

原 著 肺癌組織内 TS 活性と喫煙に関する検討

昭和大学医学部外科学講座（呼吸器外科学部門）

植松 秀護* 北見 明彦 鈴木 浩介
高宮新之介 佐野 文俊 大橋 慎一
田中 洋子 神尾 義人 氷室 直哉
片岡 大輔 山本 滋 鈴木 隆
門倉 光隆

抄録：Thymidylate synthase (TS) は DNA 合成の律速酵素である。TS はがん細胞の活動性および悪性度との関係性が示されている。また腫瘍内の TS の活性レベルの上昇は TS 阻害薬の治療抵抗性と予後に関連していることが報告されているが、喫煙が TS 活性に及ぼす影響は十分に解明されていない。本研究は、喫煙が原発性肺癌における腫瘍内 TS 活性値にどのような影響を与えるのかを調べることを目的に、肺癌手術で得られた腫瘍内の TS の活性値と喫煙の関係を臨床病理学的背景の側面から検討し、また喫煙状況による TS の活性値と予後について検討した。昭和大学呼吸器外科で原発性肺癌手術を行った 113 例を対象とした。手術検体の薄切切片から RT-PCR を用いて TS の mRNA の発現量を測定し、各因子との関係を検討した。対象のうち Adenocarcinoma (Ad) が 68 例で、Squamous cell carcinoma (Sq) が 45 例であった。全 Sq の TS 活性値は全 Ad より高値であった ($p=0.0276$)。喫煙歴のある Ad (35 例) と Sq (43 例) の喫煙量の中央値は、それぞれ 45 pack-years, 50 pack-years であった。喫煙者の Sq の TS 活性値は喫煙者の Ad に比べ高くなる傾向があった ($p=0.0047$)。喫煙者の Ad における TS 活性値は、喫煙量が 45 pack-years 以上の群の方が、45 pack-years 未満の群に比べ高値であった ($p=0.0187$)。Ad 全体では、喫煙歴の有無での TS 活性値の差はみられなかった。また喫煙者の Sq における TS 活性値は、喫煙量で差はみられなかった。喫煙歴のある Sq における TS 活性値は、腫瘍径が 30 mm より大きい群は、30 mm 以下の群に比べ高値であった ($p=0.0186$)。喫煙状況と予後には明らかな関係は見られなかった。しかし腫瘍径が 30 mm より大きい群においては、TS 活性値の高値群で予後が良い傾向が見られ、術後補助化学療法や再発時治療の影響が推測された。以上の結果から TS 活性値を高くする影響を持つ因子は、喫煙者の Ad では喫煙量、喫煙者の Sq では腫瘍径であることが示された。本研究で、Ad においては喫煙量が TS 活性値に影響を与えている可能性が示唆された。

キーワード：肺癌, Thymidylate synthase (TS), 喫煙, 予後

緒 言

タバコの煙の中には 50 種類を超える発癌性が疑われる物質が含まれ、発癌の外的要因とされるが、そのメカニズムは未だ明らかではない。加えて、喫煙が発生した癌にどのような悪性度を獲得させてい

るのか、未だ明らかではない。Thymidylate synthase (TS) は、deoxyuridine monophosphate を deoxythymidine monophosphate に変換する際の律速酵素で、DNA の合成と修復に不可欠な酵素で、悪性腫瘍では TS の活性が高いことが報告されている¹⁻³⁾。この TS を阻害し抗腫瘍効果を得る

*責任著者

Pemetrexed や 5-FU などの TS 阻害薬¹⁾は、肺癌の治療薬として広く用いられている。腫瘍の TS の活性レベルの上昇は TS 阻害薬に対する治療抵抗性と予後に関連している⁴⁻⁶⁾ことが報告されているが、喫煙が TS 活性に影響を与えているかは十分に解明されていない。そこで、本研究は喫煙が癌細胞の細胞増殖力に関わる TS に与える影響について調べることを目的とした。肺癌手術で得られた腫瘍内の TS 活性値と臨床病理学的因子と予後の関係に対し、喫煙状況の関与について検討した。

研究方法

1998 年から 2007 年の間に昭和大学呼吸器外科の 3 施設（昭和大学病院、昭和大学横浜市北部病院、昭和大学藤が丘病院）で、根治的治療を目的に肺切除を行った Adenocarcinoma (Ad) と Squamous cell carcinoma (Sq) の計 113 例を対象とした。患者情報（性別、年齢、喫煙歴、組織型、切除検体における腫瘍径、病理病期、癌治療歴、予後）は診療記録から収集した。

喫煙に関しては、禁煙時期、期間を問わず、過去 5 pack-years 以上の喫煙量を有する者を喫煙者とし、機会喫煙程度および 5 pack-years 未満の喫煙量は一般的に生物学的障害の影響が低いため、非喫煙者と定義した。喫煙量は肺癌と診断される時点までの暴露量として、pack-years (1 日のタバコの箱数×喫煙年数) で算出した。

