

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

頭頸部腫瘍 (2003.03) 29巻1号:230～234.

ヒト喉頭癌における誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)発現の検討

執行寛, 野中聡, 片山昭公, 高原幹, 荻野武, 今田正信, 林
達哉, 原渕保明

ヒト喉頭癌における誘導型一酸化窒素合成
酵素 (iNOS) 発現の検討

執行 寛 (しぎょう ひろし)
野中 聡 片山昭公 高原 幹
荻野 武 今田正信 林 達哉
原渕保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科教室

Key words :

喉頭癌 (laryngeal carcinoma),
誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)
免疫組織染色
(immunohistologic staining)

別刷請求先 〒078-8510

旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1-1

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

執行 寛

論文要旨

誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) は主にマクロファージなどの免疫系の細胞に含有され、炎症機転に伴い発現誘導される。iNOS 生成は他のアイソフォームである神経型 NOS や内皮型 NOS に比べ約 100 倍の NO 合成能を有する。したがって、iNOS 発現誘導による過剰な NO 生成は正常細胞の DNA を傷害し突然変異を誘導するなど癌の発生に深く関与すると考えられている。今回、筆者らは初回治療を行った喉頭癌 63 例を対象に iNOS の発現を免疫組織学的に同定し、臨床像、病理組織像および予後との関連性について検討した。63 例中 36 例 (57. 1%) の癌組織において iNOS 陽性であった。放射線単独療法後の局所再発例では iNOS スコアが有意に高値を示した。また、iNOS 陽性例は陰性例と比べて有意に生存率が低かった。以上より iNOS の発現が早期喉頭癌における局所再発や予後を推測する一つの因子となりえる可能性が示唆された。

はじめに

一酸化窒素 (NO) は血管拡張、抗ウイルス作用、神経伝達物質としての作用など様々な生理学的活性を持つことが知られている 1) 。 NO は L -アルギニンを基質として L -シトル

リンに変換される際に産生されるが、この過程を触媒する酵素が一酸化窒素合成酵素 (Nitric oxide synthase : NOS) である。NOS には神経型 NOS (neuronal NOS : nNOS)、内皮型 NOS (endothelial NOS : eNOS)、誘導型 NOS (inducible NOS : iNOS) の 3 種のアイソフォームが同定されている。iNOS はマクロファージなどの免疫系の細胞を中心に含有されており、炎症反応などに伴い発現誘導される。iNOS は nNOS や eNOS に比べ約 100 倍の NO 合成能を持ち 2)、炎症機転に伴う iNOS 発現誘導によって産生された過剰な NO は正常細胞の DNA を傷害させ突然変異を誘導するなど、癌の発生に深く関与すると考えられている 3)。大腸癌 4)、胃癌 5)、前立腺癌 6)、食道癌 7) などにおいて iNOS の過剰発現が報告され臨床像や予後との関連が報告されている。しかし、頭頸部癌に対する iNOS の発現についての検討は口腔扁平上皮癌についての報告 8) のみであり、他の部位の癌については未だ解析されていない。今回、筆者らは喉頭癌における iNOS の発現を免疫組織学的に検索し、臨床像、病理組織像および予後との関連性を比較検討した。

対象および方法

1) 対象

当科にて 1990 年 4 月より 2001 年 12 月までに喉頭癌と診断され初回治療を受けた 63 例を対象とした。年齢は 42~85 才、男女比は 58 : 5 であった。組織型は全例扁平上皮癌であった。また、嚥下障害のため喉頭摘出を行った 3 例を正常例として検討した。症例の臨床病理学的因子については頭頸部癌取扱い規約に準じて分類した (表 1)。T 分類では T1:20 例、T2:29 例、T3:6 例、T4:8 例であった。N 分類では N0:47 例、N1:1 例、N2:12 例、N3:3 例であった。病期分類では Stage I:18 例、Stage II:21 例、Stage III:5 例、Stage IV:19 例であった。分化度では高/中分化癌が 56 例、低分化癌は 7 例であった。治療法は根治的放射線療法 25 例、レーザー療法 8 例、手術単独療法 30 例 (喉頭全摘術のみ 11 例、喉頭全摘術+頸部郭清術 19 例) であった。

