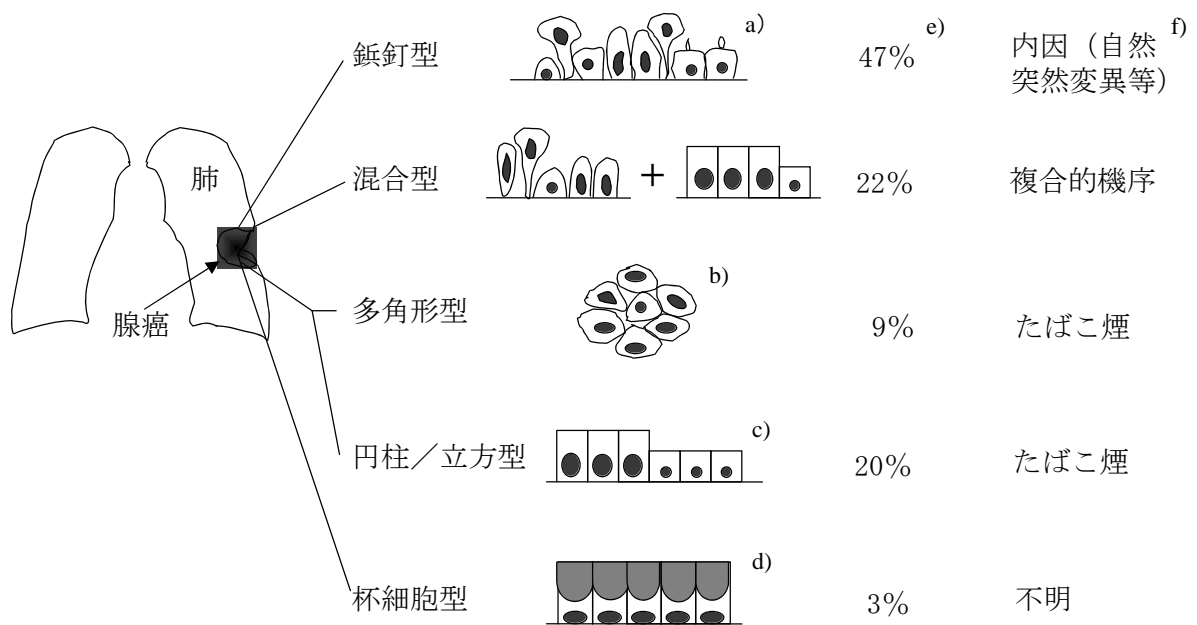


図-1 肺腺がんの細胞型と主たる発がん原因

- a) 腫瘍細胞は肺胞 2 型或はクララ細胞に類似し、内腔に接する面は胞体がドーム状に突出するか或は分泌像を示す。
- b) 多角形細胞が充実性に増殖し、胞体内には粘液を有することが多い。
- c) 腫瘍細胞は円柱/立方状で、内腔に接する面は平坦である。
- d) 杯細胞に類似し、胞体内に豊かな粘液を有する。
- e) 発生頻度。
- f) 主たる発がん原因。

### 前提の検討

CpG→A 変異は内因で生じ、G→T 変異は外因、殊にたばこ煙中の発がん物質により生じる、との前提が正しいことを確認するため、全症例の *p53* 変異結果と喫煙歴との関係を検討した。その結果、*p53* 変異頻度と G→T 変異は、喫煙者の方が非喫煙者よりも有意に高く、CpG→A 頻度は非喫煙者に有意に高かった。また、G→T 変異は strand bias を示し、CpG→A は strand bias を示さなかった。即ち、前提は正しく、我々の症例にあてはまると考えられた。

### 腺がんの細胞型別発がん原因の相違

切除腺がん 239 例は、1998 年の WHO 腺がん

細胞型分類及び細胞型分類を用いて分類した (図-1)。細胞型分類は我々が提唱している分類で、腺がんを構成する細胞を形態から、鉸釘、円柱/立方、杯細胞、多角形型、に分け、一つの腺がんにおいて優勢な細胞型が 70% 以上を占める場合、その型に分類し (多角形型とする場合は 90% 以上)、劣勢な細胞型が 30% 以上認められた場合には混合型としたものである<sup>1)</sup>。今回の症例における各細胞型の頻度は、鉸釘型が最も多く 47%、次いで混合型 22%、円柱型 20%、の順で、多角形型は 9%、杯細胞型は 3% と少なかった。