腫瘍径はホルマリン固定後の原発巣の最大断面での長径とした。病理病期は UICC 7 版に準拠して分類した。術後補助化学療法ならびに再発時治療の治療選択および薬剤選択、さらに定期検査の間隔は各々の主治医の判断に任せられた。

TS 活性値は、手術で摘出された腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 10 μm 厚の薄切切片を作成し、Laser captured microdissection 法⁷⁾で腫瘍細胞のみを採取した。腫瘍細胞に含まれる TS の mRNA 発現量と、内部標準となる β-actin の mRNA をそれぞれ realtime PCR 法 (31 サイクル) で半定量し (Dannenberg tumor profiling 法⁸⁾)、β-actin の mRNA 量に対する TS の mRNA 量を TS 活性値とした。

臨床病理学的因子と TS 活性値の影響の評価はロジスティック回帰分析を用い、2 群間の比較は

Wilcoxon 検定を行った。喫煙量と TS 活性値の相関関係は Spearman の順位相関係数を用いた。累積生存率は Kaplan-Meier 法を用い、手術日を起点として無再発生存期間 (DFS: disease-free survival) ならびに生存期間 (OS: overall survival) からそれぞれ算出した。生存時間の解析は Log-rank 検定を用いた。なお、各検定の有意水準は 5% とし、解析ソフトには JMP[®] 9; SAS Institute., Cary, NC, USA) を用いた。本研究は各病院の倫理委員会、すなわち医の倫理委員会 (承認番号 367 号)、医学研究審査委員会 (承認番号 2006514)、倫理委員会 (承認番号 0607-04) で承認を得て行った。患者からは文書にて同意を得た。

結 果

1. 臨床病理学的背景

臨床病理学的背景を Table 1 に示す。対象となった 113 例はすべて日本人であった。喫煙者 78 例 (69%)、非喫煙者 35 例 (31%)。最終病理診断は Ad が 68 例 (60%)、Sq が 45 例 (40%) であった。Ad の喫煙者は 68 例中 35 例 (51.5%)、Sq の喫煙者は 45 例中 43 例 (95.5%) であった。喫煙者における喫煙量は、Ad が中央値 45 pack-years (平均 48.0 pack-years, 標準偏差 25.5, 範囲 5-125 pack-years) で、Sq が中央値 50 pack-years (平均 55.3 pack-years, 標準偏差 30.0, 範囲 5-135 pack-years) で、両群間に差は見られなかった ($p=0.3074$)。腫瘍径は 30 mm 以下が 43 例 (38%) で、30 mm より大が 70 例 (62%) であった。腫瘍径が 30 mm 以下の Ad は 68 例中 28 例 (41%) で、Sq は 45 例中 15 例 (33%) であった。病理病期は I 期 51 例 (45%)、II 期 31 例 (27%)、III 期 26 例 (23%)、IV 期 5 例 (4%) であった。IV 期の 5 例は全例悪性胸水で、Ad が 3 例、Sq が 2 例であった。なお、I 期の Ad は 68 例中 34 例 (50%)、Sq は 45 例中 17 例 (37.8%) であった。観察期間の中央値は 46 か月であった (平均 60.8 か月, 標準偏差 46.6, 範囲 0~192 か月)。術後補助化学療法を選択されたのは、Ad が 22 例 (32.3%)、Sq が 10 例 (22.2%) で、このうち TS 阻害薬である UFT の投与を行ったのは Ad が 15 例、Sq が 6 例であった。術後再発は、Ad で 68 例中 33 例 (48.5%)、Sq で 45 例中 24 例 (53.3%) であった。再発時化学療法は 27 例に行われ、TS 阻害薬を用

Table 1 Patient's clinical and pathological characteristics

		Total N (%)
All		113
Age (mean ± S.D.; 65.7 ± 9.49)	>65 year	67 (59)
	≤65 year	46 (41)
Gender	Male	81 (72)
	Female	32 (28)
Histological type	Ad	68 (60)
	Sq	45 (40)
Smoking status and smoking dose	Non smoker	35 (31)
	Ad	33 (29)
	Sq	2 (2)
	Smoker	78 (69) 47, 5 -135, (52.0 ± 28.1) [†]
	Ad	35 (31) 45, 5 -125, (48.0 ± 25.5) [†]
Sq	43 (38) 50, 7.5-135, (55.3 ± 30.0) [†]	
Tumor size	>30 mm	70 (62)
	≤30 mm	43 (38)
P-stage	1 (1A+1B)	51 (45)
	2 (2A+2B)	31 (27)
	3 (3A+3B)	26 (23)
	4	5 (4)
Recurrence	Yes	59 (52)
	No	54 (48)
Death of cancer	Yes	45 (40)
	No	68 (60)

Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma;[†], smoking dose: median, range (average ± SD)

