

肺腺癌における、初期悪性化に寄与する
抗アポトーシス関連因子に対する
病理学的検討

2010

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

坂 下 信 悟

筑波大学

博士（医学）学位論文

目次

はじめに	・・・1
第1章 多発異型腺腫様過形成における抗アポトーシス関連タンパク発現に対する免疫組	
織学的検討	・・・4
1-1 背景	
1-2 材料と方法	
1-3 結果	
1-3-(1) BI-1(Bax inhibitor-1)	
1-3-(2) Phosphorylated-Src	
1-3-(3) X-IAP	
1-3-(4) Survivin	
1-3-(5) HSP27	
1-3-(6) GRP78	
1-3-(7) PP2Ac	
1-3-(8) IGBP1	
1-4 考察	
第2章 小型肺腺癌におけるPP2Ac・IGBP1の発現および臨床病理学的検討	・・・12
2-1 背景	

2-2 材料と方法

2-2-1 材料

2-2-2 検体処理

2-2-3 免疫染色

2-2-4 免疫染色の判定と統計解析

2-2-5 蛍光免疫染色

2-3 結果

2-3-1 PP2Acによる免疫染色の結果

2-3-2 IGBP1と免疫染色の結果

2-3-3 PP2AcとIGBP1の染色部位に対する比較検討

2-4 考察

第3章 多発異型腺腫様過形成症例に対するプロテオーム解析

・・・21

3-1 背景

3-2 材料と方法

3-2-(1)材料

3-2-(2)プロテオーム解析

3-2-(2)-a 検体採取

3-2-(2)-b 前処理

3-2-(2)-c Liquid chromatography/tandem mass(LC-MS/MS)解析

3-2-(2)-d 半定量解析

3-2-(3) 免疫染色

3-3 結果

3-3-(1) プロテオーム解析

3-3-(2) CyclophilinAに対する免疫染色

3-4 考察

総括

・・・28

図

図1 異型腺腫様過形成の組織像

図2-1 野口分類 Type A, Type B の組織像

図2-2 野口分類 Type C の組織像

図2-3 野口分類 Type D, E の組織像

図2-4 野口分類 Type F の組織像

図3-1 多発異型腺腫様過形成症例1のマクロ像およびミクロ像

図3-2 多発異型腺腫様過形成症例2のマクロ像およびミクロ像

図3-3 多発異型腺腫様過形成症例3のマクロ像およびミクロ像

図4 正常および異型腺腫様過形成に対するBI-1(Bax inhibitor 1)の免疫染色

図5 正常および異型腺腫様過形成に対するP-src(Phosphorylated Src)の免疫染色

図6 正常および異型腺腫様過形成に対するXIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)の免疫染色

図7 正常および異型腺腫様過形成に対するSurvivinの免疫染色

図8 正常および異型腺腫様過形成に対するHSP(Heat shock protein)27の免疫染色

図9 正常および異型腺腫様過形成に対するGRP78(Heat shock protein 70)の免疫染色

図10 正常および異型腺腫様過形成に対するPP2Ac(protein phosphatase 2A)の免疫染色

図11 正常および異型腺腫様過形成に対するIGBP1(Imunoglobulin binding protein 1)の免疫染色

図12 正常および小型肺腺癌に対するPP2Acの免疫染色

図13 反応性の2型肺胞上皮と異型腺腫様過形成との比較

図14 小型肺腺癌に対するIGBP1の免疫染色

図15 IGBP1陽性例と陰性例との生存曲線における比較検討

図16 IGBP1が核に強い陽性像を呈する野口Type A, 野口Type B 腺癌

図17 PP2AcとIGBP1の染色部位に対する蛍光免疫染色を用いた検討

図18 プロテオームの流れ

図19 マイクロダイセクション法(LMD6000)による検体採取法

図20-1 APEXの結果 症例1 異型腺腫様過形成 対 正常肺胞上皮

図20-2 APEXの結果 症例2 異型腺腫様過形成 対 正常肺胞上皮

図20-3 APEXの結果 症例3 異型腺腫様過形成 対 正常肺胞上皮

図21 正常および異型腺腫様過形成に対するcyclophilinAの免疫染色

図22 総括

表

表1 末梢小型肺腺癌の組織分類

表2 多発異型腺腫様過形成に対する免疫染色にて検索したタンパク質の種類と機能

表3 抗体の賦活化条件、一次抗体濃度、二次抗体の種類

表4 小型肺腺癌に対するIGBP1の免疫組織学的検索結果と臨床病理学的特徴の比較

表5 症例1-3の異型腺腫様過形成および正常肺胞で認められたタンパク質

参考文献

参考論文

謝辞

はじめに

近年、日本における死因の第1位は悪性腫瘍である。これら悪性腫瘍による死因の中でも、肺癌が大きな比率を占めており男性においては癌による死亡数が1位、女性では2位である。肺癌はその組織型によって臨床経過や治療に対する反応性も異なってくるため、組織学的に分類する必要がある。1999年に出版されたWHOの新分類では、肺の悪性上皮性腫瘍は腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、腺扁平上皮癌、多形・肉腫様あるいは肉腫成分を含む癌、カルチノイド腫瘍、唾液腺型腫瘍、分類不能癌の9種類の組織型に分類され、さらに前浸潤性病変が分類されている¹。これら9種類の組織型のなかでも腺癌は日本で最も多い組織型であり、米国やヨーロッパでも増加してきている²⁻⁴。肺癌の前癌病変としては扁平上皮癌の前癌病変として異形成が、神経内分泌癌の前癌病変としてはびまん性特発性肺神経内分泌細胞過形成(diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia : DIP)が定義されている。腺癌の前浸潤性病変としては、異型腺腫様過形成(Atypical adenomatous hyperplasia:AAH)が定義されている(図1)。野口らは2cm以下の小型肺腺癌をlepidic growth pattern(既存の肺胞上皮を置換しながら増殖する性格を持つ)か否かで2つの群にわけ、形態像からそれぞれを3群に分類し、1995年に小型肺腺癌の分類(野口分類)を発表した(表1)⁵。Lepidic growth patternを有する群はType A(Localized bronchioloalveolar carcinoma:LBAC, 腫瘍内に線維化巣を認めない限局性肺胞上皮癌), Type B(LBAC with foci of collapse of alveolar structure, 腫瘍内に肺胞虚脱型の線

維化巣を認める限局性肺胞上皮癌)、Type C(LBAC with foci of active fibroblastic proliferation, 腫瘍内に線維芽細胞の増生を伴う線維化巣を認める限局性肺胞上皮癌)の3typeに定義され、lepidic growth patternを有しない腺癌はType D(Poorly differentiated adenocarcinoma, 充実破壊性に増殖する低分化腺癌)、Type E(Tubular adenocarcinoma, 管状腺癌)、Type F(Papillary adenocarcinoma with compressive and destructive growth, 真の乳頭状腺癌)とそれぞれ定義された(表1-1, 図2-1, 2-2, 2-3, 2-4)。Lepidic growth patternを有する腺癌は、小型肺腺癌の約75%を占め、その形態学的類似性からAAHより多段階的に発生していると考えられている。それに対し、Lepidic growth patternを有しない群は基本的に*de novo*発生と考えられ、各々に遺伝子解析がなされている。それぞれの腫瘍に対し、生物学的特徴を解析した結果Type A、Type Bは予後が良く、5年生存率が100%であった。それに対しType CもType A、Bと同様にlepidic growth patternを有するが、5年生存率は平均75%程である(表1-2)。このような生物学的特徴から、Type A、Bは非浸潤癌、Type Cは小型で初期病変ながら浸潤癌の範疇と考えられている。同様にType D-Fも5年生存率が低く、浸潤癌と考えられている。非浸潤癌から浸潤癌に悪性化することによって死亡例が認められる様になり、確実に予後は悪化する。つまり、非浸潤癌から浸潤癌への進行を規定する予後因子を明らかにし、悪性化の分子機構を解明することは臨床的にも肺腺癌の初期悪性化の分子機構を理解するために重要である。本研究では、AAHから肺腺癌への進行、非浸潤癌から浸潤癌への進行の分子生物学的

メカニズムを明らかにすることを目指した。

第1章 多発異型腺腫様過形成における抗アポトーシス関連タンパク発現に対する免疫組織学的検討

1-1背景

前述したとおり、肺腺癌の前癌病変として異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia : AAH)という病変が定義されている¹⁾(図1)。もともとAAHは肺癌切除例の非癌部背景肺組織に偶発的に認められる異型上皮の増殖性病変として認識されていた。1990年Millerらは、247例の肺切除術例を検討し、1割程度に微小病変が存在することを示した⁶⁾。彼らはこの病変を“肺腺腫”と名付け、大腸癌の前癌病変である大腸腺腫に相当する末梢肺の増殖性病変であろうと考えた。ただし、“肺腺腫”という言葉は結節性の特徴的組織像を示す良性腫瘍を示す言葉なので、現在はこの病変の事を従来通りAAHという診断名で呼んでいる。AAHは基本的に切除肺組織中に偶発的に認められる病変であり、ほとんどがホルマリン固定パラフィン包埋材料でのみ発見されるため、病理標本から高品質な核酸を得ることができず、従って分子生物学的な解析を行う事が困難であった。また、術前に診断ができなかった事より経過観察もできず、疫学的研究もなかなか進まなかった。しかし、画像診断法の進歩および分子生物学的な実験手技の進歩により、AAHはその後、前浸潤癌病変であることを示すような証拠が徐々に見つかってきた。たとえば1990年、中山ら

はAAH細胞の核DNA量解析から、AAHがクローナルな増殖を示す病変である事を証明した⁷。

そのほかにもp53、KRASの点突然変異や染色体の欠損が認められるなど、前癌病変として矛盾しない性質を持つ事がわかってきた^{8, 9}。

一方、小型肺腺癌の予後因子については、野口分類のほかにも多数報告が認められる。TNM分類¹⁰、性別¹¹さらにはras, myc, HER2/neu ファミリーおよびp53の高発現が予後に重要であると報告されている^{12, 13}。最近では、endothelial growth factor¹⁴ や *MET*, *HGF*, *EGFR*および*PXN*のコピー数も遺伝的な因子として報告されている¹⁵。穴見らは様々な免疫組織学的・形態学的予後因子を解析し、小型肺腺癌において最も重要な予後因子は免疫染色で用いられた因子以上にBAC(lepidic growth pattern)の割合であることを報告している¹⁶。一方小型肺腺癌の予後因子は浸潤性腺癌と非浸潤性腺癌とのサブトラクションおよびAAH細胞株と気管支上皮細胞株とのサブトラクションによっても様々な予後因子が見つかった。現在のところS100A6¹⁷、Neuronatin¹⁸およびBax inhibitor-1¹⁹が予後因子としてそれぞれ報告されている。特に、田中らが報告しているBax inhibitor-1はanti-apoptosis因子であり、初期の肺腺癌で発現があがるものの、浸潤癌で発現が落ちるという点が非常に興味深い。この事実は、肺腺癌の初期の悪性化にanti-apoptosis機能の獲得が重要であるという点を示している。肺腺癌とanti-apoptosisマーカーとの研究に対する報告は、ほかにも多数認められる。2008年にMaixinらはXIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)と肺腺癌との関係について報告している²⁰。XIAPはcaspase3, 8, 9を直

接blockすることでanti-apoptosis機能を獲得しており、正常肺胞上皮組織、adenomatous hyperplasiaでは陰性であり、AAH、高分化腺癌では陽性であると報告している。また、同じIAP(inhibitor of apoptosis)familyの一つであるsurvivinは正常肺胞上皮および異型の弱いAAHでは陰性であるが、異型の強いAAHやnonmucinousのBACでは陽性を示すという報告も認められる^{21, 22}。その他、HSP(Heat shock protein)27およびHSP70に対する報告も認められる。HSP27および70は正常肺胞上皮組織では、発現が認められないものの、肺腺癌になると発現が認められるという報告である²³。さらに興味深い結果として、発現が亢進している腫瘍ほど予後がよいという結果であった。これは進行するにつれて発現が低下するという点において田中らによって報告されたBax-inhibitorと類似した結果である。また、佐久間らはリンパ管内に浮遊する腫瘍細胞はリン酸化されたSrcを発現する事でanoikis抵抗性、つまり広い意味でのanti-apoptosis機能を獲得するという報告をしている²⁴。

さらに我々は、当研究室での先行研究にてLactoferrin(Lf)がIGBP1(Immunoglobulin binding protein 1)と直接結合してPP2A(Protein phosphatase 2A)のphosphatase機能を阻害し、bcl-2を脱リン酸化する事で肺癌細胞株(PC-14)のapoptosisを誘導するという新しいLfのapoptosis誘導活性の分子機構を明らかにした。つまり、以前から報告のあるPP2AcとIGBP1の複合体によるanti-apoptosis機能²⁵が肺腺癌でも果たされている事が明らかとなった。

我々は、肺腺癌の初期悪性化に抗アポトーシス機能が深く関わっていると考え、肺腺癌で報告されているこれらの抗アポトーシス機能を有するタンパク質および当研究室で先行研究として行われたPP2AcとIGBP1を加えた合計8種類のタンパク質(表2)の発現を多発AAH症例に対し免疫組織学的に検討した。

1-2材料と方法

多数のAAHを解析するために多発AAH症例3例を用いて研究を行った。1例目は66歳女性。1999年5月11日に筑波大学附属病院(茨城県)で行われた乳頭状腺癌に対する左肺下葉切除術材料である。背景にはAAHが100個以上認められる。2例目は66歳女性。2001年10月22日に土浦協同病院(茨城県)で行われた高分化腺癌に対する右肺上葉切除術材料。背景にはAAHが179個認められる。3例目は59歳男性。2006年2月23日に筑波大学附属病院で行われた充実性の低分化腺癌とBACの混合型腺癌に対する右肺上葉に対する切除術材料。背景にはAAHが81個認められた。3例目は対側肺にも腺癌が出現し、同年12月6日に左肺上葉に対する切除術が行われたが、こちらは今回の検討には使用しなかった。3症例のマクロ像および代表的な組織像を示す(図3-1, 3-2, 3-3)。手術検体は凍結切片を採取した後に10%ホルマリンで固定され5-7mm厚でスライスされ、パラフィンで包埋された後、4 μ m厚でスライスした。最終的にHematoxylin-eosin染色を行い、組織学的に検討した。実際に免疫染色されたAAHの数はAAHが微小病変であるために正確には計測できないが、それぞれの症例より3ブロック、3ブロックおよび4ブロック(33個のAAH)のホルマリン固定材料パラフィンブロックを作製し、合計で120個ほどのAAHについて免疫組織学的解析を行ったことになる。免疫染色は次の通り行った。4 μ mの厚さで薄切した後、脱パラフィン処理および脱水処理を行った。その後、95%メタノールで希釈された0.03% H_2O_2 にて室温20分浸し、ペルオキシダーゼ活性の賦活化を行った。賦活化を行った後、1次抗体で反応させ、2次抗体

(EnVision+DualLink:Dako., 東京, 日本)に30分浸した後、DAB/Tris溶液で発色した。用いた一次抗体の種類、希釈濃度および反応時間は表3に示した。核染色はHematoxylin染色で行われた。

1-3結果

1-3-(1) BI-1 (Bax inhibitor 1) (図4)

BI-1は正常肺の2型肺胞上皮、気管支上皮、気管支腺すべてに陽性を示した。AAH部分に関しても胞体内に強く陽性を示したが、背景肺の2型肺胞上皮の胞体にも陽性を示したため、AAH部分で明らかに発現が上昇しているのか、2型肺胞上皮が集簇しているためにそう見えているだけなのかの判断が困難であった。

1-3-(2) P-Src (Phosphorylated-Src) (図5)

正常肺組織およびAAH組織はすべて陰性であった。

1-3-(3) X-IAP (X-liked inhibitor of apoptosis protein) (図6)

X-IAPは正常肺の肺胞上皮、気管支上皮、気管支腺すべての細胞の核に陽性を示した。AAH部分に関しても同様に核に陽性を示した。

1-3-(4) Survivin (図7)

Survivinは正常肺の肺胞上皮、気管支上皮、気管支腺すべての細胞の核に陽性を示した。AAH部分に関しても同様に核に陽性を示した。

1-3-(5) HSP (Heat shock protein) 27 (図8)

HSP27はAAH部分で明らかに発現が亢進している症例も数例認められたが、背景の正常肺胞上皮に陽性を示す症例も認められたため、評価が困難であった。

1-3-(6) GRP78 (Heat shock protein 70) (図9)

GRP78はAAH部分で明らかに発現が亢進している症例も数例認められたが、背景の正常肺胞上皮に陽性を示す症例も認められたため、評価が困難であった。

1-3-(7) PP2Ac (Protein phosphatase 2A) (図10)

PP2Acは正常肺の肺胞上皮に陰性を示し、気管支上皮の胞体に陽性を示した。AAH部分に関しても全例に陽性像を示した。

1-3-(8) IGBP1 (Immunoglobulin binding protein 1) (図11)

IGBP1は正常肺の肺胞上皮に陰性を示し、気管支上皮の胞体および核に陽性を示した。AAH部分は全例陰性であった。

1-4 考察

Anti-apoptosis機能が報告されているタンパク質のうち、Phosphorylated-Srcはすべての部分に陰性である点から、またX-IAP、Survivinは正常部分と染色像が変わらないという点から免疫染色による判定が困難であった。BI-1は、正常部分と比較して染色強度が上がっている部分が認められ、AAHの形成に関与している可能性も考えられた。HSP27およびGRP78のHeat shock proteinに関しては、AAH部分で明らかに発現が亢進しているものも認められ一部のAAHへの関与がうかがわれた。ただし、この2つの抗体に関しては一部の症例で正常肺胞上皮にも染色されており、判断が難しかった。