2) 免疫組織学的解析

組織標本は生検時もしくは喉頭全摘術時のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いて 6 μ m の薄切連続切片を作成した。脱パラフィンした後、500W、7 分間のマイクロウェーブ処理を行った後、3%過酸化水素加メタノールにて 30 分間、内因性ペルオキシダーゼを不活化させた。1 次抗体としてマウス抗 iNOS 単クローナル抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) を 100 倍希釈にて使用し 4°Cにて 24 時間反応させた。続いて、ペルオキシダーゼ標識ポリマー (ENVISION+, DAKO, Kyoto, JAPAN) にて室温で 30 分間反応させた後、diaminobenzidine を用いて発色させ、ヘマトキシリンで対比核染色を行った。陰性コントロールとして正常マウス IgG を 1 次抗体に用い、また陽性コントロールとしてヒト下甲介粘膜切片をそれぞれ用いて確認した 9)。

3) 免疫組織染色の評価

染色した切片を光学顕微鏡にて観察し、Brennan ら 8) の評価法に従って、染色強度 (200 倍で検鏡) を 0:染色なし、1:弱陽性、2:中等度陽性、3:強陽性の 4 段階、領域 (40 倍で検

鏡)を0:染色陽性なし、1:染色陽性の腫瘍細胞が25%未満、2:25%以上50%未満、3:50%以上75%未満、4:75%以上の5段階に分類した。染色強度と領域の和をiNOSスコア(0~7)として算出した。また、領域で2以上をiNOS陽性とした。(表2)

4) 統計学的検定

統計学的検定にはノンパラメトリックな方法を用いた。すなわち、多群間の検定にはKruskal-Wallis検定、およびSpearmanの順位相関を用いた。また、2群間の検定にはMann-WhitneyのU検定を用い検討した。

予後についてはiNOSの発現を陽性群、陰性群の2群に分けKaplan-Meier法を用いて累積生存率(無病生存率)を算出し生存率曲線を描いた。無病生存率は初回再発(局所再発および遠隔転移)をエンドポイントに非打ち切り例として統計学的処理を行い、2群間の検定にはLogrank法を用い検討した。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1) 癌と正常喉頭粘膜の検討

喉頭扁平上皮癌組織では63例中36例(57.1%)でiNOSの発現を認めた。iNOSは腫瘍細胞の細胞質に染色され、そのスコアは0~7、中央値3であった。一方、正常喉頭組織3例の染色強度ではiNOSの発現はすべて認められなかった(図1)。

2) iNOSスコアと臨床病理学的因子との検討

iNOSスコアと原発部位、TN分類、臨床病期、分化度などの臨床病理学的因子との関連を検討した。iNOSスコアと原発部位、TN分類については統計学に有意差を認めなかった。分化度では高~中分化型ではiNOSスコアが低分化型より有意に高い値を示した。 $(p=0.046)$ (表2)

3) 再発例と非再発例の検討

局所再発との関係をみるために、早期癌(T1、T2)を対象に初回治療として根治的放射線療法を施行した25例、レーザー治療を施行した8例に、その後の再発の有無とiNOSスコアとの関係を調べた。根治的放射線療法後の局所再発例7例では非再発例18例に比較してiNOSスコアが有意に高値を示した(図2a)(iNOSスコア中央値:5.0vs2.0, $p=0.0053$)。レーザー治療を施行した症例については、再発の有無でiNOSスコアに有意差を認めなかった(図2b)。進行癌(T3、T4)については再発の有無でiNOSスコアに有意差を認めなかった。

4) iNOSの発現と予後

iNOS陽性群($n=36$)は陰性群($n=27$)と比べて有意に生存率が低く、Logrank検定にて統計学的に有意差が認められた。(5年生存率:50% vs 90%, $p=0.0102$)(図3)