いた症例は Ad が 2 例, Sq が 2 例であった。原病死は Ad で 68 例中 27 例 (39.7%), Sq で 45 例中 18 例 (40%) に見られた。術後補助化学療法が全 113 例中 32 例 (23%), 腫瘍径が 30 mm より大きい群で 67 例中 22 例 (33%) が行われており, 22 例中 14 例 (64%) に TS 阻害薬 (UFT[®]) が選択されていた。

2. TS 活性値と各病理学的因子の検討

臨床病理学的因子と TS 活性値を Table 2 に示す。全 113 例の TS 活性値の中央値は 1.67 (平均 2.41, 標準偏差 2.50, 範囲 0.26~16.79) であった。全 113 例では, Sq が Ad より TS 活性値は高値であった ($p = 0.0276$)。しかし, 喫煙者における TS 活性値は Ad と Sq に差は見られなかった。その他, 腫瘍径・

病理病期・再発の有無・原病死の有無による TS 活性値に差は見られなかった。

肺癌組織内の TS 活性値に年齢・性別・喫煙状況・組織型・腫瘍径・病理病期の各臨床病理学的因子が与える影響を検討した。その手法にロジスティック回帰分析による単変量解析を用いた。臨床病理学的因子の各因子で予後が不良と考えられている要素 (Advantage) が, TS 活性値の高値群にどれほど属する可能性があるかを示す。検討する集団ごとに TS 活性値の高低を中央値で区分した。全 113 例におけるロジスティック回帰分析による単変量解析の結果を示す (Table 3a)。全 113 例では組織型が TS 活性値への影響を認め (オッズ比 3.04, $p = 0.0047$), Sq で TS 活性値が高くなる傾向があっ

Table 2 TS expression on the patient's clinical and pathological characteristics factor

		TS expression value Median (range, mean \pm S.D.)	<i>p</i> -value	
All		1.67 (0.26-16.79, 2.41 \pm 2.50)		
Age (mean \pm S.D.; 65.7 \pm 9.49)	>65 year	1.54 (0.26-16.79, 2.57 \pm 3.13)	0.5609	
	\leq 65 year	1.68 (0.35-12.82, 2.30 \pm 1.97)		
Gender	Male	1.70 (0.26-12.65, 2.38 \pm 2.03)	0.2474	
	Female	1.43 (0.35-16.79, 2.48 \pm 3.45)		
Histological type	Ad	1.42 (0.26-16.79, 2.32 \pm 2.79)	0.0276*	
	Sq	2.08 (0.38-12.65, 2.55 \pm 2.00)		
Smoking status and smoking dose	Non smoker	1.56 (0.26-16.79, 2.24 \pm 2.81)	0.3881	
	Smoker	1.69 (0.36-12.82, 2.49 \pm 2.36)		
	Ad	1.36 (0.36-12.82, 2.42 \pm 2.73)	0.8995	
	Sq	2.09 (0.38-12.65, 2.54 \pm 2.04)		
Tumor size	>30 mm	1.93 (0.26-12.65, 2.35 \pm 1.94)	0.1795	
	\leq 30 mm	1.30 (0.38-16.79, 2.51 \pm 3.23)		
P-stage	1 (1A+1B)	1.71 (0.35-12.82, 2.66 \pm 2.64)	1vs2~4	0.5629
	2 (2A+2B)	1.95 (0.26- 7.16, 2.11 \pm 1.60)	1vs2	0.5063
	3 (3A+3B)	1.30 (0.36-16.79, 2.27 \pm 3.19)	1vs3	0.1980
	4	1.69 (0.55- 4.6, 2.48 \pm 1.69)	1vs4	0.7739
Recurrence	Yes	1.67 (0.36-12.65, 2.50 \pm 2.27)	0.7399	
	No	1.68 (0.26-16.79, 2.37 \pm 2.79)		
Death of cancer	Yes	1.59 (0.36- 7.34, 2.22 \pm 1.77)	0.7761	
	No	1.76 (0.26-16.79, 2.54 \pm 2.89)		

TS, thymidylate synthase; Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma

た。また腫瘍径が大きいほど TS 活性値が高くなる傾向があった (オッズ比 2.80, $p=0.0091$)。喫煙の有無と TS 活性値に傾向は見られなかった。そこで組織型別に個々の因子の TS 活性値への影響を検討した (Table 3b)。Sq では腫瘍径が TS 活性値に影響を与えており、腫瘍径が大きいほど TS 活性値が高くなる傾向があった (オッズ比 4.75, $p=0.0186$)、しかし Ad では腫瘍径が TS 活性値に与える影響はなかった。その他、年齢・性別・喫煙状況・病理病期では影響が見られなかった。次に喫煙の影響を見るために、喫煙状況の違いによる TS 活性値の影響を検討した (Table 3c)。喫煙者の Ad で喫煙量の増加により TS 活性値が高くなる傾向があった (オッズ比 4.77, $p=0.0266$)。一方で、喫煙者の Sq では喫煙量に TS 活性値が高くなる傾向は見られなかった。喫煙者の Sq では腫瘍径が大きいほど TS