細胞型に分類した場合：

- 喫煙率との関係を見ると、喫煙率が低い鉸釘型 (42%)、混合型 (49%) グループと、喫

煙率が高い多角形型（85%）、円柱型（87%）グループに二分された（両グループの差は統計学的に有意である）。

- *p53* 変異頻度についてみると、前者のグループ（鋸釘型 28%、混合型 41%）は後者のグループ（多角形型 60% と円柱型 71%）より変異頻度が低かった（一部は統計学的に有意差あり）。
- 変異スペクトラムについて見ると、鋸釘型では CpG→A 変異が、円柱型では G→T 変異が、混合型ではその他の変異が最も高く、多角形型は円柱型と類似した変異パターンを示していた（一部は統計学的に有意差あり）。

なお、杯細胞型は喫煙率、*p53* 変異率とも混合型に類似していた。

以上をまとめると、鋸釘型では、喫煙との関係が弱く、*p53* 変異頻度が低く、CpG→A 変異が高かったことから、内因が主たる発がん原因であり、円柱型と多角形型、特に円柱型は、喫煙との関係が強く、*p53* 変異率が高く、G→T 変異が高かったことから、たばこ煙中の発がん物質の直接的な作用が主たる発がん原因であり、混合型は、喫煙との関係が弱く、*p53* 変異頻度も低い、その他の塩基変異が高かったことから、複合的な要因により発生している、と考えられた。なお、WHO 分類を用いた場合、*p53* 変異頻度で亜型を二分できたが、変異スペクトラムの分布には亜型間に差を認めなかったことから、亜型別発がん原因の相違は明瞭ではなかった。

### 研究の特色と意義

1) 組織を構成する細胞の形態は、遺伝子産物の総和で決定されている。実際、遺伝子発現或はタンパク質発現を網羅的に検索する方法で肺がんを解析した結果、遺伝子および蛋白発現パターンによる分類は、形態による組織分類（腺がん、扁平上皮がん等の区別）と良く一致していた<sup>2)3)</sup>。即ち、形態による分類は、遺伝子発現の特徴をよく反映している。発がん物質は、物質特有の遺伝子変異を引き起こすと考えられる

ので、その結果は形態に表れると考えられる。今回の我々の腺がんの細胞亜型と発がん原因とが相関していたことは、このことを反映したものと考えられた。なお、これまで腺がんの細胞形態により発がん原因が異なるのではないかとの仮説で、両者の関係を検討した報告は無い。

2) 腺がんでは、喫煙以外の因子が主たる発がん原因であると考えられる症例（鋸釘型と混合型）が約6割存在することから、今後はこれらの細胞亜型に焦点を絞って発がん機序を明らかにすることが、腺がんの予防にとって重要であると思われた。

3) 早期発見への応用として、鋸釘型腺がんは細気管支肺胞上皮がん類似した増殖パターンを示すことから、非喫煙者の場合にはCT像でスリガラス様陰影の有無に注意を払って観察すること、また、細胞診に際して、非喫煙者であれば鋸釘形態の、喫煙者であれば円柱/立方状の、異型細胞出現に注意を払って観察することを指摘できる。

4) 今後の課題として、肺がんでは知られている複数の遺伝子異常を検索して、細胞形態との関連を実証できれば、遺伝子発現の相違が細胞型の相違として表現されているとの説を強く支持することができる。また、腫瘍の生物学的動態も遺伝子発現、或は、タンパク質発現の組み合わせで決定されていることから、細胞亜型から腺がんの生物学的動態を掌握し、悪性度や薬剤に対する反応性をある程度推測することや、細胞亜型別に悪性度や薬剤反応性に関係する遺伝子変異を検索することにより、より容易に責任遺伝子を同定することが可能と考えられる。