考察

iNOS発現誘導に伴う過剰なNO生成は酸素やスーパーオキシド(O₂⁻)と容易に反応し、窒素酸化物(NO_x)あるいはペルオキシナイトライト(ONOO⁻)を過剰に生成する。これらのNOや活性窒素酸化物は外界からの侵入物質を攻撃するために、生体の一次防御の目的で生

成される。しかし、慢性的に過剰に生成されると自らの DNA を障害し、突然変異を誘発するなど、発癌との関連が注目されている 10)。また、NO は癌細胞自身が増殖する上で周囲血管の拡張、透過性、血管新生を促進するなど癌の進展にも深く関与すると考えられている 11) 12)。

そこで、近年、種々のヒト癌組織において iNOS が癌細胞周囲の免疫細胞や血管内皮細胞、癌細胞自身に発現している例が報告され、臨床像および予後などとの関係が検討されている 10)。口腔癌において Brennan ら 8) は 56 例中 43 例 (77%) に、Zhao ら 13) は 41 例中 26 例 (63%) に iNOS 発現を認め、iNOS 発現と頸部リンパ節転移との関連があることを報告している。我々の検討では口腔癌との比較よりやや低い発現率であったが、喉頭癌症例 63 例中 36 例 (57%) に iNOS の過剰発現を認めた。しかし、治療前の腫瘍の原発部位、大きさ、頸部リンパ節転移、ステージなどとは相関は見られなかった。組織学的分化度を検討したところ高～中分化型では低分化癌と比較して iNOS 発現率は有意に高かった。これは、奥村ら 14) の大腸癌において組織学的分化度が高くなるほど陽性率が高値を示したとの報告と一致している。

iNOS 発現と臨床経過との関連を検討したところ、放射線療法後 CR となった後に局所再発した群では非再発群と比較して iNOS 発現が強いことが示された。根治照射後の局所再発には腫瘍の増殖活性と放射線感受性が関連していると言われている。腫瘍の増殖能や放射線感受性に関与する因子として p53 遺伝子変異が従来報告されており 15)、p53 遺伝子の機能のひとつとして iNOS mRNA の転写を抑制的に制御することが最近明らかにされている 16)。したがって、今回の検索で認められた iNOS 発現と局所再発の関連性は p53 遺伝子を介している可能性があると考えられる。予後に関しては Lagares-garcia ら 17) は大腸癌において iNOS の高発現群は低発現群と比べて有意に生存率が低いと報告している。今回の検討でも、無病生存率を検討したところ、iNOS 陽性群は陰性群と比べて有意に生存率が低かった。したがって、iNOS 発現の有無が喉頭癌一次治療後の再発を推測する因子のひとつとなりえると考えられた。

まとめ

- 1) 喉頭癌組織 63 例中 36 例 (57.1%) に iNOS 発現が認められた。一方、正常喉頭粘膜 3 例では iNOS の発現は認められなかった。
- 2) 高～中分化癌では iNOS スコアは有意に高値を示した。
- 3) iNOS 発現と治療前の TN 分類、病期との関連性は認めなかった。しかし、早期癌において根治的放射線療法後の局所再発例では、iNOS スコアが有意に高く、さらに iNOS 陽性群は陰性群と比べて有意に無病生存率が低かった。したがって、iNOS 発現は局所再発や予後を推測する因子としての有用性であることが示唆された。