活性値が多くなる傾向が見られたが (オッズ比 4.75, $p=0.0186$)、喫煙者の Ad では腫瘍径により TS 活性値が高くなる影響は見られなかった。そこで喫煙量の増加により TS 活性値が高くなる傾向が見られた喫煙者の Ad に対し、喫煙量の中央値で 2 群間の検討を行った。喫煙量が 45 pack-years 以上の群の方が、45 pack-years 未満の群に比べ高値であった ($p=0.0187$)。また Ad の喫煙者の喫煙量と TS 活性値には弱い相関を認めた (Spearman の順位相関係数 $p=0.3179$)。喫煙者の Ad と Sq における喫煙量と TS 活性値の分布を示す (Fig. 1)。以上の結果から、TS 活性値を高くする影響を持つ因子は、喫煙者の Ad では喫煙量、喫煙者の Sq では腫瘍径であることが示された。

3. TS 活性値と予後の検討

TS 活性値に応じて TS 活性値に影響を与えた因

Table 3a Univariate analysis (logistic regression) of TS expression among all patients

	Risk factor	Category	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> value
		Advantage (N)/Disadvantage (N) ^{††}		
All	Age	≥65 (67)/ <65 (46)	1.19 (0.56-2.54)	0.3638
	Sex	Male (81)/ Female (32)	1.22 (0.53-2.79)	0.6335
	Smoking status	Smoker (78)/ Non smoker (35)	1.11 (0.50-2.49)	0.7899
	Histological type	Sq (45)/ Ad (68)	3.04 (1.40-6.80)	0.0047*
	Tumor size	>30 mm (70)/ ≤30 mm (43)	2.80 (1.29-6.28)	0.0091*
	p-stage	Stage 2-4 (62)/ Stage 1 (51)	1.20 (0.57-2.53)	0.6299

TS, thymidylate synthase; Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma;^{††}, disadvantage indicated favorable factors on lung cancer

Table 3b Univariate analysis (logistic regression) of TS expression according to histopathological type

	Risk factor	Category	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> value
		Advantage (N)/Disadvantage (N) ^{††}		
Ad	Age	≥65 (36)/ <65 (32)	2.05 (0.78-5.49)	0.1438
	Sex	Male (40)/ Female (28)	1.28 (0.48-3.39)	0.6220
	Smoking status	Smoker (35)/ Non smoker (33)	0.89 (0.43-2.93)	0.8083
	Tumor size	>30 mm (40)/ ≤30 mm (28)	1.63 (0.62-4.38)	0.3237
	p-stage	Stage 2-4 (34)/ Stage 1 (34)	0.62 (0.24-1.61)	0.6232
Sq	Age	≥65 (31) / <65 (14)	0.70 (0.19-2.50)	0.5859
	Sex	Male (41) / Female (4)	3.47 (0.41-73.5)	0.2647
	Smoking status	Smoker (43) / Non smoker (2)	1.05 (0.04-27.6)	0.9743
	Tumor size	>30 mm (30)/ ≤30 mm (15)	4.75 (1.29-20.7)	0.0186*
	p-stage	Stage 2-4 (28)/ Stage 1 (17)	0.61 (0.17-2.03)	0.4191

TS, thymidylate synthase; Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma;^{††}, disadvantage indicated favorable factors on lung cancer

Table 3c Univariate analysis (logistic regression) of TS expression according to smoking status

	Risk factor	Category	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> value
		Advantage (N)/Disadvantage (N) ^{††}		
Ad Non smoker	Age	≥65 (22)/ <65 (11)	1.44 (0.34-6.41)	0.6222
	Sex	Male (9)/ Female (24)	1.24 (0.27-6.17)	0.7759
	Tumor size	>30 mm (17)/ ≤30 mm (16)	1.13 (0.28-4.49)	0.8658
	p-stage	Stage 2-4 (16)/ Stage 1 (17)	0.89 (0.22-3.51)	0.8658
Ad Smoker	Age	≥65 (14)/ <65 (21)	2.40 (0.61-10.3)	0.2116
	Sex	Male (31)/ Female (4)	3.64 (0.41-78.2)	0.2526
	Tumor size	>30 mm (23)/ ≤30 mm (12)	1.82 (0.48-7.86)	0.4032
	p-stage	Stage 2-4 (18)/ Stage 1 (17)	0.35 (0.08-1.33)	0.1245
	Smoking dose	≥45 pack-years (19)/ <45 pack-years (16)	4.77 (1.19-21.7)	0.0266*
Sq Smoker	Age	≥65 (29)/ <65 (14)	0.70 (0.19-2.50)	0.5859
	Sex	Male (41)/ Female (2)	3.47 (0.41-73.5)	0.2647
	Tumor size	>30 mm (29)/ ≤30 mm (14)	4.75 (1.29-20.7)	0.0186*
	p-stage	Stage 2-4 (27)/ Stage 1 (16)	0.61 (0.17-2.03)	0.4191
	Smoking dose	≥50 pack-years (22)/ <50 pack-years (21)	1.32 (0.39-4.45)	0.6496