今回の結果で有意な所見を示したのはPP2Acの結果であった。PP2Acは正常部分で陽性を示さないが、AAH症例では全例に陽性を示した。全例に陽性であったという点が、AAH形成との関与を強くうかがわせる結果であった。PP2AcはIGBP1と結合してanti-apoptosis機能を獲得するタンパク質であり、次章で詳しく検討を行った。

第2章 小型肺腺癌におけるPP2Ac・IGBP1の発現および臨床病理学的検討

2-1 背景

前述した通り、当研究室の先行研究にてLactoferrin(Lf)とIGBP1(Immunoglobulin binding protein 1)が直接結合してPP2Aのphosphatase機能を阻害してbcl2を脱リン酸化し、肺癌細胞株(PC-14)にapoptosisを誘導するという新しいLfのapoptosis誘導活性の分子機構を明らかにした。そもそもIGBP1はBリンパ細胞抗原レセプター複合体を形成するIg α と結合する新規シグナル伝達物質として発見された^{26, 27}が、その後多くの臓器に広く分布していることが発見報告されてきた^{26, 28}。IGBP1はPP2A, PP4, PP6のcatalytic unitと接合してこれらの制御を行うことがわかってきた^{29, 30}。中でもPP2A(Protein phosphatase 2A)はほ乳類において最も豊富なホスファターゼであり、細胞増殖や細胞周期をコントロールしている³¹⁻³³。PP2AはC-subunitと呼ばれる酵素ユニットと様々な制御ユニットからなるホロ酵素である^{34, 35}。C-subunitは制御サブユニットであるA-subunitとdimerを形成し、それに様々なB-subunitが結合して様々な機能を果たしている³⁶。ホスファターゼはAサブユニットや様々なBサブユニットを含む調節サブユニットが結合する事により多様な基質親和性、基質特異性および細胞内局在を持つことが可能となっている^{37, 38}。IGBP1とPP2Acの結合はPP2Acの酵素活性だけでなく基質特異性についても調節している^{29, 39}。また、

IGBP1はPP2Acと結合することでanti-apoptosis機能を獲得することが知られている²⁵。上記した研究結果においてもPC14細胞株において恒常的にIGBP1とPP2Acが複合体を形成し、apoptosis機能を阻害し、増殖能を保持していることが推測される。

この章では異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)および小型肺腺癌のIGBP1とPP2Acの発現について調べ、肺腺癌の発生初期におけるIGBP1の過剰発現とその局在について明らかにし、さらに高発現側の臨床病理学的意義を示した。

2-2 材料と方法

2-2-1 材料

2001年4月から2009年4月にかけて筑波大学附属病院(茨城県)で手術が行われた病理材料を用いた。使用した症例は、AAH、小型肺腺癌、器質化肺炎である。内訳はそれぞれ、AAH：23例、小型肺腺癌：96例、器質化肺炎：10例である。小型肺腺癌は野口分類⁵に基づいて分類され、その内訳はTypeA14例、TypeB16例、TypeC46例、TypeD13例、TypeE3例、TypeF4例であった(表4)。小型肺腺癌96例に対する術式に関しては、65例に対し葉切除が、22例に対し部分切除がそして9例に対し区域切除が行われていた。リンパ節郭清に関しては、郭清なしが19例、D1郭清が9例、D2郭清が51例、D3郭清が18例行われていた。

2-2-2 検体処理

手術検体は凍結切片を採取した後に10%ホルマリンで固定され5-7mmでスライスされ、

パラフィンで包埋された後、4 μ m厚でスライスされた。これを用いてHematoxylin-eosin染色および免疫染色が行われた。

2-2-3 免疫染色

各ブロックは4 μ mの厚さでカットされた後、脱パラフィン処理および脱水処理が行われた。その後、95%メタノールで希釈された0.03% H_2O_2 にて室温20分浸され、ペルオキシダーゼ活性のブロッキングを行った。その後、抗体の種類によって10 mMのクエン酸バッファー(PH6.0)もしくはTE buffer(PH9.0)に浸された状態で120°C5分オートクレーブにかけ、抗原の賦活化した。その後、1次抗体に30分、2次抗体(EnVision+DualLink:Dako., T東京, 日本)に30分浸した後、DAB/Tris溶液(Dako., 東京, 日本)で発色した。核染色はHematoxylin染色で行われた。使用した抗体と賦活化は表3に記載した。

2-2-4 免疫染色の判定と統計解析

IGBP1、PP2ACいずれも細胞質内の染色強度で判定した。正常気管支上皮よりも弱い染色強度を示すものを陰性、強いもしくは同程度の染色性を示すものを陽性と判定した。正常気管支上皮に染まらなかった症例は、不的確症例として判定から除外した。IGBP1と臨床組織学的データとの関連については、2x2表を用いてFisherのexact検定で解析した。統計ソフトとしてはSPSS(SPSS, イリノイ州, 米国)を用いた。

2-2-5 蛍光免疫染色

凍結標本を4 μ mの厚さで薄切し、アセトンにて10分間固定した。すべての標本は1次抗体(抗体の種類と濃度については表3参照)4 $^{\circ}$ Cで8-10時間浸され、TRITCでラベルされた2次抗体で30分浸した。最終的にVECTASHIELD Mountaing Mediumで核染色と封入を行った後に蛍光顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE, 大阪, 日本)にて観察を行った。

2-3 結果

2-3-1 PP2Acによる免疫染色の結果

第1章での結果と同様に正常肺において、PP2Acは気管支上皮に陽性像(図12矢印)を示すが、肺胞上皮には染色されなかった(図12)。また、全ての肺腺癌および全てのAAHにPP2Acが陽性を示した。しかし器質化肺炎の周囲に認められた反応性の2型肺胞上皮にもPP2Acは陽性を示した。反応性の2型肺胞上皮は軽度の核異型を示し、比較的N/C比が高く(図13)、通常0.1%未満であるMIB-1 indexが1-2%を示しており、AAHにおけるMIB-1 indexとほぼ同程度であった。

2-3-2 IGBP1の免疫染色の結果

正常肺組織において、IGBP1は気管支上皮に陽性を示した(図14)が、正常肺胞上皮は陰性であった。器質化肺炎周囲の2型肺胞上皮には陰性であった。AAHもすべての症例で陰

性を示した(0/22, 0%)。Lepidic growth pattern(既存の肺胞を置換する様に増殖する性質)を有する小型肺腺癌(<2cm)では、TypeAからTypeCへと悪性化するにつれてIGBP1の陽性率が上昇した(Type A:1/14:7.1%, Type B:7/16:43.8%, Type C:37/46:80.4% :表4)。

一方、lepidic growth patternを持たない症例はすべて陽性であった(Type D:13/13:100%, Type E:3/3:100%, TypeF:4/4:100% :図14, 表4)。リンパ管侵襲、血管浸潤、胸膜浸潤、もしくはリンパ節転移を有する症例はすべて陽性であった。特に、リンパ管侵襲、血管浸潤、野口分類(A-B vs C-F)、胸膜浸潤およびlepidic growth patternの有無および性差に対する解析では、いずれも有意差を認めた(表4)。ただし、リンパ管侵襲(男性:女性=14:2)、血管浸潤(男性:女性=15:3)、リンパ節転移(男性:女性=7:1)は、ほとんど男性症例であった。すべての死亡症例はIGBP1陽性であり、カプランマイヤー曲線を描きlog rank検定を行うとIGBP1陽性症例は有意に予後が悪いという結果であった(図15)。

症例によっては、細胞質よりも核に強い陽性像を認めた(19/36 : 63.3%) (図16)。興味深い事に、非浸潤癌(Type A, B) {Type A: 6/14 (42.9%), Type B: 13/16 (81.3%)}では浸潤癌(Type C, D, E and F) {Type C: 9/46 (19.6%), Type D: 0/13 (0%), Type E: 0/3 (0%), Type F: 0/4 (0%)}と比較して核の陽性率が高かった。核にのみ陽性を示し、細胞質が陰性であったものもType A, B およびCにおいてそれぞれ、5例、6例および5例認められた。

2-3-3 PP2AcとIGBP1の染色部位の比較検討(図17)

前に述べた通り、PP2Acは全症例の細胞質に陽性を示した。それに対し、IGBP1は細胞質、核両方に陽性を示す症例が存在した。特に、非浸潤癌(Type AおよびB)においては細胞質よりも核に強い染色像を示しており、浸潤癌(Type C-F)においてはIGBP1の発現は細胞質と核と同程度であった。この染色動態を確認するために蛍光染色による免疫染色を行った。Anti-PP2Ac染色においては、Type A・Type Cいずれも細胞質にのみ陽性で、核には陰性であった(図17-A, C)。Type AにおけるIGBP1染色は、細胞質よりも核に強く染色されるという結果であり、Type CにおけるIGBP1染色では、細胞質の方が核よりも強く染色された(図17-B, D)。この結果は免疫組織染色の結果を支持するものであった。

2-4 考察

本研究の結果では、PP2Acが正常肺胞上皮で陰性にもかかわらず反応性に腫大した2型肺胞上皮、AAHおよび腺癌すべてにおいて陽性を示した(図12)。また、陽性像は胞体に限られており核には陰性であった。この局在については蛍光免疫染色においても確認した(図17)。陽性像については、反応性2型上皮、AAHおよび腺癌といずれも組織型によらず一定であった。このことから、PP2Acは反応性の肺胞上皮細胞から肺腺癌細胞にまで普遍的に発現している事が示唆される。その理由としては、PP2Acが細胞増殖、アポトーシス、DNAの複製・転写などの様々なシグナル伝達のターゲット因子として認められる重要な因子である事が考えられる³⁷。さらに、PP2Acはマウスの胎児肺に高く発現していることが知られており、PP2Acの発現が二次的に再生、増殖能、細胞周期に関与している可能性が考えられる⁴⁰。実際、器質化肺炎周囲に認められる反応性に腫大した2型肺胞上皮およびAAHとともに、細胞質の腫大、核腫大という形態学的類似性を認めた(図13)。ki-67の免疫染色による検索においても、反応性の2型肺胞上皮、AAHの細胞いずれもKi-67 labeling indexが正常肺胞上皮と比較して高かった。

一方、IGBP1の陽性像は腫瘍が進行していく(悪性像が増す)に連れて陽性像が増加した(図14、表4)。反応性の2型肺胞上皮およびAAHは全例で陰性であり、Type A腺癌、Type C腺癌ともに陽性ではあったが50%未満の陽性率であった。しかし、浸潤癌においては陽性率が有意に増加した(Type C:80.4%, Type D, E, F:100%)。IGBP1の陽性率はリンパ管侵襲、

血管浸潤、胸膜浸潤およびリンパ節転移などの要素とも強い関連が認められた(表4)。さらに、IGBP1陽性症例はIGBP1陰性症例と比較して予後が悪く、有意差も認められた(図15)。死亡した3例についての検討も行った。1例は左上葉切除+縦隔リンパ節郭清(D2)が行われ、TNM classificationは pT3N0M0 pStageIIBであった。4年後に再発、脳転移を起し、7年4ヶ月後に死亡した。1例は肺上葉区域切除+縦隔リンパ節郭清(D2郭清)が行われ、TNM classificationは pT1N2M1 pStageIIIAであった。翌年に術後再発、胸膜播種、縦隔リンパ節、腹腔内リンパ節、両側副腎転移が認められ、術後3年8ヶ月で死亡した。1例は部分切除のみが行われたが、術前にリンパ節転移が疑われており、リンパ節に対しては放射線療法が行われた。その際、clinical stageはT1N2M0 stageIIIAと診断されていた。その後、縦隔リンパ節の再増大、横隔膜上リンパ節転移、脳転移が認められ、術後1年3ヶ月で死亡した。いずれも病期が高く、手術方法や手術手技など人為的な影響よりも腫瘍の生物学的な性質による影響により死亡したと考えられる経過である。これらの結果からはIGBP1の陽性所見が肺腺癌の浸潤性、肺腺癌の生物学的な悪性度と強く関連している事が示唆された。また、我々はType A, Bなどの非浸潤癌とType C-Fの浸潤癌との間に陽性像の差があることを見つけた。前者は核優位の染色像であるのに対し、後者は細胞質優位の染色像であった(図16, 図17)。

前述のとおり、IGBP1はPP2Acと結合し、その蛋白複合体によって酵素活性だけでなく基質特異性についても調節している^{29, 39}。また、IGBP1とPP2Acの複合体がanti-apoptosis能

を獲得することが報告されている²⁵。また、我々の先行研究においても肺癌細胞株においてPP2AcとIGBP1の結合が確認されラクトフェリンがこの結合によるanti-apoptosis機能を阻害することを示した。今回の研究では、80%以上の浸潤癌においてIGBP1とPP2Acが細胞質内において共発現しているが、AAHや非浸潤癌においては陽性像が低くなっている事が示された。また、IGBP1陽性症例はすべて予後が悪かった。これらの結果は、PP2AcとIGBP1の複合体は浸潤癌において普遍的にanti-apoptosis機能を果たし、肺腺癌の進行に寄与し、比較的初期から関与している事が示唆された。IGBP1は細胞質内に認められる報告が認められたが、核内での働きについて報告された論文はなかった。今回の検討において、細胞質の陽性像とは逆に、核の陽性像は浸潤癌と比較して非浸潤癌の方が高かった。PP2Acは核に陽性を示さないため、核内のIGBP1はPP2Acとは結合できず、anti-apoptosis機能は果たせないと考えられる。さらなる検討は必要であるが、核内のIGBP1はアポトーシスの活性化や癌細胞に対する何らかの働きをしている可能性が考えられる。

今回の研究において、我々はIGBP1が進行癌において普遍的に発現しており、肺腺癌の進行と深く関わっている事を示した。その上、進行癌においては細胞質内のPP2AcとIGBP1が複合体を形成してanti-apoptosis機能を果たしている事が推測された。IGBP1の高発現による分子生物学的な機能は非浸潤癌から浸潤癌への悪性化において重要な機能の一つであり、その機能の解析は肺の発癌メカニズムの解明ために必要であると考えられる。

第3章 多発異型腺腫様過形成症例に対するプロテオーム解析

3-1 背景

第1章、第2章においてはanti-apoptosis機能蛋白に着目して注目して免疫組織学的検討を行った。結果的に腺癌の悪性化に係わると考えられるIGBP1遺伝子を同定する事ができたが、異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)形成に係わる因子の同定には至らなかった。そこで、新たなマーカーとなりうるタンパク質の同定のためにプロテオーム解析を行った。

近年LC-MS/MS(Liquid chromatography/tandem mass spectrometry)手法を用いたプロテオーム技術の進歩およびLiquid Tissue™技術(Expression Pathology社)の開発により、ホルマリン固定パラフィン材料を用いて発現タンパク質の同定を行う事が可能となってきた⁴¹。具体的なタンパク質同定には、MS/MSスペクトルのカウント数に基づく、スペクトラル・カウント法(Spectral counting or Identification-based approach)が一般的に用いられる^{42, 43}。タンパク質の定量的解析には培養細胞にラベルを導入するiTRAQ、SILACなどが主流であったが、最近ではラベルフリーの検体においてもAPEX softwareを用いる事により半定量的な解析が可能となってきた⁴⁴。今回我々は多発AAH症例を用いて、AAH病変と正常肺胞上皮からマイクロダイセクション法を用いて検体を採取し、LC-MS/MS手法を用いて発現しているタンパク質を同定し、APEX softwareを用いて半定量的な解析を行い、最終

的にAAHと正常肺胞上皮との差次的解析を行いAAHに特異的に発現しているタンパク質の同定を試みた。材料としては、両側に多発したAAH病変を有しその後肺腺癌が発生した症例の肺葉切除術材料を用いた。多発AAHを有する患者はその後両側にそれぞれ肺癌が発生する確率が高く、AAHからlepidic growth pattern(既存の肺胞上皮細胞を置換しながら増殖する性質)を有する腫瘍への進行を示唆しているといわれている。今回は、肺腺癌への進行が予想されているAAHであるという点、プロテオームに用いるための検体量が十分に採取できるという点の2点から多発AAH症例を用いた。

この章では、プロテオーム解析により正常と比較してAAHに高発現のタンパク質を検索し、AAHへの進行に影響を与えるタンパク質の同定を目指した。

3-2 材料と方法

3-2-(1) 材料

材料は第1章の研究で用いた多発AAH症例を用いた。

(第1章 1-2 材料と方法 参照 8ページ)。

3-2-(2) プロテオーム解析(図18⁴²)

3-2-(2)-a 検体採取

癌部分、AAH部分、正常肺胞部分をそれぞれ20 μ m厚で薄切し、Laser Microdissection Slides(DIRECTOR™)に貼り付け、Hematoxylin染色を行った後、LMD6000(Leica

Microsystems Japan, 東京, 日本)を用いて病変部分のみをマイクロダイセクション法により採取した(図19)。採取量としては、80000 μm^2 を目安に行った。

3-2-(2)-b 前処理

採取された検体はAMR社(東京, 日本)のLiquis Tissue™ MS Protein Prep キットを用い、Liquid Tissue®MS Prep Kit 簡易プロトコールに沿って、トリプシン消化による前処理を行った。

3-2-(2)-c Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)解析

前処理が行われた後、ZAPLOUS LC/MSシステム(AMR社)によって、Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)解析を行い、ペプチドの配列を同定し、swiss protデータベース(Swiss prot_54.1.fasta)を用いてタンパク質を同定した。同定基準は2ペプチド以上とした。