文献

- 1) 菅野一男、平田結喜緒 : NO の生体内動態(合成、代謝、阻害など)、臨床消化器内科 14 : 663-669, 1999
- 2) 小倉勤、立道昌幸 他 : iNOS 遺伝子の発現制御と細胞障害、細胞工学 17 : 182-189, 1998
- 3) Lala PK. Chakraborty C. : Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. : Lancet Oncol. 2 : 149-156, 2001.
- 4) Nozoe T. Yasuda M. et al : Immunohistochemical expression of cytokine induced nitric oxide synthase in colorectal carcinoma. Oncol Rep 9 : 521-524, 2002.
- 5) Son HJ. Kim YH. et al : Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. J Clin Gastroenterol 33 : 383-388, 2001.
- 6) Klotz T. Bloch W. et al : Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. Cancer 82 : 1897-1903, 1998.
- 7) Tanaka H. Kijima H. et al : Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas. Int J Oncol 14 : 1069-1073, 1999.
- 8) Brennan PA. Palacios-Callender M. et al : Correlation between type II nitric oxide synthase and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. Br J Oral Maxillofac Surg : 38 : 627-632, 2000.
- 9) Rosbe KW. Mims JW. et al : Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase activity in upper respiratory epithelium. Laryngoscope 106 : 1075-1079, 1996.
- 10) 大島寛史: NO と癌—多段階発癌における NO の多彩な役割、谷口直之他編、NO の生理作用と疾患 86-92 頁、1999、羊土社、東京.
- 11) Gallo O. Masini E. et al : Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. J Natl Cancer Inst 90 : 587-596, 1998.
- 12) Song ZJ. Gong P. et al : Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. World J Gastroenterol 8 : 591-5, 2002.
- 13) Zhao S. Liu Y. et al : Relationship between expression of inducible nitric oxide synthase and of VEGF in oral carcinoma. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 36 : 461-463, 2001.

- 14) 奥村権太、山田恭司 : 進行大腸癌における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、プロスタグランジン合成酵素(COX-2)の発現と血管新生との相関、および臨床的意義、聖マリアンナ医大誌 27 : 433-441, 1999
- 15) Bando N. Hayashi T. et al : Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer* 94 : 1968-1980, 2002.
- 16) Forrester K. Ambs S. et al : Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 2442-2447, 1996.
- 17) Lagares-garcia JA. Moore RA. et al : Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *Am Surg* 67 : 709-713, 2001.

英文要旨

EXPRESSION OF THE INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN LARYNGEAL CANCERS

Hiroshi SHIGYOU, Satoshi NONAKA, Akihiro KATAYAMA,

Miki TAKAHARA, Takeshi OGINO, Masanobu IMADA,

Tatuya HAYASHI, Yasuaki HARABUCHI

Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery,

Asahikawa Medical college

We examined the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in 63 patients with laryngeal squamous cell carcinoma (SCC) who had undergone treatment at our hospital. The iNOS expression was detected by immunohistologic method using mouse monoclonal antibody against iNOS and the staining intensity was scored. The iNOS expression in cytoplasm of tumor cells was detected in 36 (57.1%) of 63 laryngeal cancers. The iNOS expression did not correlate with either arising sites, TN clinical classifications,

or stages. In early-stage (T1N0, T2N0) diseases treated with radiotherapy alone, patients who experienced local recurrence after complete remission showed significantly higher iNOS score than patients who did not experience local recurrence. (5.0 vs 2.0, $p=0.0053$) The disease free survival rate of patients with iNOS expressions was significantly poorer than that of patients without iNOS expressions. This data suggest that the iNOS expression may be useful as a predicting factor for local recurrence and prognosis in early-stage laryngeal SCC.

和訳

我々は当科で治療を行った喉頭扁平上皮癌(SCC)63例を対象に誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現を検討した。iNOSの発現はマウス抗iNOS単クローナル抗体を用いた免疫組織染色法により検索され、その染色強度はスコア化された。喉頭癌63例中36例(57.1%)において腫瘍細胞の細胞質にiNOSの発現が認められた。iNOSの発現は原発部位、TN分類、臨床病期と相関を認めなかった。放射線単独で治療された早期癌(T1N0, T2N0)において、完全寛解後に局所再発した群は局所再発しなかった群と比較してiNOSスコアが有意に高値を示した。iNOS陽性群は陰性群と比べて有意に無病生存率が低かった。以上よりiNOSの発現は早期の喉頭扁平上皮癌における局所再発や予後を推測する一つの因子となりえる可能性が示唆された。

付表および付図説明について

表1:喉頭癌 63 例の臨床像

図1:喉頭扁平上皮癌における iNOS 陽性像
(スコア 7)(×200)

:腫瘍細胞の細胞質に iNOS の過剰
発現を認める。

表 2:iNOS スコアと臨床病理学的因子との
関連

図2:iNOS スコアと局所再発

a:根治的放射線療法群(n=25)

b:レーザー療法群(n=8)