TS, thymidylate synthase; Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma;^{††}, disadvantage indicated favorable factors on lung cancer

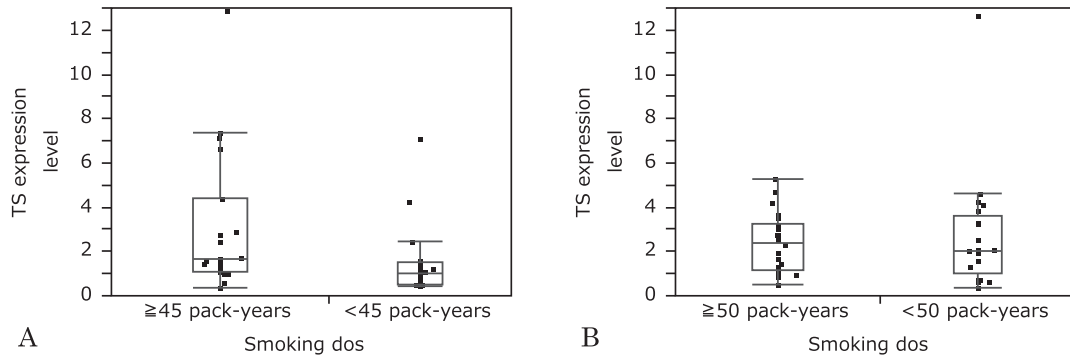


Fig. 1 Relationship between thymidylate synthase (TS) expression and smoking dose
 A) Among smokers with Adenocarcinoma, TS expression was higher in patients with a smoking status of ≥ 45 pack-years than with a smoking status of < 45 pack-years ($p=0.0187$).
 B) Among smokers with Squamous cell carcinoma, there was no difference in TS expression between patients with a smoking status of ≥ 50 pack-years compared with patients with a smoking status of < 50 pack-years ($p=0.6496$).

Table 4 5 year DFS and Overall survival rate according to TS expression

Prognostic factor	TS median	Category	5 year DFS rate (%)	p value	5 year survival rate (%)	p value
All	1.67	High (57)/low (56)	54.1/50.6	0.4764	64.2/61.9	0.5257
histopathological						
Ad	1.42	High (34)/low (34)	53.4/49.9	0.7754	59.3/68.8	0.5660
Sq	2.08	High (23)/low (22)	54.0/53.0	0.8833	63.3/58.7	0.8471
Smoking status						
Smoker	1.68	High (39)/low (39)	57.8/39.6	0.0599	70.4/53.7	0.1507
Non smoker	1.56	High (18)/low (17)	50.0/70.6	0.0619	55.6/76.0	0.5336

Ad Smoker	1.36	High (18)/low (17)	48.7/33.8	0.8170	61.6/60.9	0.9222
non smoker	1.55	High (17)/low (16)	53.4/68.6	0.2732	59.6/74.5	0.9690
Sq Smoker	2.08	High (22)/low (21)	60.1/50.4	0.7880	66.7/56.4	0.7653
Tumor size						
>30mm	1.93	High (35)/low (35)	49.3/40.4	0.0452*	60.5/51.6	0.0087*
≤ 30 mm	1.30	High (23)/low (20)	73.8/52.0	0.4329	89.4/58.0	0.2938
p-Stage						
Stage 2-4	1.61	High (31)/low (31)	38.3/44.1	0.2945	50.0/51.0	0.2945
Stage 1	1.71	High (26)/low (25)	69.0/61.0	0.6189	76.7/78.0	0.4520

TS, thymidylate synthase; Ad, adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma

子 (組織型・喫煙状況・腫瘍径) と術後5年間におけるDFSおよびOSの関係を検討した。進行度を含めた各因子の中でTS活性値を中央値による高値群と低値群の2群にわけ、ログランク検定による単変量解析を行った (Table 4)。またDFSのKaplan-

Meier 曲線を示す (Fig. 2)。全113例における術後5年間におけるDFSは、TS活性値高値群は56.3%、TS活性値低値群62.2%であり、両群間に差はみられなかった。OSではTS活性値高値群は64.2%、TS活性値低値群61.9%であり、両群間に