3-2-(2)-d 半定量解析

同定されたタンパク質はAAHから採取されたデータと正常肺から採取されたデータを用い、Apex(J. craig. Venter institute社, サンディエゴ, カリフォルニア, 米国)ソフトを用いて半定量的解析を行った。

3-2-(3) 免疫染色

プロテオームの半定量解析にて同定されたcyclophilin Aに対する免疫染色を行った一次抗体の濃度、賦活化条件に関しては別紙に記した(表3)

3-3結果

3-3-(1) プロテオーム解析

(1) 症例1の多発AAHから同定されたタンパク質は33種類で、正常肺胞上皮から同定されたタンパク質は75種類であった。症例2の多発AAHから同定されたタンパク質は38種類で正常肺胞上皮から同定されたタンパク質は67種類であった。症例3の多発AAHから同定されたタンパク質は147種類で正常肺胞上皮から同定されたタンパク質は151種類であった(表4)。

(2) Apexによる半定量解析では、症例1では7種類、症例2では10種類、症例3では12種類のタンパク質に有意差が認められた。全体としてcollagen、periostinなどの細胞外マトリックス、spectrin beta chain, keratin, transgerin などの細胞骨格タンパク、heat shock protein, Annexin family、などのタンパク質が高発現しているタンパク質として同定された。特に、3症例間で共通しているタンパク質として、症例1症例2のAAHにおいてubiquitinおよびcyclophilinA(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase)が有意に上昇しているタンパク質として同定された(図20-1, 20-2)。そのうちcyclophilinは症例3においても有意差は認められなかったが、P値が0.07とAAHに高い傾向が認められた(図20-3)。

3-3-(2) Cyclophilin Aに対する免疫染色(図21)

プロテオームで同定されたcyclophilin Aに関して、1章で用いた多発AAH症例に対し、免疫組織学的検索を行った。Cyclophilin Aは正常肺の肺胞上皮の核および気管支上皮の胞体および核に陽性を示した。全例のAAHにおいて、核に強い陽性像を示し、胞体にも弱い陽性像を示した。

3-4 考察

3例の多発AAH症例について、それぞれLC-MS/MS解析を行ったが、同定できたタンパク質の種類は症例によって33種類から151種類まで大きな差が認められた。症例間の同定されたタンパク質の差はホルマリン固定条件、固定後の年数など様々な要因と考えられる。ただし、3症例ともAAHと比較して正常肺に多くの種類のタンパク質が認められた。実際には正常肺胞上皮は1型肺胞上皮、2型肺胞上皮、細血管、肺胞マクロファージなど様々な細胞から構成されているため同定されるタンパク質の種類が均一な細胞集団であるAAHに比べて多くなったものと考えられる。AAHと正常肺胞上皮との半定量的解析にて差があったタンパク質のほとんどが正常肺胞上皮に高発現なものではなくAAHに高発現なものであるという結果もそれを示唆する所見と考えられる。

APEXによる半定量的な比較を行ったところ、AAHと正常肺胞上皮との間で共通して発現差のあるタンパク質として、ubiquitinおよびPeptidyl-prolyl cis-trans isomerase Aが見つかった。そのうちPeptidyl-prolyl cis-trans isomerase Aは症例1症例2において有意差が認められ、症例3においてもp値が0.07とAAHに高くなる傾向を認めた。

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Aは別名としてCyclophilin Aとも呼ばれている。

Cyclophilin(Cyp)は大腸菌からヒトに至る生物に普遍的に存在しているタンパク質である。そのなかでもCyclophilin AはCypのなかでも最も豊富なタンパク質であり、細胞基質に存在している。Cyp Aは移植時などに使用される免疫抑制剤であるシクロスポリンと特

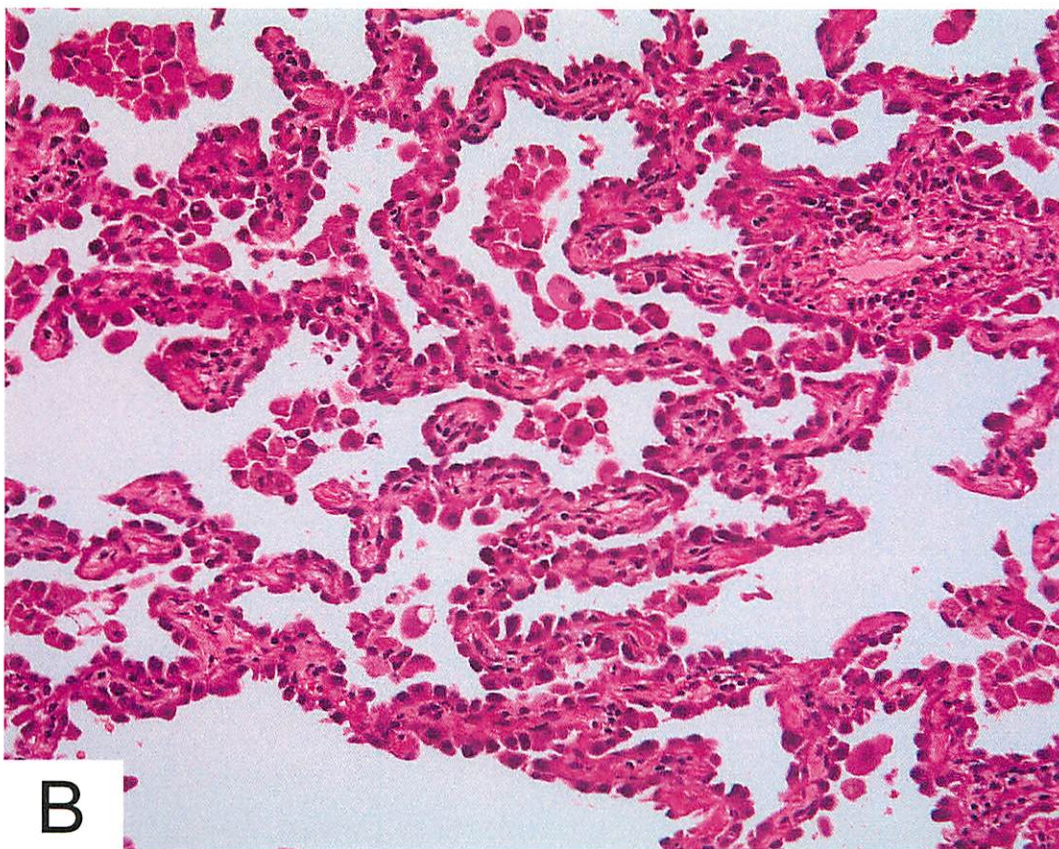
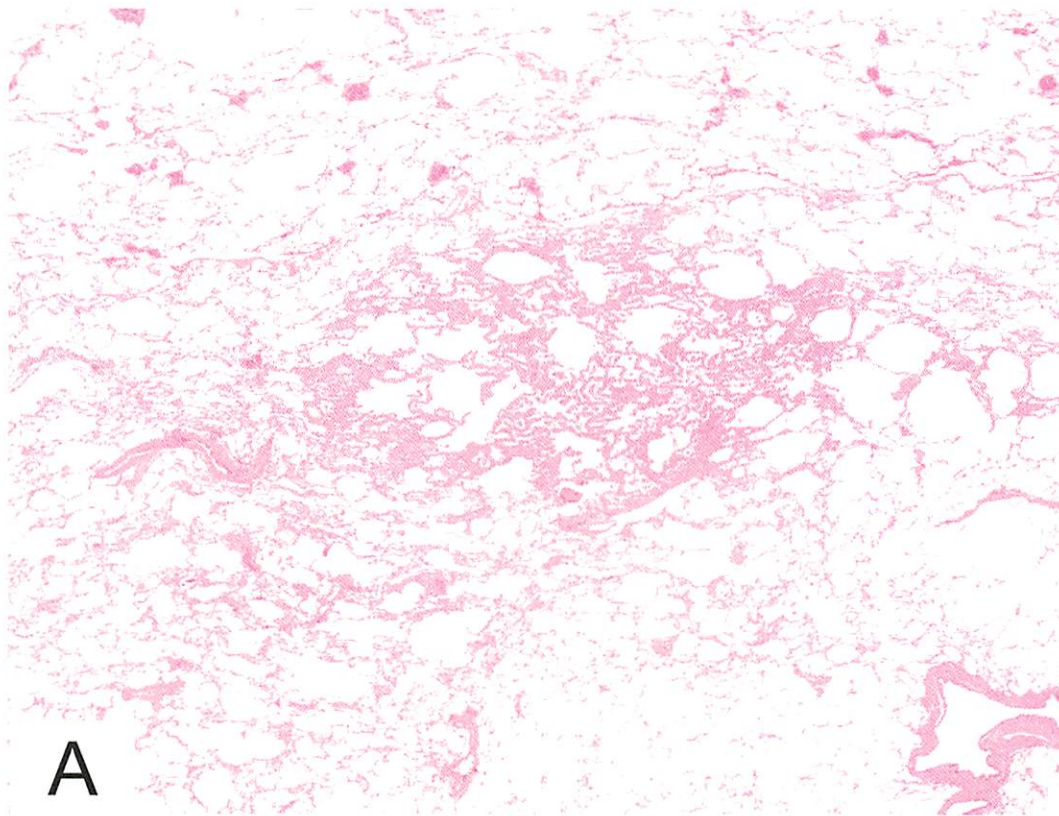
異的リガンドとして発見され、ポリペプチドのプロリンのアミド結合のシスからトランスへの異性化を触媒する活性(peptidyl prolyl isomerase (PPIase)活性)を有する⁴⁵。さらに、シャペロン酵素であり、misfoldingされたタンパク質を修復させる働きも持つ。よって、多くの細胞ストレスによる細胞傷害から守る働きを有する。そのほかにもCypAはウイルス感染、T細胞機能、筋分化および免疫応答に関与すると言われている⁴⁶。また、膵臓癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、扁平上皮癌、メラノーマおよび肺の非小細胞腺癌^{47, 48}で高発現である事が報告されている⁴⁶。腫瘍におけるCypAの機能は完全にわかっていないが、多くの腫瘍において、腫瘍増殖、anti-apoptosis機能の獲得、悪性化および転移の制御に関与しているという報告がある⁴⁵。ただし、免疫組織学的検索では、正常の肺胞上皮に陽性を示したため、定量的な評価は難しい。しかし、鏡検上核の陽性像は明らか濃くなっており、胞体への陽性像も認められた。よって、今回の結果から、AAHの状態ですでにCyclophilin Aの発現亢進が起きている可能性が示唆された。Cyclophilin Aは多機能蛋白であるが、anti-apoptosisの機能獲得についても報告されており⁴⁵、興味深い。Cyclophilin Aの分子生物学的な機能の検索が今後の課題である。

総括(図22)

1章から3章を通じて、我々は肺腺癌の初期悪性化に関わる因子について検討した。具体的には異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)と呼ばれる肺腺癌の前癌病変から非浸潤癌に相当する野口分類⁶のType A, Bそして浸潤癌に相当する野口分類のType C, D, E and F への進行について検討した。まず我々はanti-apoptosis機能に注目して検索を行った。第1章において、肺腺癌の初期で発現亢進が知られているanti-apoptosisタンパク質についてAAHですでに発現亢進が起きているタンパク質の検索を免疫組織学的に行った。その結果PP2AcがすべてのAAHですでに発現亢進が認められる事が明らかとなった。興味あることに、PP2AcはIGBP1との複合体を形成することでanti-apoptosis機能を獲得することが知られているタンパク質²⁵であるが、AAHにおいてIGBP1の発現は認められなかった。第2章にてPP2AcとIGBP1のさらなる検討を小型肺腺癌を用いて免疫組織学的に検討した。その結果PP2AcはAAHから浸潤癌まで解析したすべての症例に陽性像を示したが、IGBP1は浸潤癌に進行することによって有意に陽性像が高くなった(野口分類Type A-B vs C-F)。また血管浸潤・リンパ管侵襲・胸膜浸潤・リンパ節転移を有する症例は全てIGBP1陽性を示し、死亡症例も全てに陽性であった。治療の背景が異なるものの、予後についてもカプランマイヤー曲線を描きlog rank検定を行い、有意差が認められた。以上よりIGBP1は初期病変における発現は限られているものの進行癌では普遍的に発現しており、肺腺癌の悪性化と深く関わっている可能性が示唆された。

第3章では第1章・第2章において至れなかった正常からAAHへの進行に関わる因子の網羅的な同定のためにプロテオームを用いて新規タンパク質の検索を行った。AAHが多発している3症例を用いて、AAH部分および正常部分をそれぞれマイクロダイセクションにて採取しLS-MS/MSにてタンパク質を同定し、APEX software⁴⁴にて半定量的解析を行った。3例に共通して正常組織に比して高発現していたタンパク質としてcyclophilin Aが同定された。Cyclophilin Aは多機能蛋白であるが、anti-apoptosisとの関与も報告されており、興味深い。分子生物学的意義を含めて更なる検討が今後の課題である。

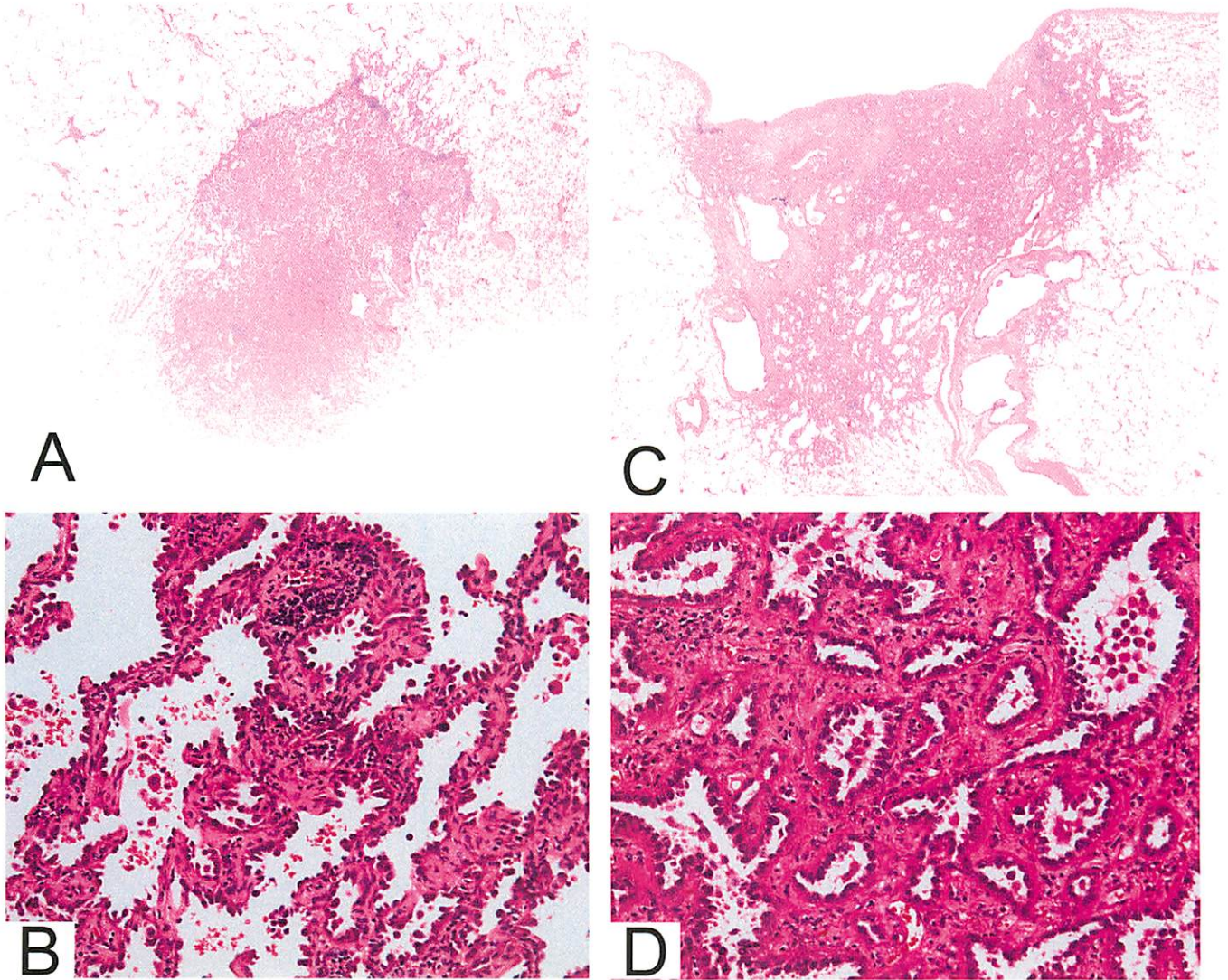
図1 異型腺腫様過形成の組織像



異型腺腫様過形成(atypical adenomatou hyperplasia:AAH)の組織像、
A弱拡大像(x20) B強拡大像(x200)

辺縁は不鮮明な含気病変で、小型の異型に乏しい腫瘍細胞が肺胞上皮置換性に増殖している

図2-1 野口分類 Type A, Type Bの組織像



野口分類Type A, Type B の組織像

A : 野口Type A 弱拡大像(x1 : ルーペ像)

B : 野口Type A 強拡大像(x200)

C : 野口Type B 弱拡大像(x1 : ルーペ像)