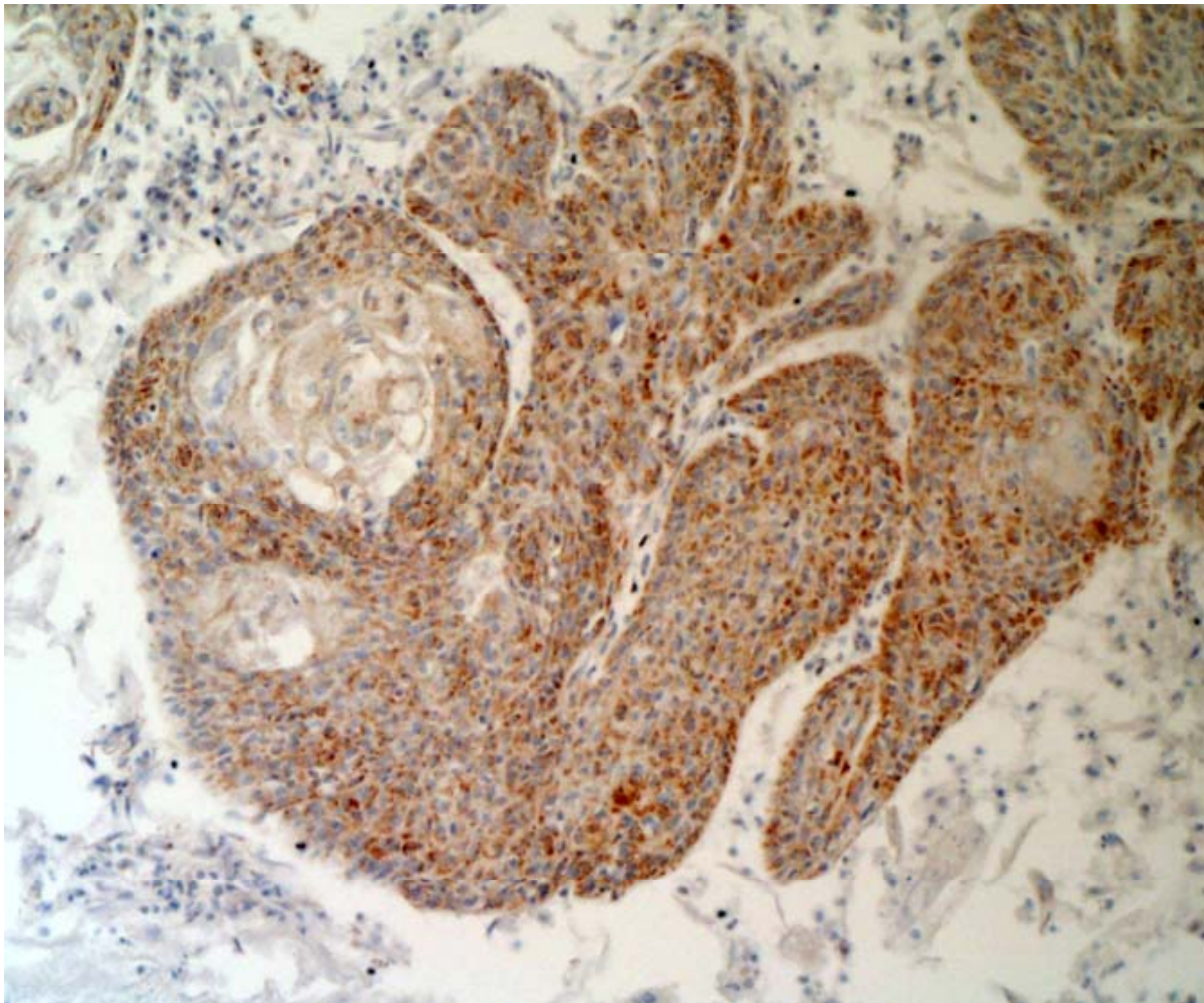
図 3:iNOS の発現と無病生存率

(*有意差あり)

(表 1)