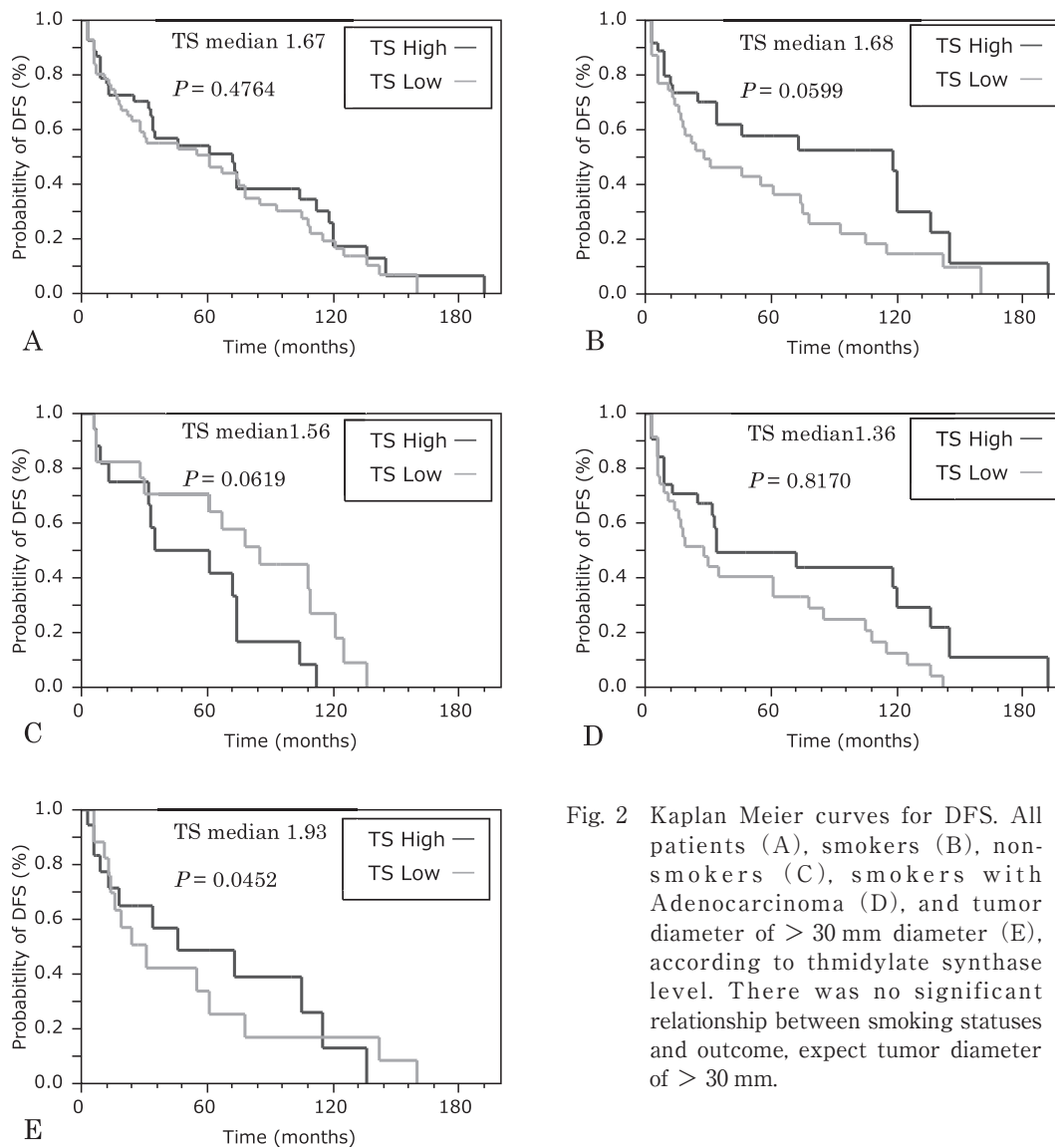


Fig. 2 Kaplan Meier curves for DFS. All patients (A), smokers (B), non-smokers (C), smokers with Adenocarcinoma (D), and tumor diameter of > 30 mm diameter (E), according to thymidylate synthase level. There was no significant relationship between smoking statuses and outcome, except tumor diameter of > 30 mm.

差はみられなかった。腫瘍径が30 mmより大きい群の中でのDFSはTS活性値高値群が49.3%、TS活性値低値群40.4%で差を認め ($p=0.0452$)、OSはTS活性値高値群が60.5%、TS活性値低値群51.6%で予後に差を認めた ($p=0.0087$)。その他、組織型・喫煙状況・病理病期に予後の差は見られなかった。しかしKaplan-Meier曲線から、喫煙歴の無い群ではTS高値群で予後が悪い傾向が見られたが、一方で喫煙歴がある群でTS活性値の高値群は予後が良い傾向が見られた。

考 察

われわれの研究により、喫煙者におけるAdの症例では、喫煙量の増加により肺癌組織内のTS活性値が高くなるリスクがあることが示された。免疫染色による定性評価であるが、喫煙者ではTS高発現例に差があること⁹⁾が報告されており、われわれの研究結果と矛盾しない。組織型の違いによるTS活性の比較では、AdよりSqではTS活性が高いことが報告されており¹⁰⁾、本研究の全体ではAdよりSqでTS活性は高値であり、同様の結果であった。