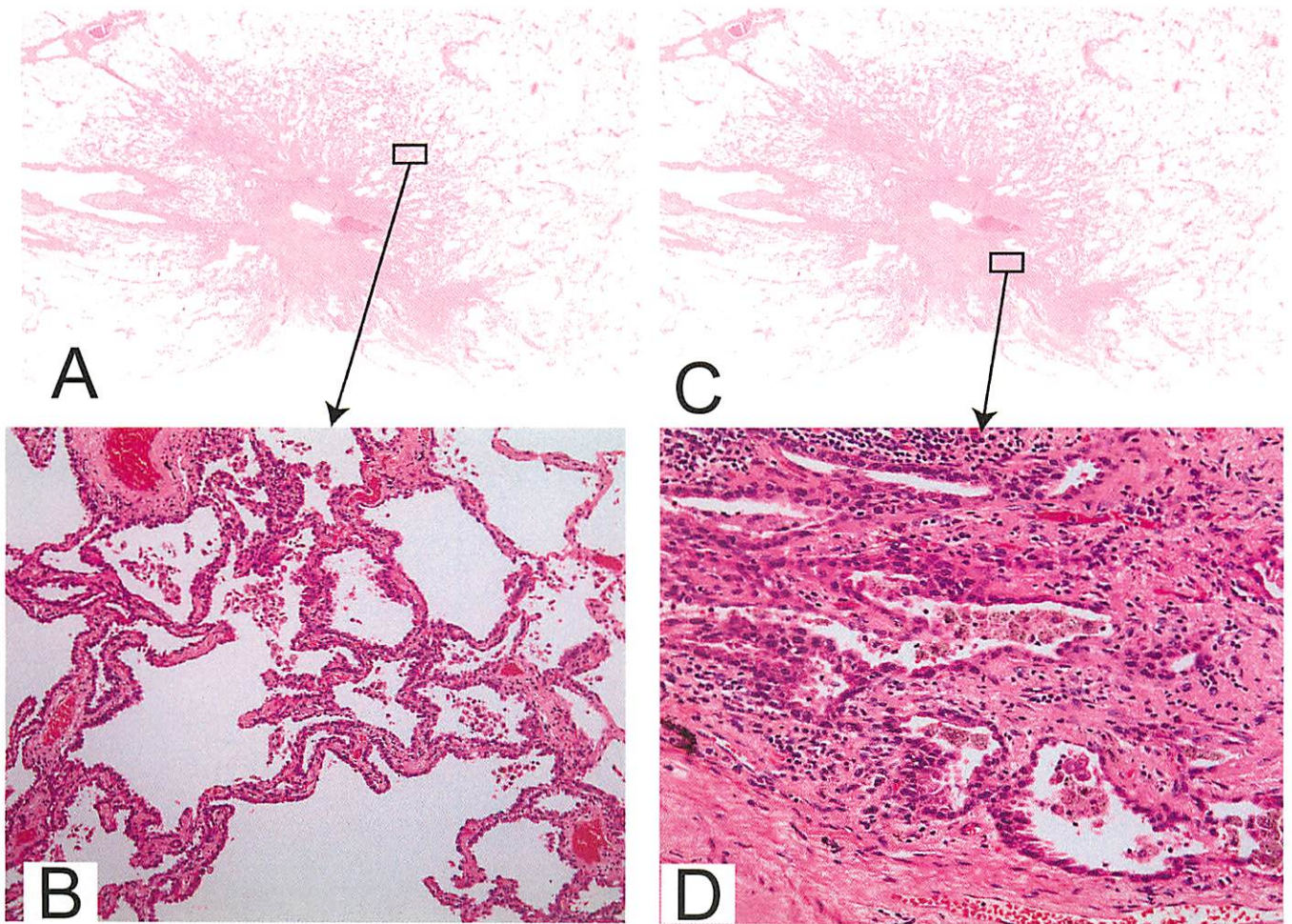
D : 野口Type B 強拡大像(x200)

野口分類Type A: 肺胞上皮置換性腫瘍のみからなる腫瘍
線維化巣は認められない

野口分類Type B : 肺胞上皮置換性の腫瘍であるが、
内部に肺胞虚脱型の線維化巣を認める

(文献 5)

図2-2 野口分類 Type Cの組織像



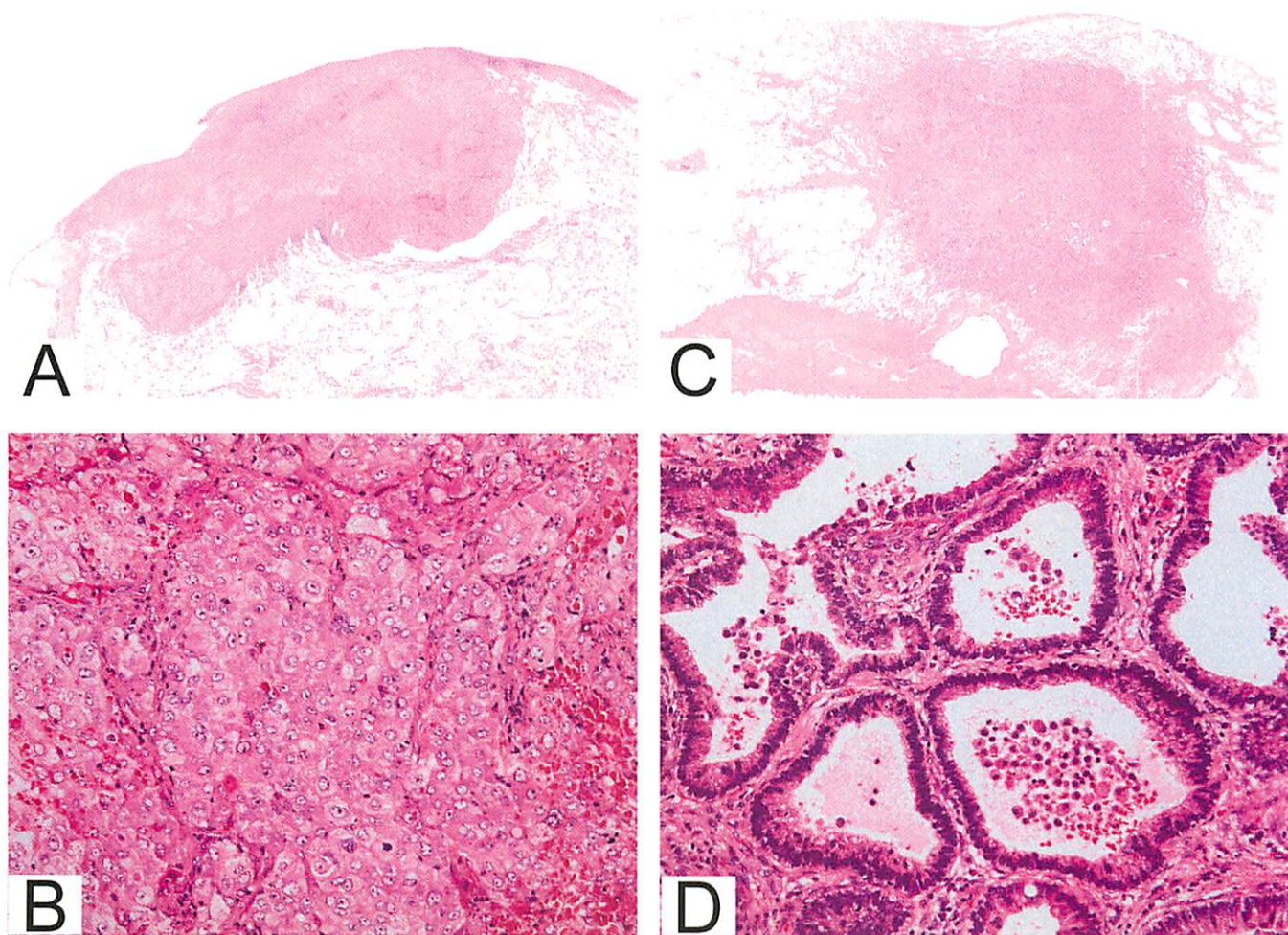
野口分類Type C の組織像

- A : 野口Type C 弱拡大像 (x1 : ルーペ像)
- B : 野口Type C 辺縁部 強拡大像 (x100)
- C : 野口Type C 弱拡大像 (x1 : ルーペ像)
- D : 野口Type C 中心部 強拡大像 (x200)

野口分類TypeC: 肺胞上皮置換性の腫瘍であるが、内部に線維芽細胞を認める

(文献 5)

図2-3 野口分類 Type D, Type Eの組織像



野口分類Type D, Type E の組織像

A : 野口Type D 弱拡大像 (x1 : ルーペ像)

B : 野口Type D 強拡大像 (x200)

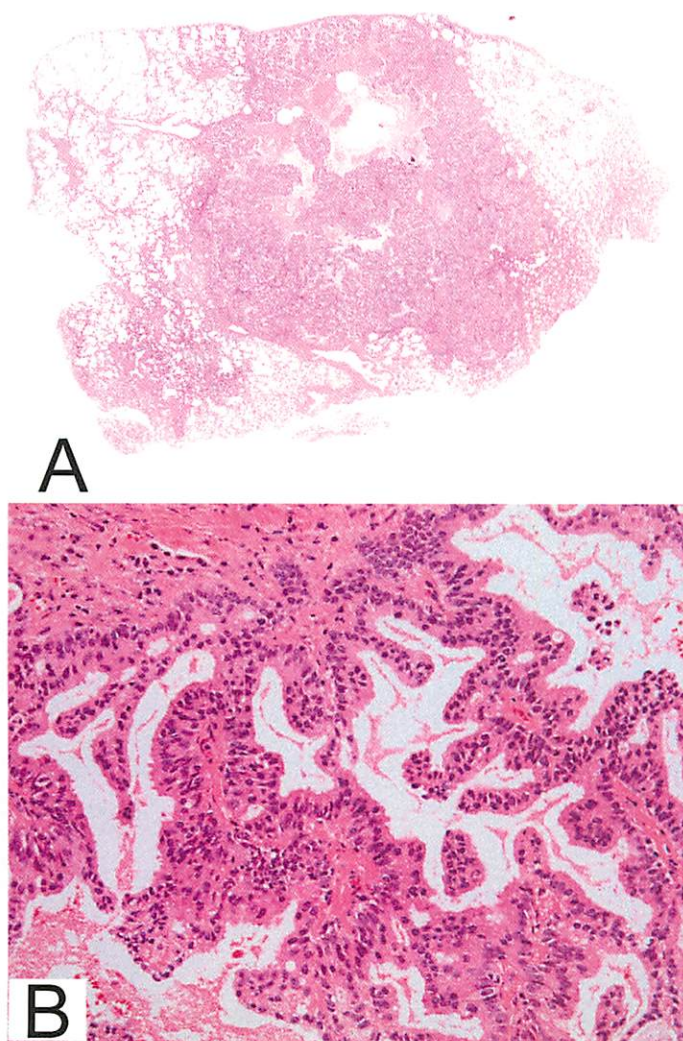
C : 野口Type E 弱拡大像 (x1 : ルーペ像)

D : 野口Type E 強拡大像 (x200)

野口分類TypeD: 充実性に増殖する低分化腺癌
肺胞上皮置換性の部分を有しない

野口分類TypeE: 管状腺癌

図2-4 野口分類 Type Fの組織像



野口分類Type F の組織像

A : 野口Type F 弱拡大像 (x1 : ルーペ像)

B : 野口Type F 辺縁部 強拡大像 (x200)

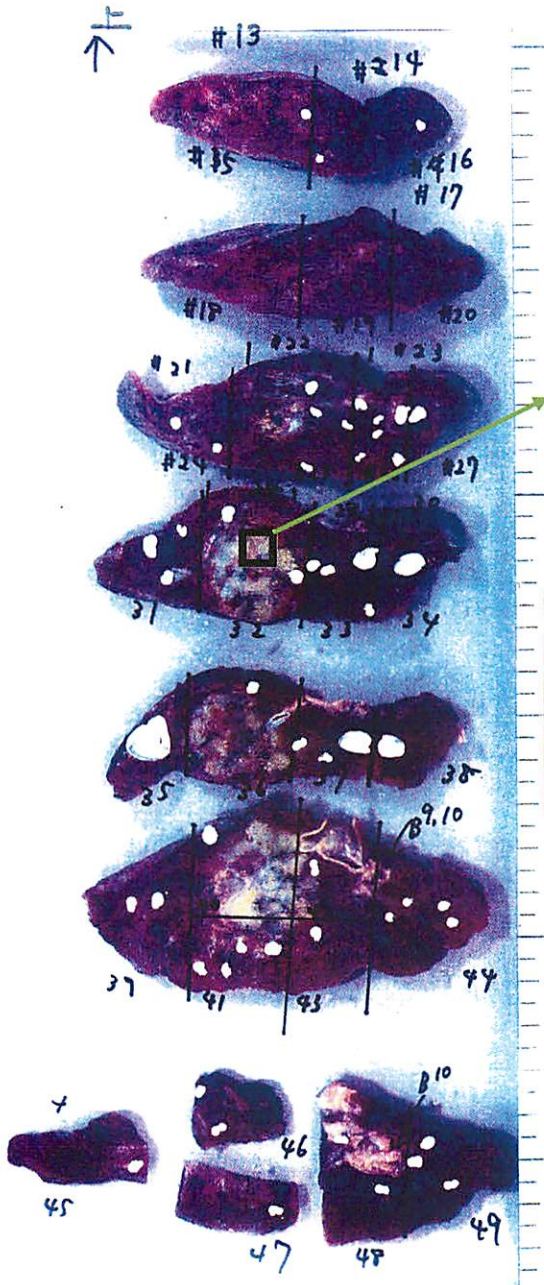
野口分類Type F: 肺胞上皮非置換性に増殖する真の乳頭
状腺癌

(文献 5)

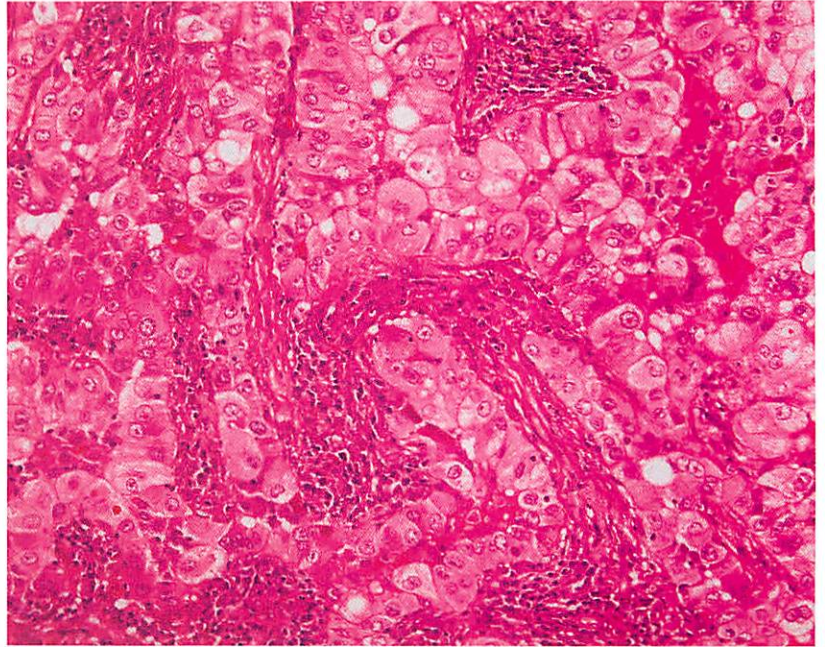
図3-1 多発異型腺腫様過形成症例1のマクロ像およびミクロ像

症例1: 1995年5月11日左肺下葉切除(筑波大学附属病院)

切り出し図の一部

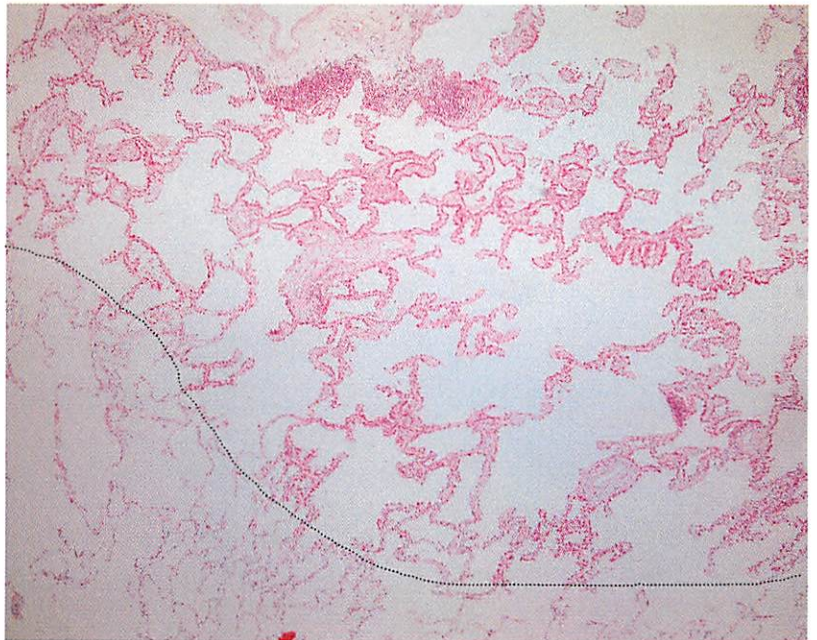


腫瘍部の組織像



組織学的に乳頭癌と診断された(x200)。

異型腺腫様過形成



異型腺腫様過形成と正常の境界を点線で示す。
左下: 正常、右上: AAH (x40)