		症例数	
性別	男性	58	(92%)
	女性	5	(8%)
年齢 (中央値)		42~85才	(67才)
部位	声門上部	30	(48%)
	声門下部	26	(41%)
	声門下部	7	(11%)
T分類	T1	20	(32%)
	T2	29	(46%)
	T3	6	(10%)
	T4	8	(12%)
N分類	N0	47	(75%)
	N1	1	(1%)
	N2	12	(19%)
	N3	3	(5%)
Stage	I	18	(29%)
	II	21	(33%)
	III	5	(8%)
	IV	19	(30%)
分化度	高/中分化	56	(89%)
	低分化	7	(11%)

(图 1)

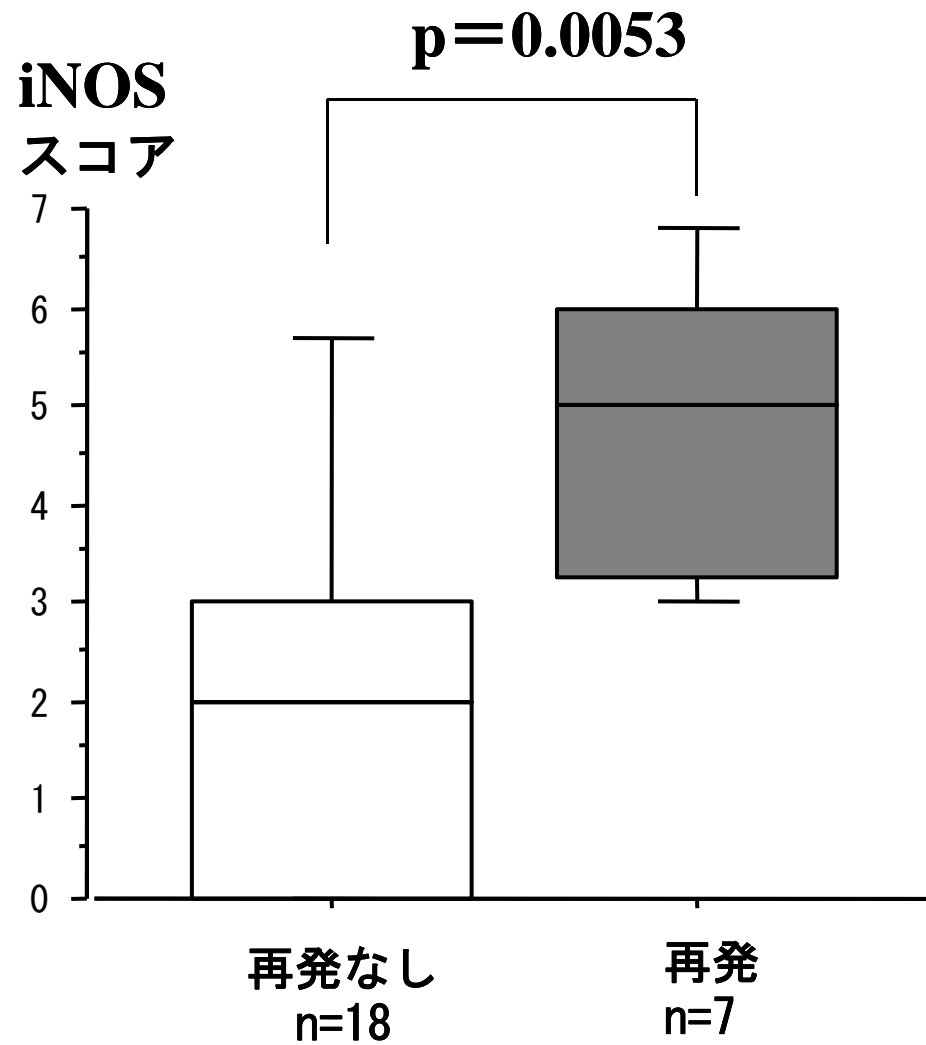


(表 2)