しかし、喫煙者のみに限定した場合には Ad と Sq の間に TS 活性に差は見られなかった。加えて、Ad における非喫煙者と喫煙者との間に TS 活性値に差は示せなかった。このことから、喫煙暴露により腫瘍内の TS 活性が調整される機序が喫煙者の Ad に存在することが示唆された。一方で、Sq また非喫煙者の腫瘍内 TS 活性は、喫煙暴露により調整される機序とは異なる機序が存在することが示唆された。

喫煙による TS 遺伝子変異の発現^{11, 12)}が報告されており、喫煙が TS 活性値に影響を及ぼす機序の 1 つとして考えられる。一つは TS の mRNA の転写安定性や TS の mRNA 発現レベルに関与する領域における異常で、非翻訳領域である 3'UTR の遺伝子変異である。この 1,494 番目に 6 bp の配列が欠失または挿入されているものがあり、6 bp が挿入された遺伝子変異では TS の mRNA 発現量が高く¹³⁾、肺癌の発症リスク因子であり、喫煙者、さらに重喫煙者であるほど、この遺伝子変異の発現頻度は高い¹⁴⁾。また TS 遺伝子配列の 5' 末端調節領域はプロモーター-エンハンサー領域において、2 回または 3 回の 28bp の繰り返し配列 (2R または 3R) が見られる遺伝子変異が報告されている。5' 末端調節領域の遺伝子変異と TS の mRNA 発現量の関係では、2R/2R または 2R/3R の遺伝子多型よりも 3R/3R の遺伝子変異の方が TS の mRNA 発現量が高く⁴⁾、また 2R の遺伝子変異に限定すれば、喫煙者では非 2R/非 2R の遺伝子変異が多い¹⁵⁾ことが報告されている。一方で、TS の遺伝子異常は喫煙だけでなく、葉酸摂取量、アルコール摂取量、人種間による頻度の差も指摘されている^{13, 14, 16)}が、本研究では葉酸摂取量およびアルコール摂取量については調査していない。以上の報告から、本研究における喫煙者の Ad において喫煙量により TS 活性値が増加した機序として、喫煙により腫瘍内 TS の mRNA の 3'UTR の遺伝子変異、または 5' 末端調節領域の遺伝子変異を有するがん細胞が生じたことで、TS の mRNA 発現量が増加したことが考えられた。しかし、これらの遺伝子変異が発癌メカニズムのスペクトラムの中でどの段階で獲得するものか、遺伝子変異の発現頻度と喫煙量に量-反応関係があるのか、また遺伝子変異の発現頻度に組織学的差があるのかは現時点で不明であり、今後のさらなる研究が望まれる。

腫瘍内 TS 発現量は正常組織と比較して高く¹⁶⁾、TS 発現量と腫瘍の悪性度が関係していることが示されている^{2, 3, 5)}。いくつかの研究で TS 発現量と予後との関係性が示されており、TS 発現量が高値の症例は予後不良とされる⁴⁻⁶⁾。本研究の全症例では TS 活性値の高値群と低値群で予後に差を認めなかった。しかしながら、腫瘍径が 30 mm より大きい群に限れば、TS 活性値が高値の方が予後良好であった。これらの結果は従来の報告と異なるが、その理由として二つの点が挙げられる。第一は対象症例の違いである。これまでの報告の対象症例は手術不能な肺癌患者を対象であるが、本症例は手術治療を行った患者を対象としていた。また本症例では術後補助化学療法が全 113 例中 32 例 (23%) に選択され、また再発 57 例中 26 例 (46%) に化学療法が行われていたことが、TS 活性値と予後の関係に影響を及ぼした可能性がある。第二は、本研究結果から喫煙者の Sq では腫瘍径が大きいほど TS 活性値が多くなる傾向が見られたため (Table 3c)、腫瘍径が 30 mm より大きい群には TS 活性値が高値の症例が多く存在した集団の可能性があり、TS 活性値と予後の関係に影響を及ぼした可能性がある。さらに、喫煙歴がある群で TS 活性値が高値の方が予後良好であった。喫煙歴のある群にはほとんどの Sq の症例が含まれること、また同様に術後補助化学療法や再発時治療の影響が TS 活性値と予後に影響を及ぼした可能性がある。

本研究結果から喫煙歴のある Ad の TS 活性値に喫煙が影響を与えている可能性が示唆され、喫煙状況により肺癌組織内の TS 活性値が変化することが見出せた。喫煙は予後に深く関与していることが周知されているが、TS 活性値との関係性からは一定の見解を得ることが出来なかった。本研究の対象患者は術後の喫煙状況が把握できておらず、術後も喫煙を継続した症例がいることは否定できない。喫煙の継続は生活習慣病や他の慢性疾患にも大きな影響を与える。正確な予後を評価するためには厳密な症例選択が必要である。加えて、術後化学療法および再発時化学療法の薬剤選択が統一させていなかった。この点でも本研究は限定的な症例を調査した研究であり、術後の喫煙状況を把握し、化学療法の選択を統一した前向き試験を行うことが必要である。