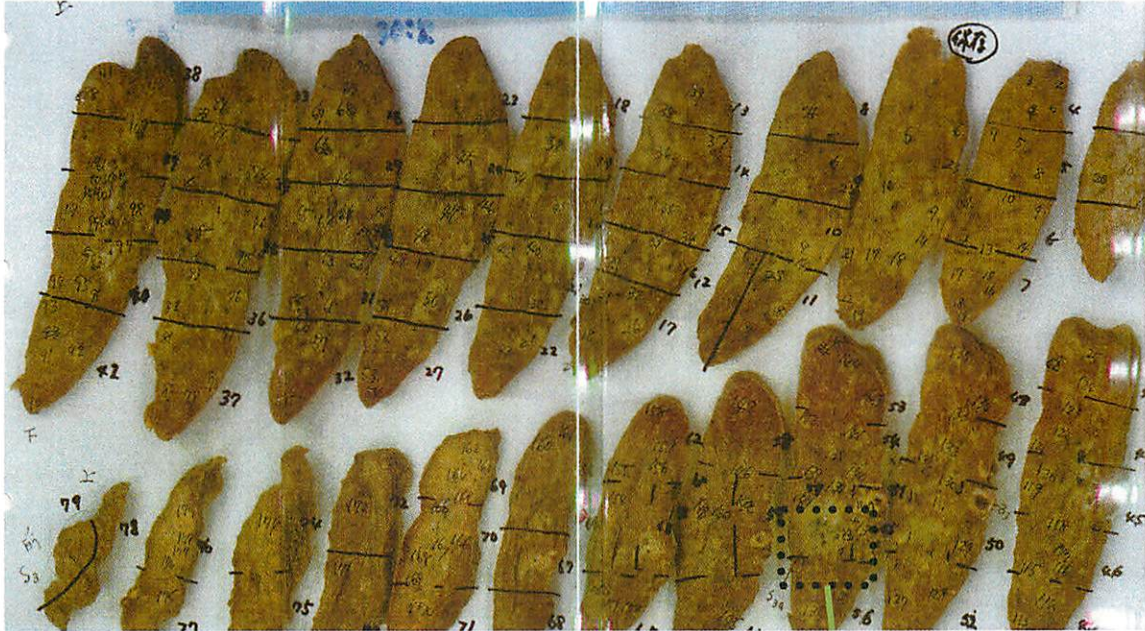
※ 白点: 異型腺腫様過形成
(atypical adenomatous hyperplasia: AAH)

合計100個以上のAAHが認められた。

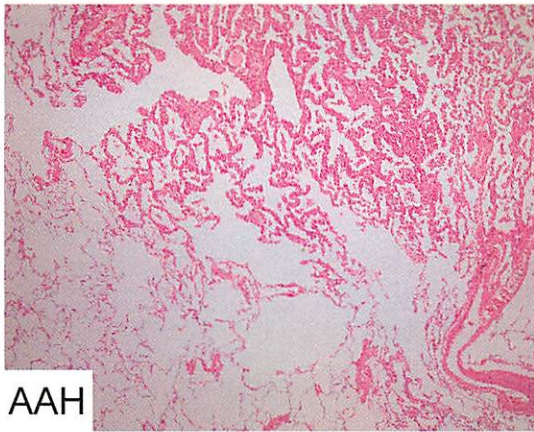
図3-2 多発異型腺腫様過形成症例2のマクロ像およびミクロ像

症例2:2001年10月22日右肺上葉切除(土浦協同病院)

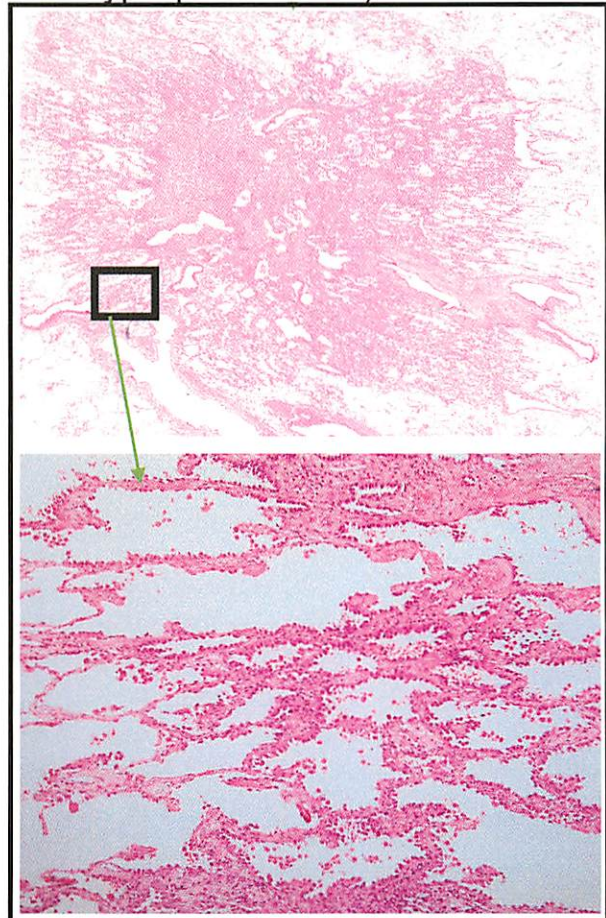
切り出し図



淡く白色に見える部分が全て異型腺腫様過形成
(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)



AAHは合計179個見つかった。
(x100)



同時に存在した腺癌は高分化型腺癌である。
(上 x1(ルーペ像)、下 x100)

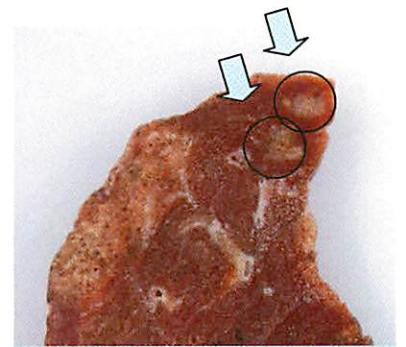
図3-3 多発異型腺腫様過形成症例3のマクロ像およびミクロ像

症例3: 2006年2月23日右肺上葉切除(筑波大学附属病院)

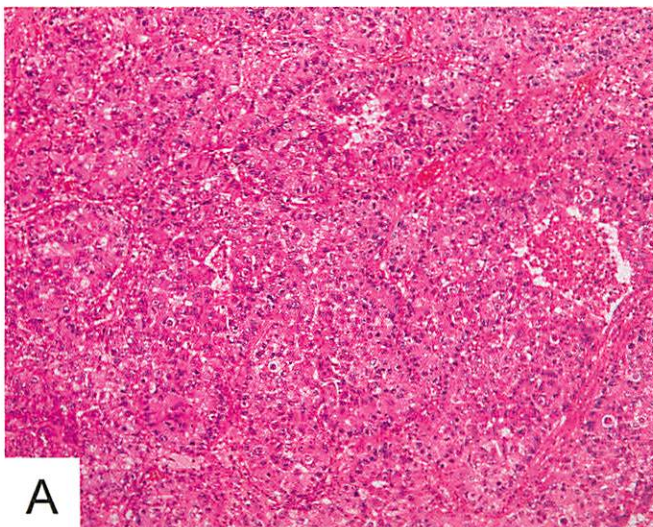
切り出し図



腫瘍



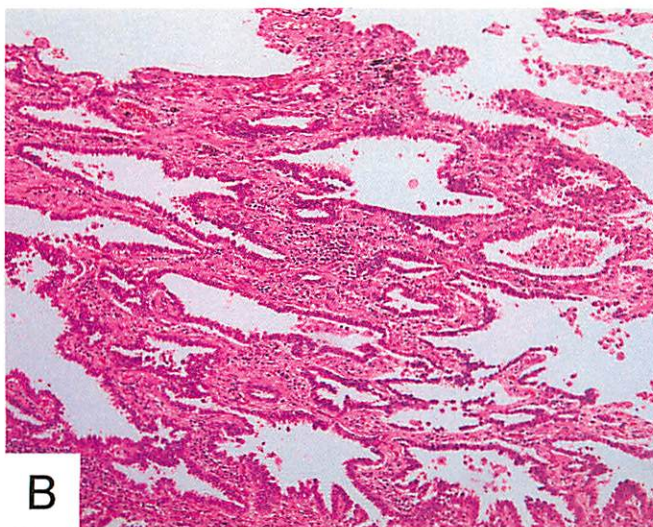
異型腺腫様過形成
atypical adenomatous hyperplasia
AAH



A



C



B

腫瘍は低分化腺癌であった (A: x200)。

しかし辺縁には肺胞上皮置換性増殖部も認められた (B: x100)。

異型腺腫様過形成 (AAH) は合計81個認められた (C: x100)。

図4 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するBI-1(Bax inhibitor 1)の免疫染色

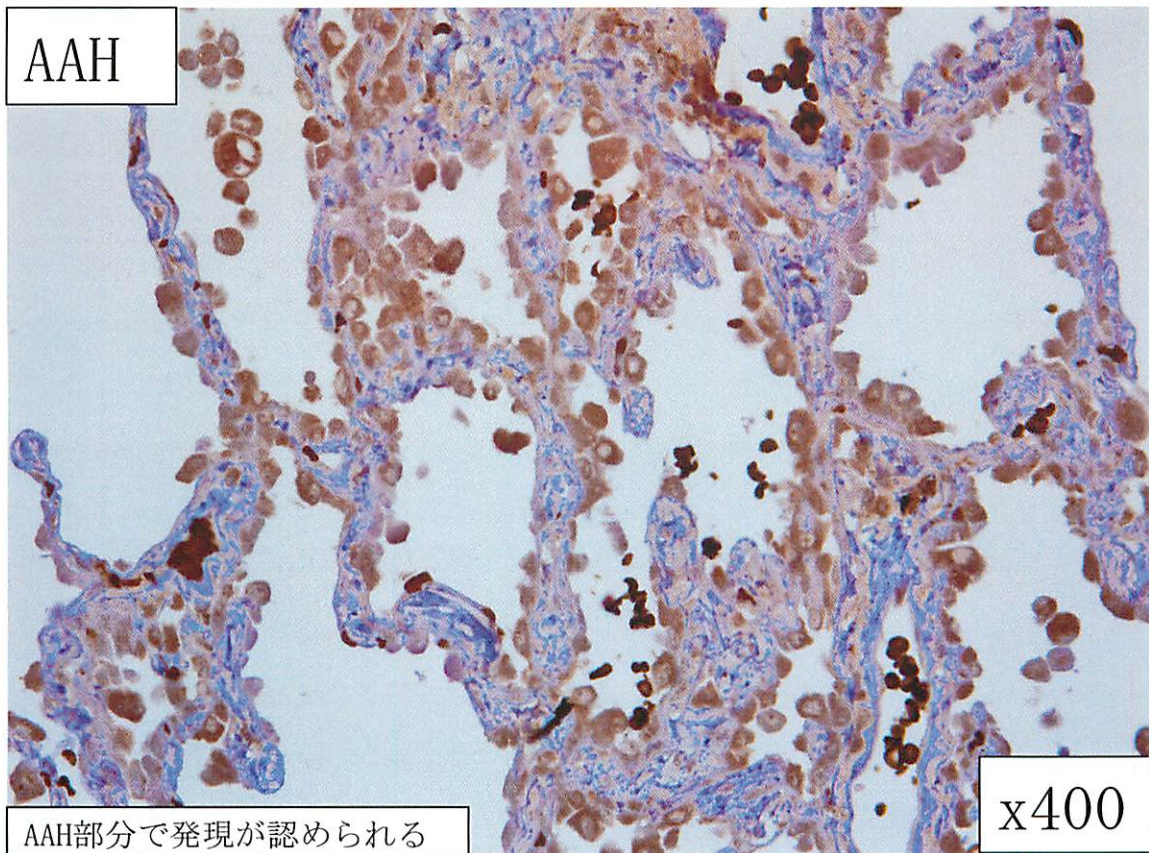
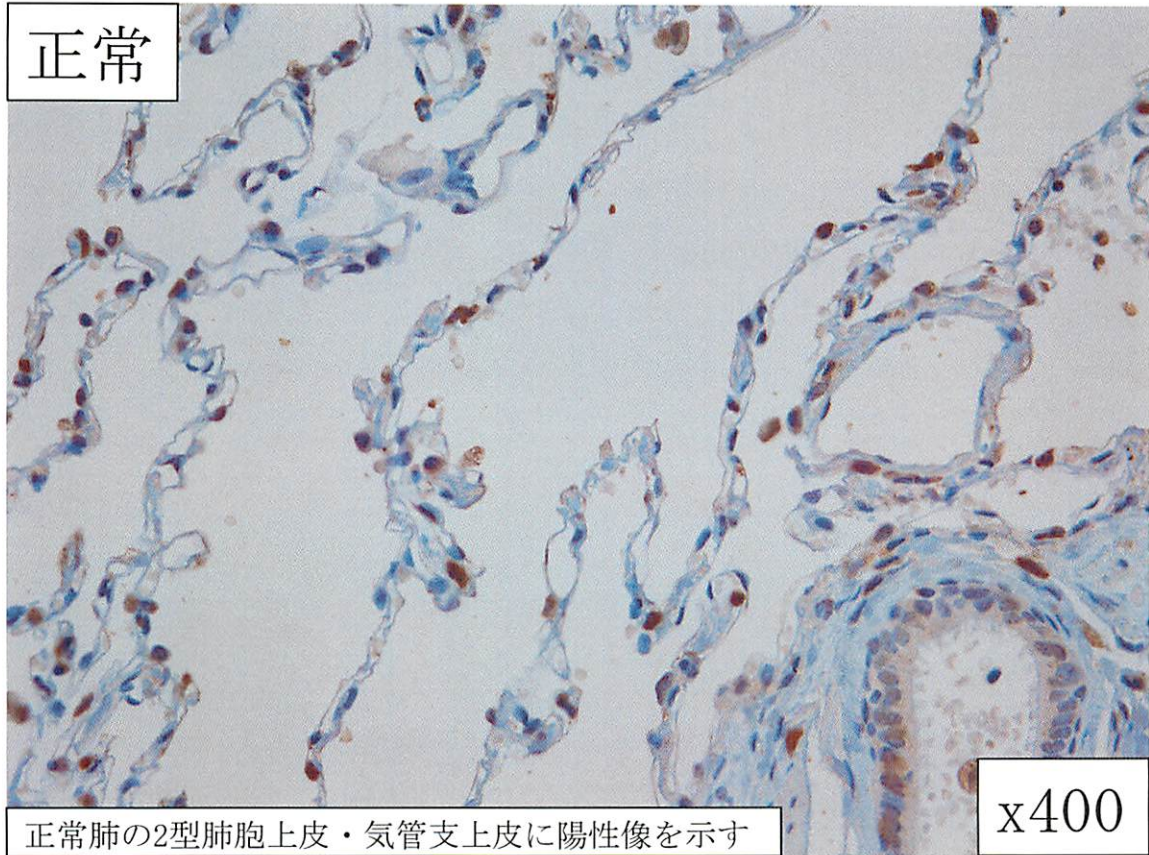
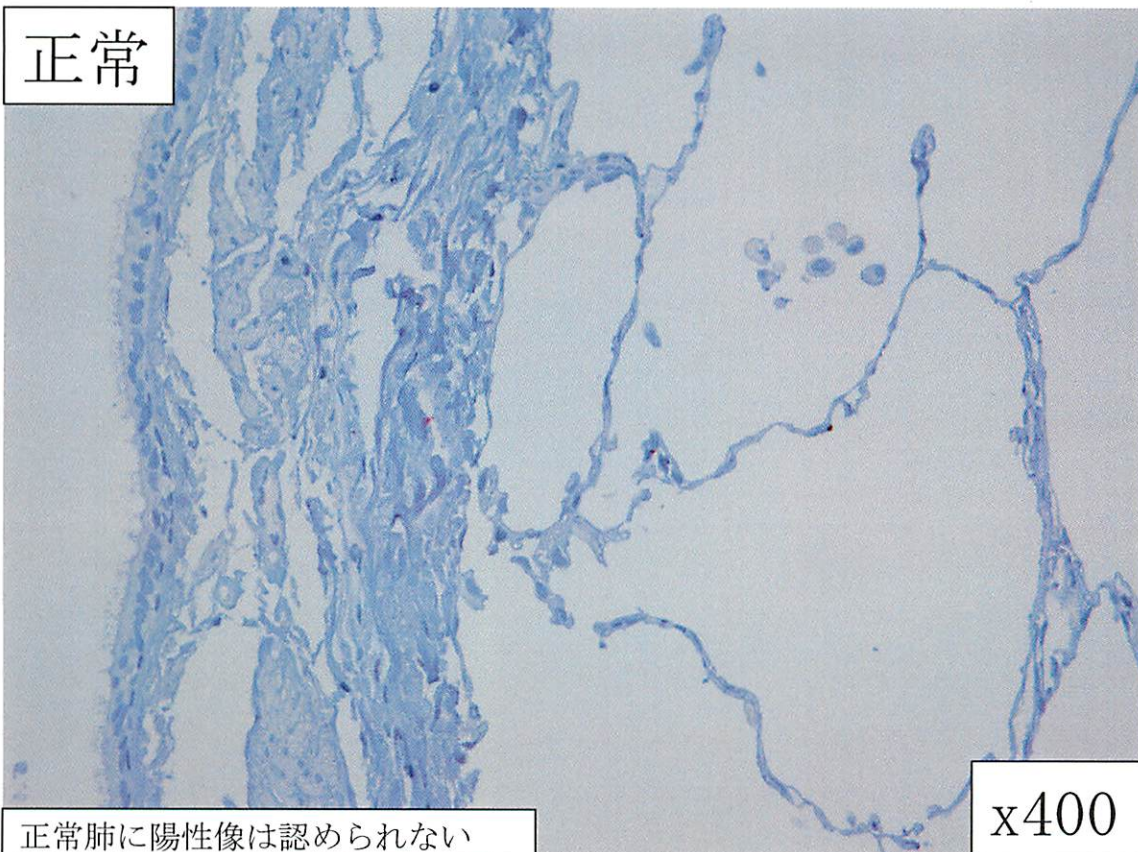