### 扁平上皮がんの発生部位別発がん原因の相違

切除扁平上皮がん 74 例を用いて検討した。発生部位については、腫瘍の中心が主気管支—区域支と思われるものを肺門型（23 例）、亜区域支—亜区域支と思われるものを中間型（17）、より末梢と思われるものを末梢型（31）の3型に分類した。非喫煙者は8名、喫煙者は66名で、この内軽喫煙者は3名、重喫煙者は63名であっ

た。

発生部位別の *p53* 変異頻度は、肺門型 61%、中間型 71%、末梢型 58% で差を認めなかった。しかし、部位別に CpG→A、および、G→T の頻度を比較すると、CpG→A は肺門型で 40% と最も高く、中間型 (0%) とは有意に異なり、末梢型 (14%) とは有意に異なる傾向が認められた。G→T は中間型 (50%) で最も高く、末梢型 (19%) より有意に高い傾向が認められ、肺門型は 27% であった。その他の変異は末梢型で最も高く (67%)、肺門型 (33%) とは有意差を認めた。喫煙率は、全体では 90% で部位による差は認められなかったが、SI 400 以上の重喫煙者の率は中間型で最も低く (65%)、肺門型 (96%) や末梢型 (90%) と有意差を認めた。

即ち、肺門型では重喫煙者が多いにもかかわらず内因により発生するがんが、中間型では喫煙量が少ないにもかかわらず喫煙が原因のがんが、末梢型では様々な原因によるがんが相対的に多い、との結果が得られた。

### 研究の特色と意義

1) 我々の結果は、従来の扁平上皮がんの発がん説と大きく異なる点がある。これまで肺門型扁平上皮がんは、たばこ煙中に含まれる発がん物質が気道上皮の DNA に直接作用して DNA アダクトを作ることにより発生する、と考えられてきた。しかし、今回の *p53* 変異スペクトラムの解析結果から、肺門型では重喫煙者が多いにも関わらず内因が原因で発生したと考えられる腫瘍の割合が他部位より多いことが明らかとなった。この理由として、たばこ煙中の微粒子はいわゆる “hot spot” として気管・気管支分岐部に集積するが、より末梢の分岐部ほど高濃度に、或は、気管支末梢に大部分、集積する。一方、肺門部ではクリアランスが良く、微粒子の沈着・蓄積が起りにくいと報告されている。このため、肺門部では他の部位より DNA アダクトの産生が少なくなっていることが原因ではないか、と考えられた。中間型では、重喫煙者が最も少なかったにも関わらず、喫煙 (外因性発が

ん原因) による変異が最も多かった。その原因は、中間部の気管支にたばこ煙中の発がん物質を含んだ微粒子がより多く沈着するためと推測された。末梢型では様々な原因によると考えられる扁平上皮がんが最も多かった。末梢気管支では、粘膜の線毛運動が中枢に比べ低いこと、および、慢性炎症で末梢気道粘膜が損傷され排痰機構に破綻をきたしている場合があることなどから、様々な外因性発がん物質が末梢部に沈着していると推測される。このため、末梢発生扁平上皮がんでは発がん原因の多様化を招いているものと考えられた。以上、扁平上皮がんは発生部位により発がん機序が異なり、ことに、肺門部のがんでは発生に内因が重要であることを明らかにした<sup>4)</sup>。

2) 早期発見への応用としては、気管支鏡検査にあたって、軽喫煙者の場合、特に亜区域支から亜区域支部分を入念に観察することを指摘できる。

3) 今後の課題として、肺門型がんでは重喫煙者が多いにもかかわらず内因性機序による発がんが考えられたことから、たばこ煙の内因性発がん機序に与える未知の影響を解明することが重要である。

### 文 献

- 1) Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, Ishikawa Y, Nakagawa K, Hayashi J, Tsuchiya E. Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiologic factors: evidence from *p53* mutational spectra. *Am J Pathol* 2000; 157: 2133-41.
- 2) Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RI, Altman RB, Brown PO, Botstein D, Petersen I. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13784-9.
- 3) Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2003; 362: 433-9.
- 4) Shimmyo T, Hashimoto T, Kobayashi Y, Miyagi Y,

Ishikawa Y, Nakagawa K, Osada H, Tsuchiya E.  
*p53* mutation spectra for squamous cell  
carcinomas at different levels of human  
bronchial branches. Int J Cancer 2006; 119:  
501-7.