利益相反

本研究に開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Chung C, Christianson M. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers: a systemic review of current development, evidence, and recommendation. *J Oncol Pharm Pract.* 2014;20:11-28.
- 2) Derenzini M, Montanaro L, Trere D, *et al.* Thymidylate synthase protein expression and activity are related to the cell proliferation rate in human cancer cell lines. *Mol Pathol.* 2002;55:310-314.
- 3) Nakagawa T, Otake Y, Yanagihara K, *et al.* Expression of thymidylate synthase is correlated with proliferative activity in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer.* 2004;43:145-149.
- 4) Shintani Y, Ohta M, Hirabayashi H, *et al.* New prognostic indicator for non-small-cell lung cancer, quantitation of thymidylate synthase by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Int J Cancer.* 2003;104:790-795.
- 5) Hashimoto H, Ozeki Y, Sato M, *et al.* Significance of thymidylate synthase gene expression level in patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer.* 2006;106:1595-1601.
- 6) Nakagawa T, Tanaka F, Otake Y, *et al.* Prognostic value of thymidylate synthase expression in patients with p-stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2002;35:165-170.
- 7) Fink L, Seeger W, Ermert L, *et al.* Real-time quantitative RT-PCR after laser: assisted cell picking. *Nat Med.* 1998;4:1329-1333.
- 8) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, *et al.* Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1322-1327.
- 9) Huang Y, Guo X, Wang H, *et al.* Predictive value of thymidylate synthase for the prognosis and survival of lung adenocarcinoma patients. *Oncol Lett.* 2015;9:252-256.
- 10) Ceppi P, Volante M, Saviozzi S, *et al.* Squamous cell carcinoma of the lung compared with other histotypes shows higher messenger RNA and protein levels for thymidylate synthase. *Cancer.* 2006;107:1589-1596.
- 11) Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, *et al.* Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1381-1385.
- 12) Horie N, Aiba H, Oguro K, *et al.* Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct.* 1995;20:191-197.
- 13) Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, *et al.* A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics.* 2004;14:319-327.
- 14) Shi Q, Zhang Z, Neumann AS, *et al.* Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2005;26:649-656.
- 15) Suzuki T, Matsuo K, Hiraki A, *et al.* Impact of one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on risk of lung cancer in Japan: a case control study. *Carcinogenesis.* 2007;28:1718-1725.
- 16) Miyamoto H, Morio A, Izumi H, *et al.* Effects of UFT on thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase activities in lung cancer. *Anticancer Res.* 2003;23:4153-4156.

RELATIONSHIP BETWEEN SMOKING STATUS AND INTRATUMORAL EXPRESSION OF THYMIDYLATE SYNTHASE IN LUNG CANCER

Shugo UEMATSU, Akihiko KITAMI, Kosuke SUZUKI,
Shinnosuke TAKAMIYA, Fumitoshi SANO, Shinichi OHASHI,
Yoko TANAKA, Yoshito KAMIO, Naoya HIMURO,
Daisuke KATAOKA, Shigeru YAMAMOTO, Takashi SUZUKI
and Mitsutaka KADOKURA

Showa University, Department of Surgery, Division of Chest Surgery

Abstract — Thymidylate synthase (TS) is an enzyme that is essential for the de novo DNA synthesis of DNA. TS expression is associated with the proliferative activity of cancer cells, and low TS expression is correlated with favorable outcomes in patients with non-small cell lung cancer treated with TS-targeted drugs. This study assessed the association between TS expression in lung cancer and smoking status. A total of 113 patients who underwent surgical resection for lung cancer were enrolled. Tumor specimens were manually microdissected, and RT-PCR was performed to assess the intratumoral mRNA expression for TS. Moreover, the relationship between the TS level and the cumulative lifetime smoking dose for each patient was analyzed. No difference was observed in TS expression between non-smokers and smokers with Adenocarcinoma (Ad) and with Squamous cell carcinoma (Sq). Among smokers, the median smoking status in patients with Ad and Sq was 45 and 50 pack-years, respectively. TS expression was significantly higher in patients with Sq than in patients with Ad ($p=0.0276$). Among smokers with Ad, TS expression was higher in patients with a smoking status of ≥ 45 pack-years compared to those with a smoking status of < 45 pack-years ($p=0.0187$). Furthermore, there was no difference in TS expression between smoking statuses in all smokers with Sq. Conversely, no significant relationship was noted between smoking status and outcome. These findings suggest that smoking status may potentially affect TS levels in lung cancer patients with Ad.

Key words: lung cancer, thymidylate synthase (TS), smoking status, outcome

[受付：6月22日，受理：8月13日，2018]