図5 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するP-Src(Phosphorylated Src)の免疫染色

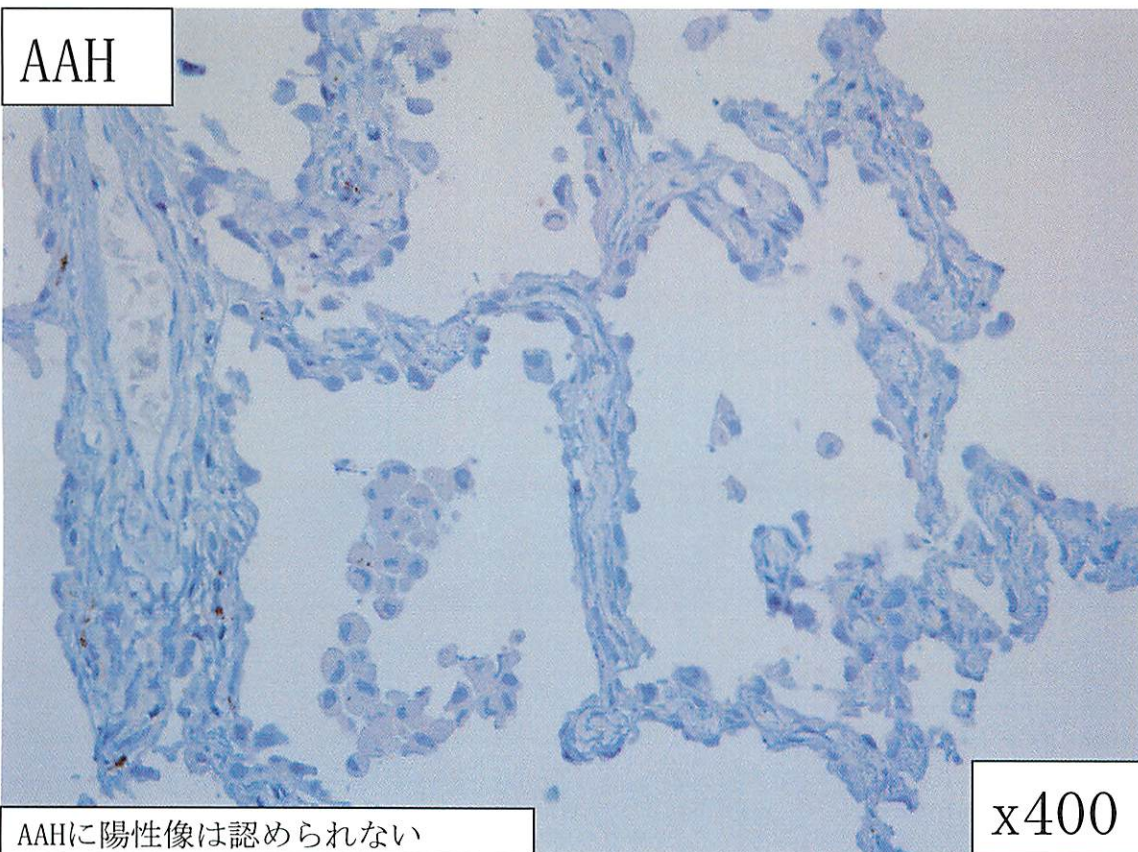
正常



正常肺に陽性像は認められない

x400

AAH



AAHに陽性像は認められない

x400

図6 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するXIAP(X-like inhibitor of apoptosis protein)の免疫染色

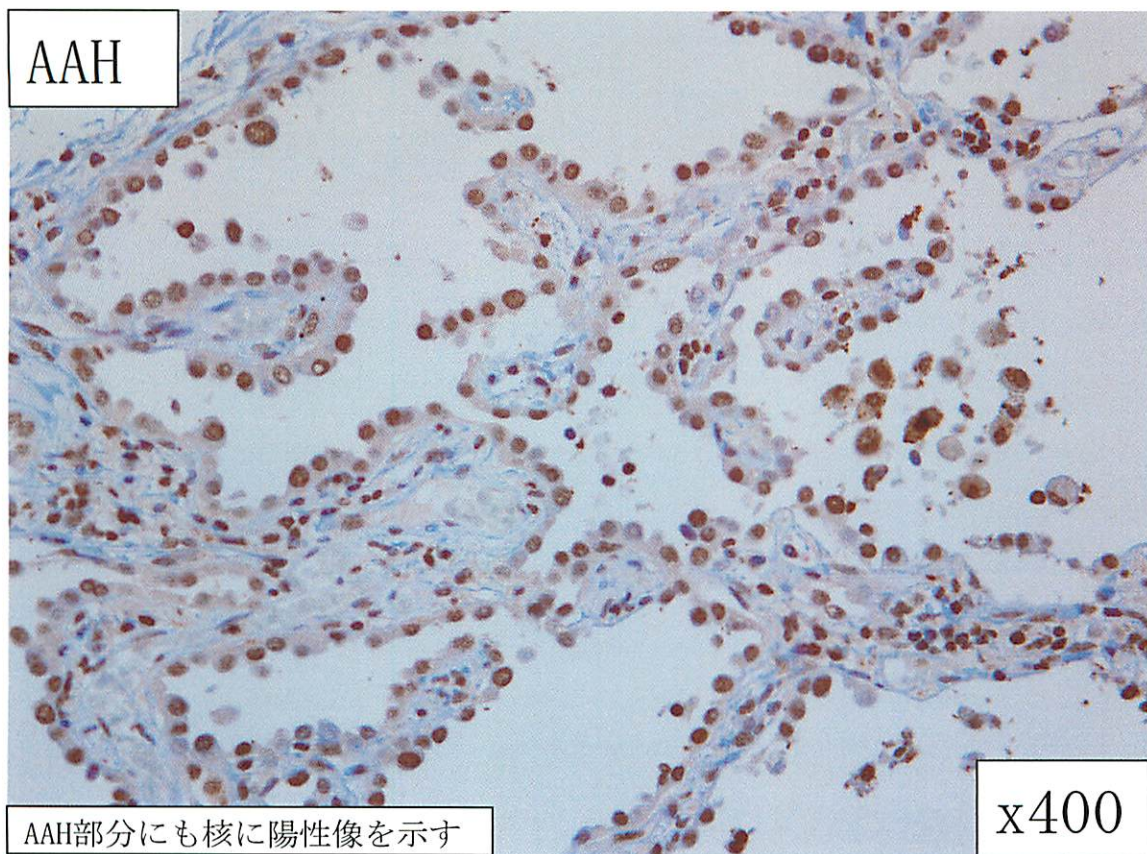
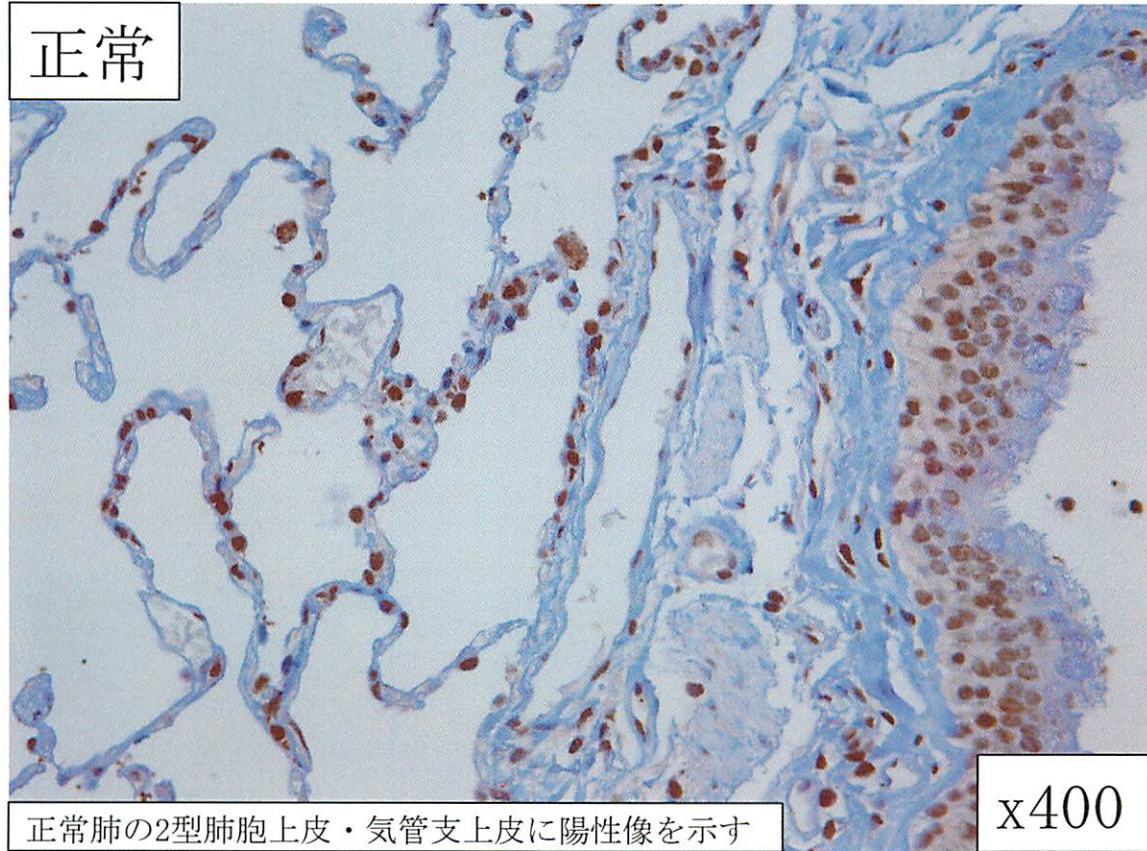
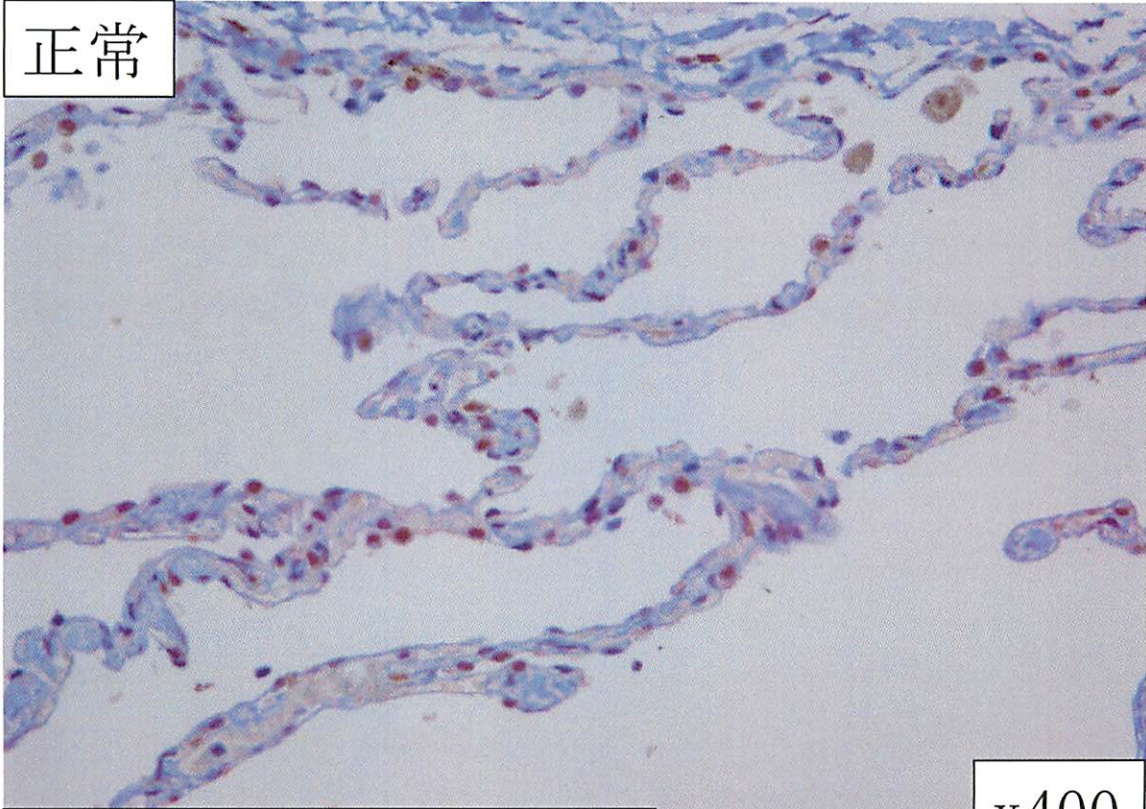


図7 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するSurvivinの免疫染色

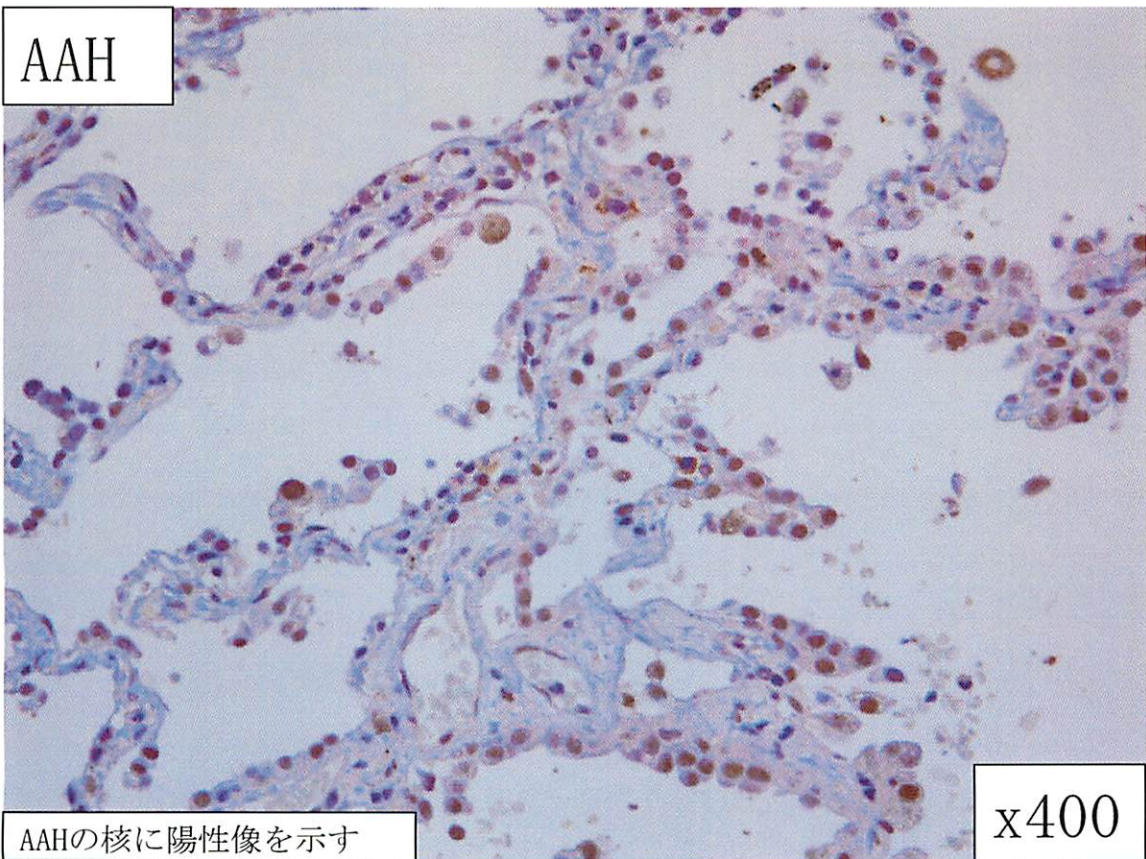
正常



正常肺の2型肺胞上皮の核に陽性像を示す

x400

AAH



AAHの核に陽性像を示す

x400

図8 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia AAH)に対するHSP(Heat shock protein)27の免疫染色