		症例数 (n)	iNOSスコア (中央値 : 25—75%パーセンタイル)	
部位	声門上部	30	2.00 : 0.00 — 4.00	
	声門	26	3.00 : 0.00 — 4.00	
	声門下部	7	4.00 : 0.75 — 6.00	NS
T分類	T1	20	3.00 : 2.50 — 4.50	
	T2	29	2.00 : 0.00 — 5.00	
	T3	6	3.00 : 0.00 — 3.00	
	T4	8	2.00 : 0.00 — 5.50	NS
N分類	N0	47	3.00 : 0.00 — 5.00	
	N1	1	0	
	N2	12	1.50 : 0.00 — 3.50	
	N3	3	2.00 : 0.50 — 5.00	NS
Stage	I	18	3.00 : 2.00 — 4.00	
	II	21	2.00 : 0.00 — 5.25	
	III	5	3.00 : 0.00 — 3.25	
	IV	19	3.00 : 0.00 — 4.75	NS
分化度	高/中分化	56	3.00 : 0.00 — 5.00	
	低分化	7	0.00 : 0.00 — 2.25	p=0.046

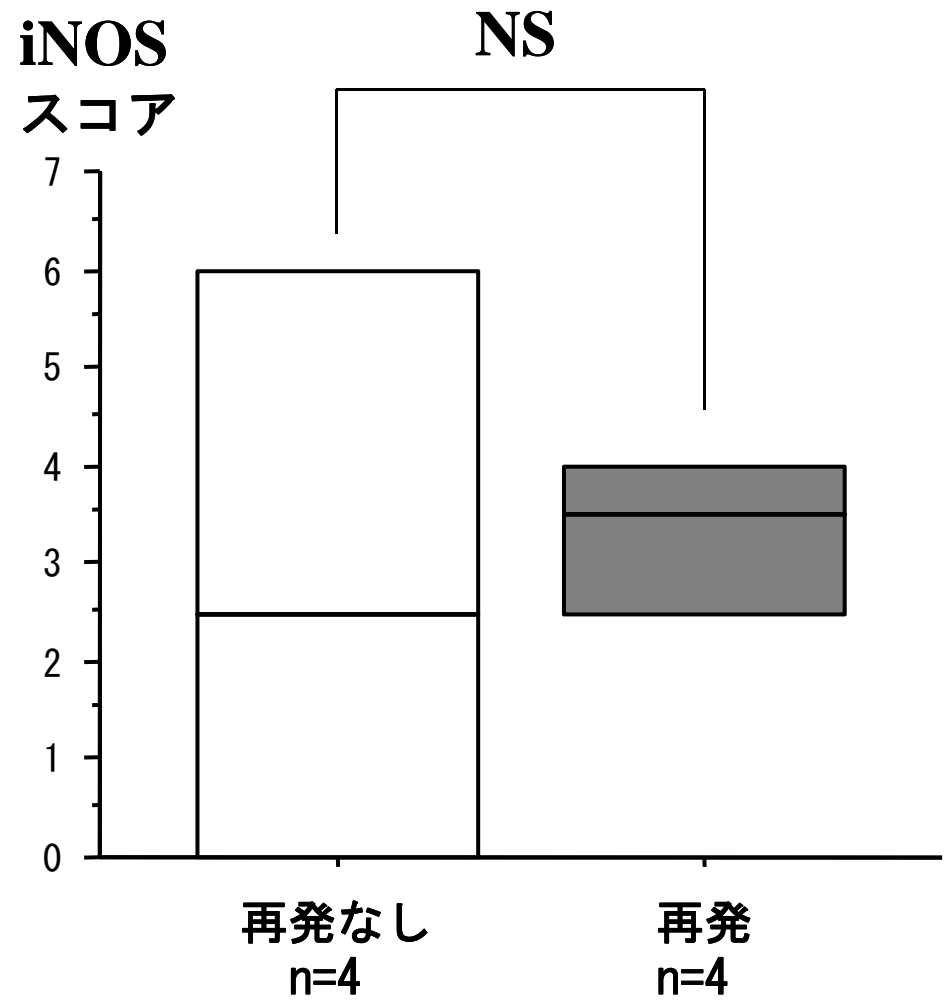
(図2)

a



根治的放射線療法群(n=25)

b



レーザー療法群(n=8)

(圖 3)