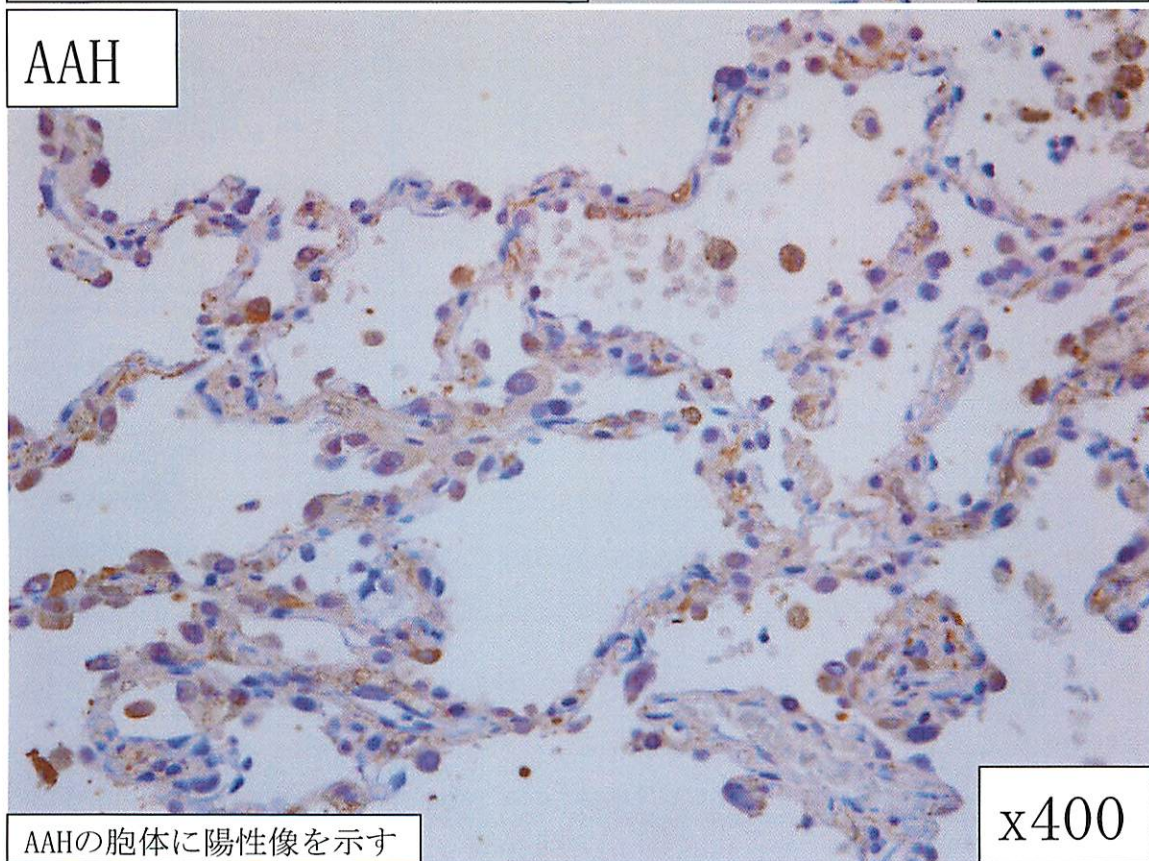
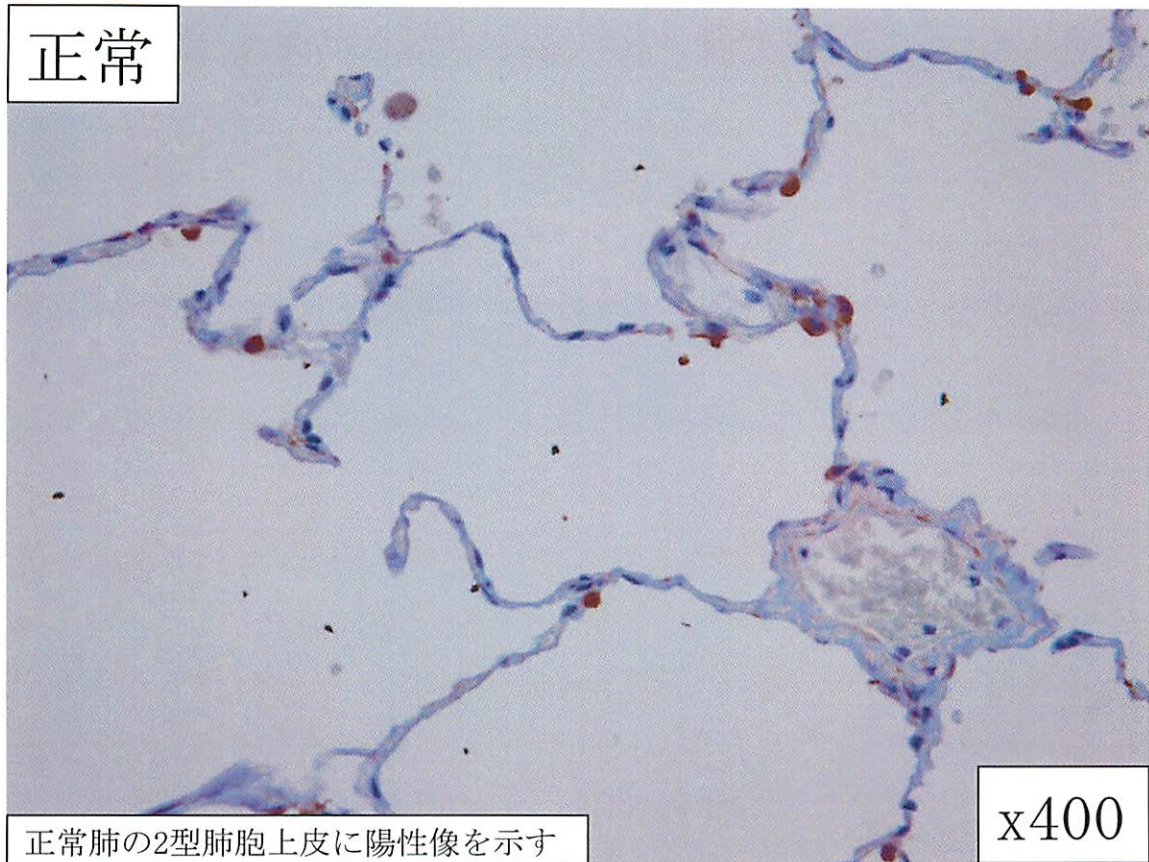
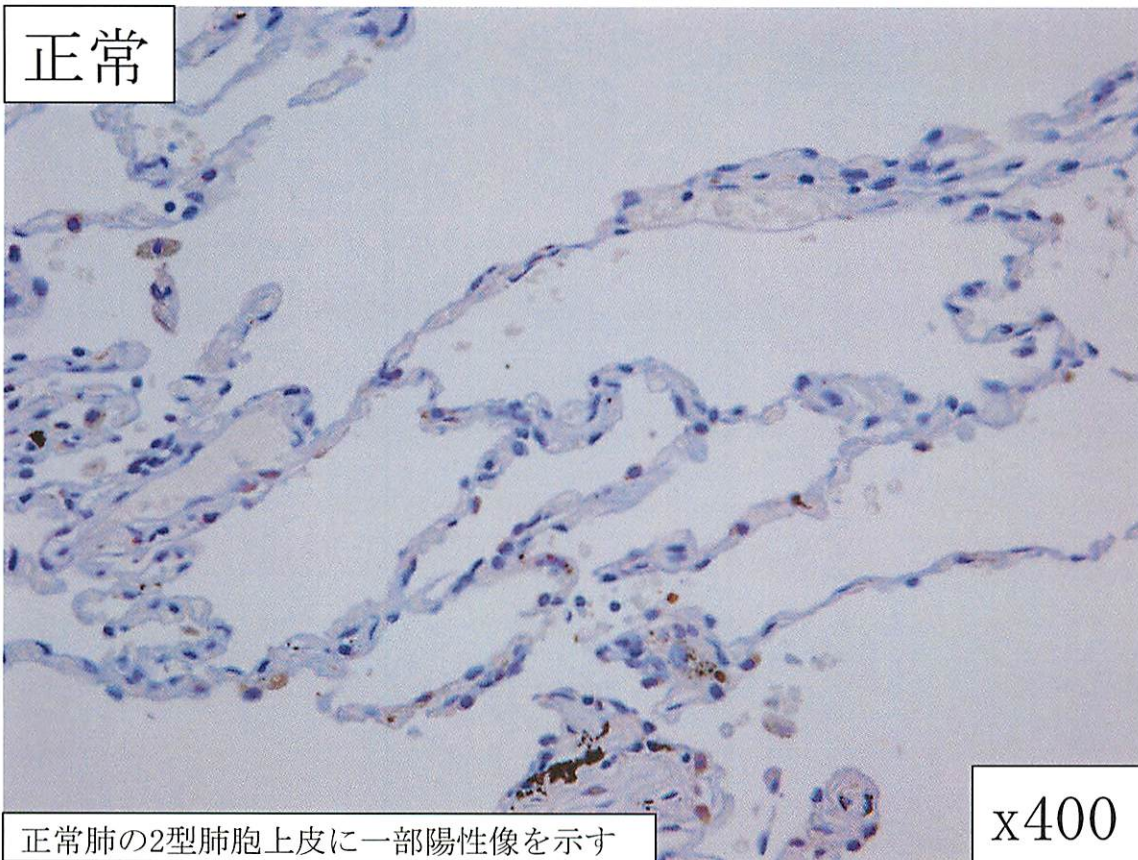


図9 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するGRP78(Heat shock protein 70)の免疫染色

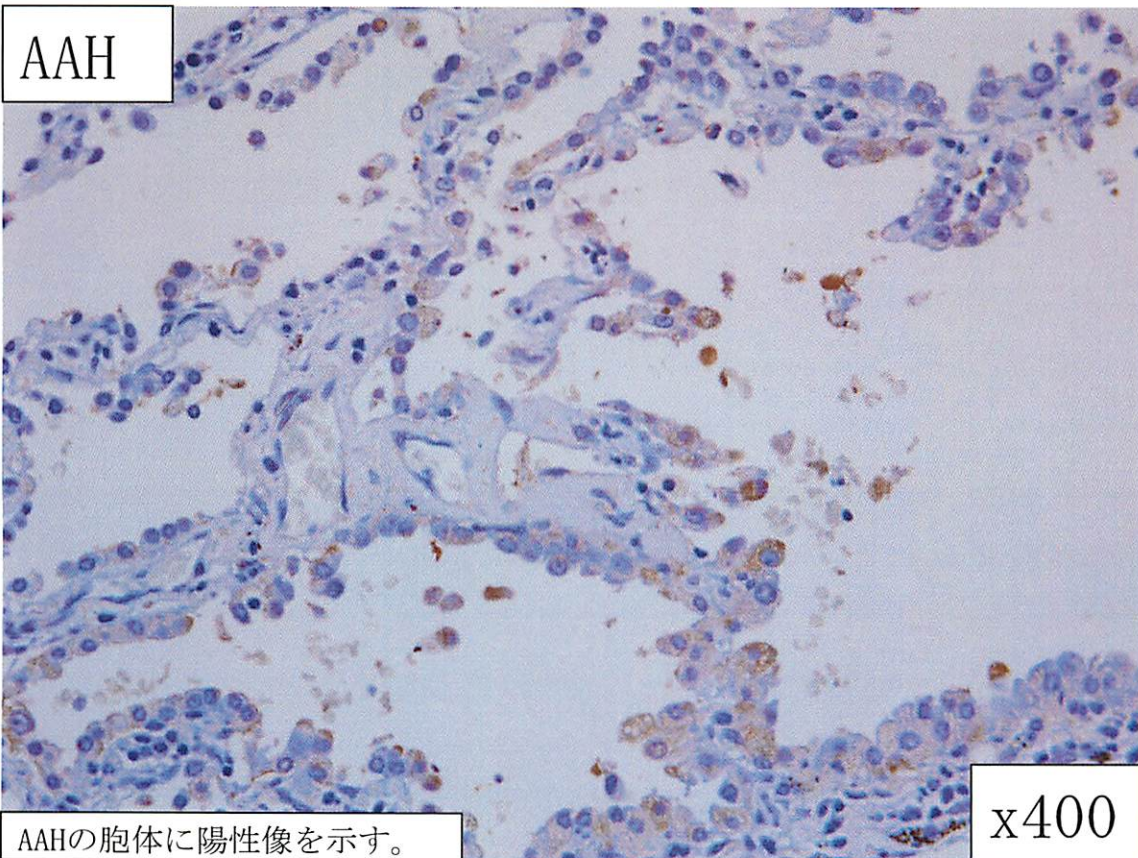
正常



正常肺の2型肺胞上皮に一部陽性像を示す

x400

AAH



AAHの胞体に陽性像を示す。

x400

図10 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するPP2Ac(Protein phosphatase 2A)の免疫染色

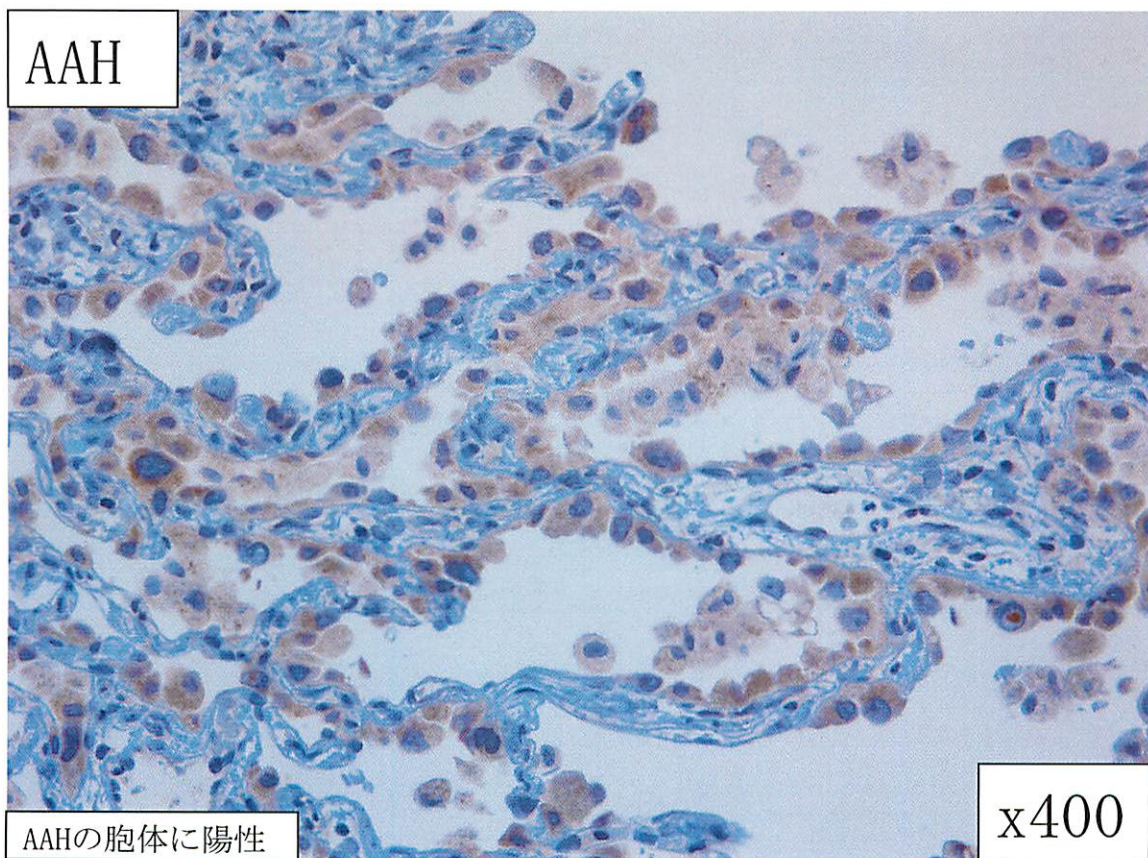
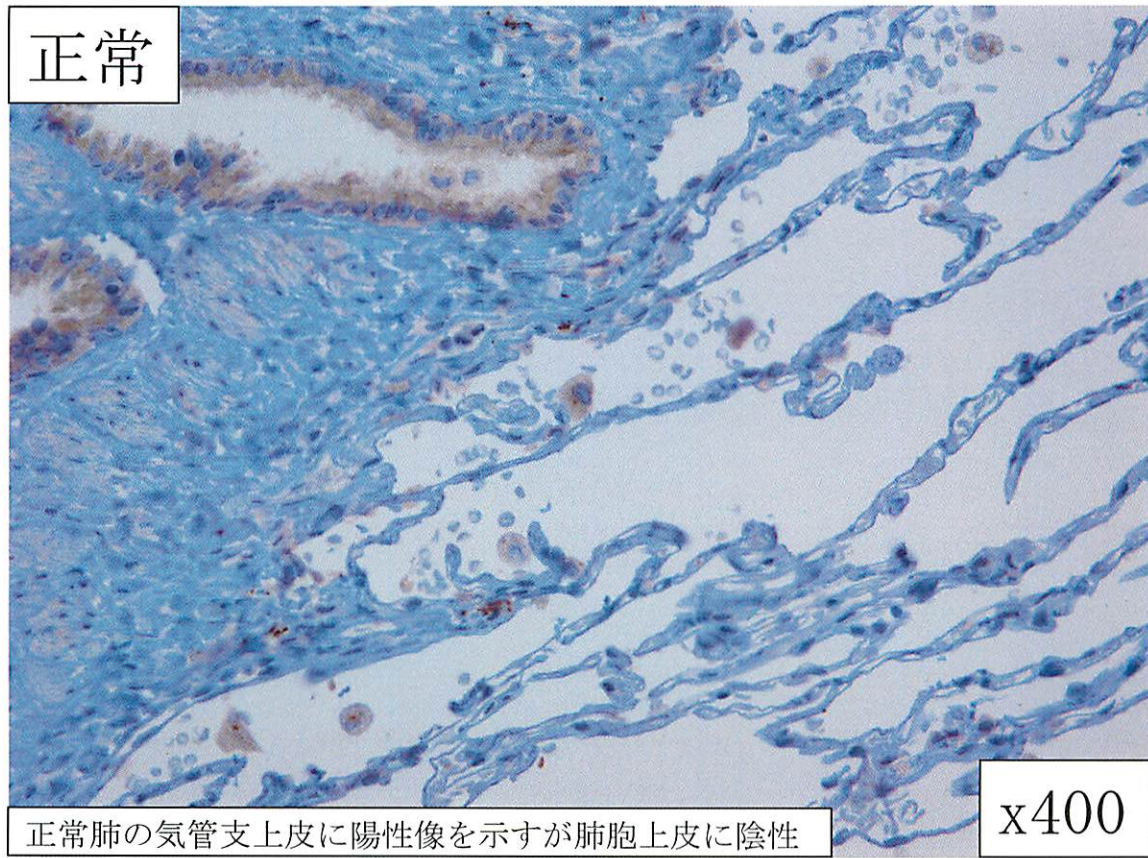


図11 正常および異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)に対するIGBP1(Immunoglobulin binding protein 1)の免疫染色

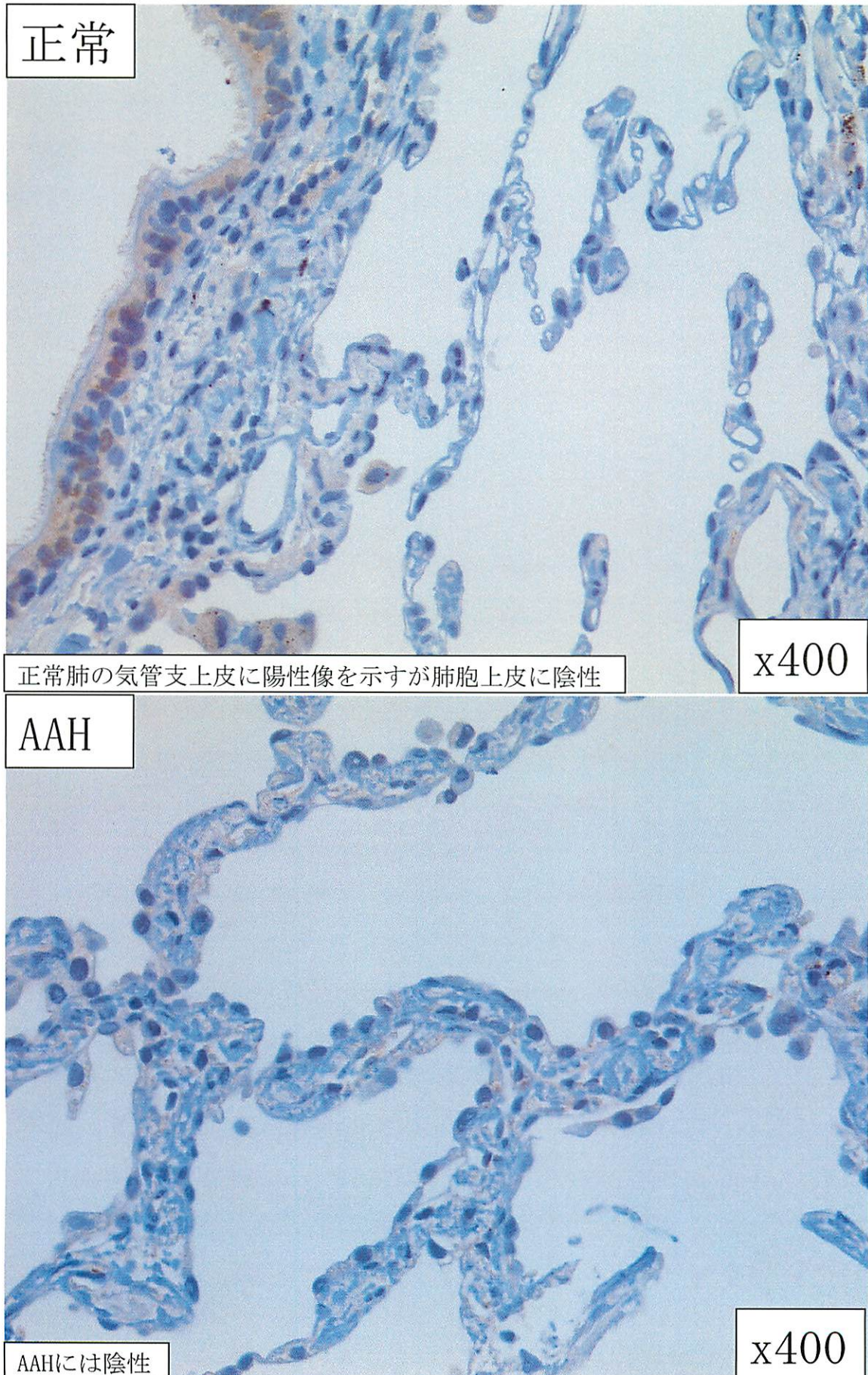
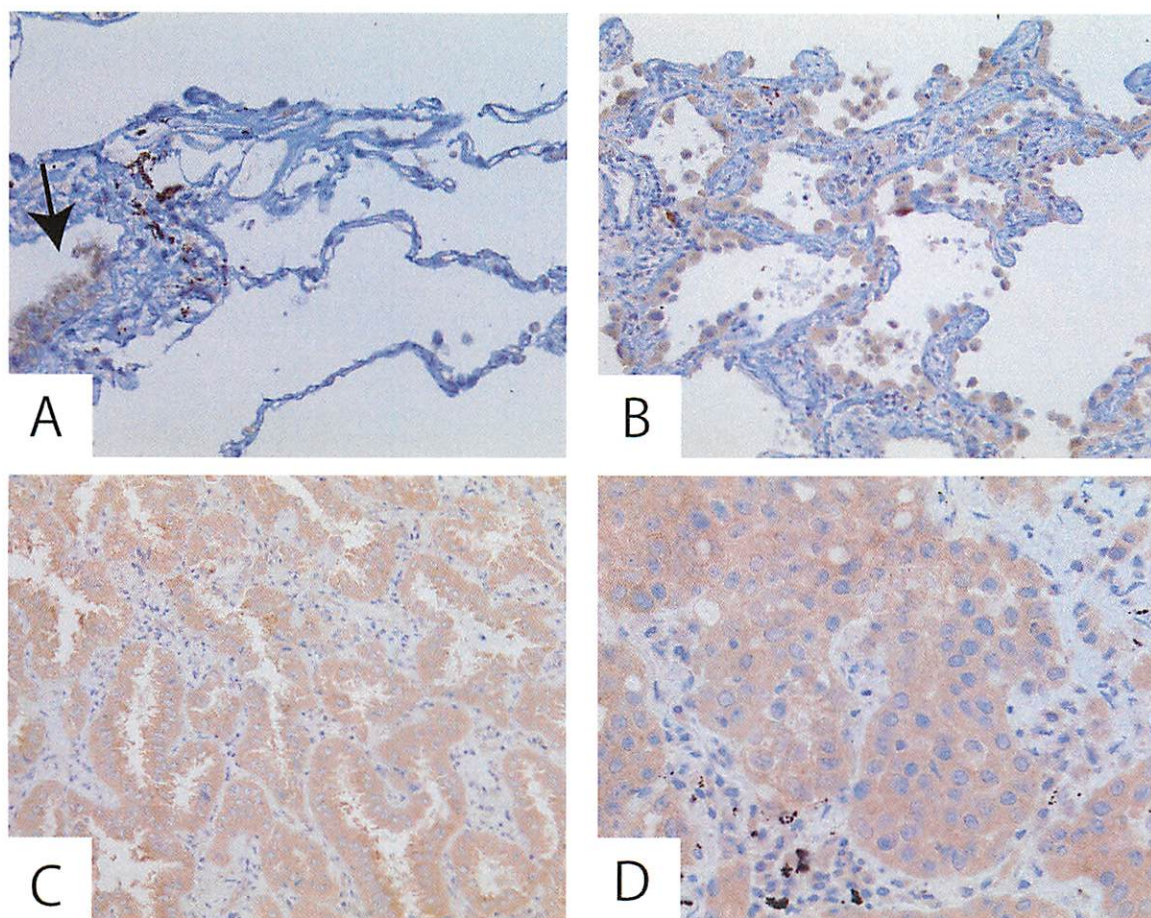


図12 正常および小型肺腺癌に対するPP2Acの免疫染色

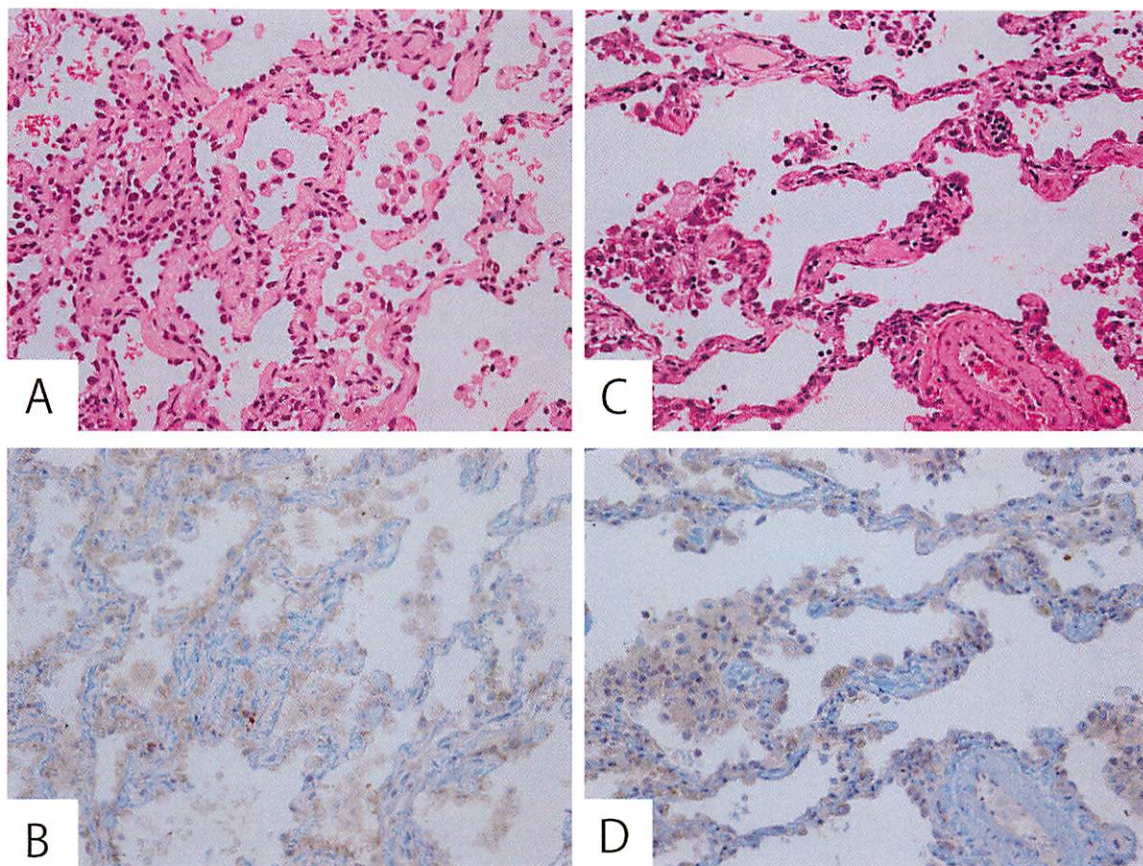


パラフィン包埋標本に対するPP2Acの免疫染色(全てx400)。

正常肺においては、正常気管支上皮に陽性像を示す(矢印)が、肺胞上皮には陰性である。野口分類TypeA腺癌、typeC腺癌、typeD腺癌のすべての症例において、細胞質に陽性像を示した。

図13 反応性の2型肺胞上皮と異型腺腫様過形成(atypical

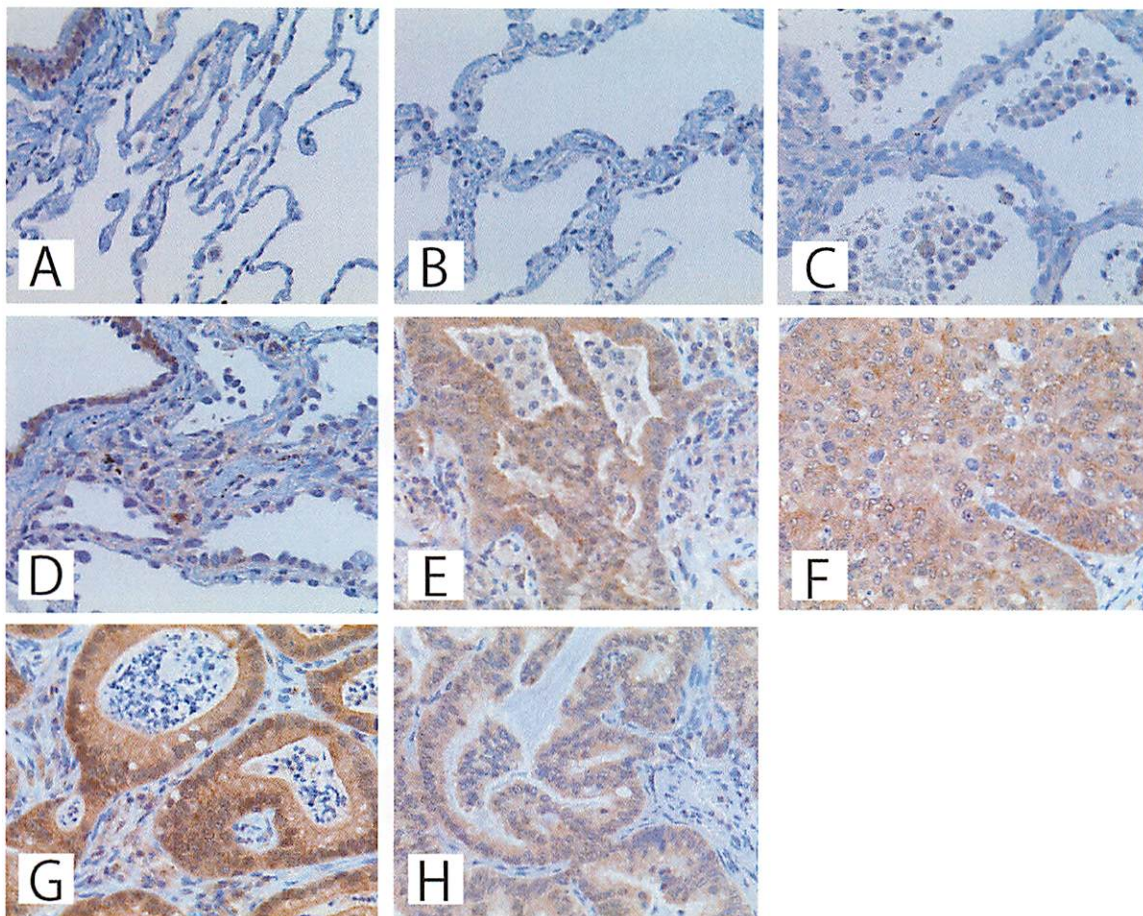
adenomatous hyperplasia:AAH)との比較



AAH(A, B)と器質化肺炎周囲の反応性2型肺胞上皮(C, D)の比較(すべてx200)。

いずれも軽度の核異型とN/C比の増加が認められた。PP2Acはいずれも胞体内に陽性であった。

図14 小型肺腺癌に対するIGBP1の免疫染色



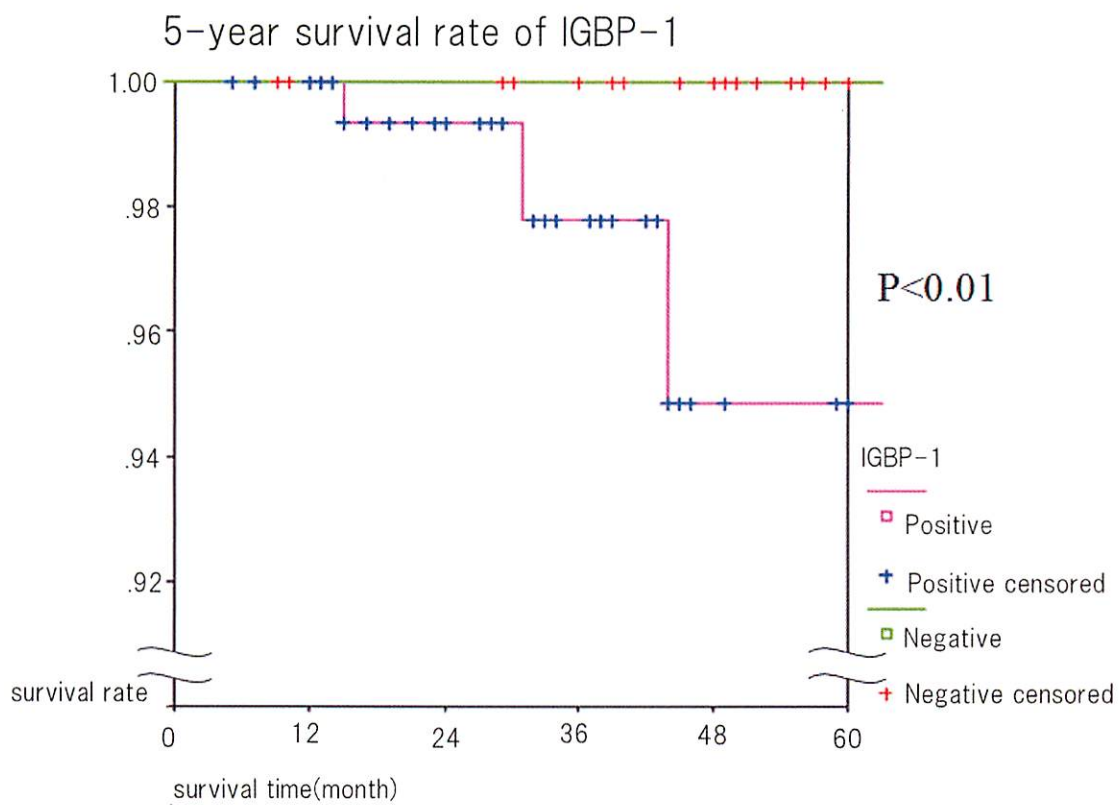
パラフィン標本におけるIGBP1の免疫染色の結果(全てx400)。

正常肺では、気管支上皮にのみ陽性を示し、正常肺胞上皮には陰性を示した(A)。

異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia:AAH)(B)、野口分類TypeA腺癌(C)およびTypeB腺癌(D)は陰性であった。

TypeC(E)、TypeD(F)、TypeE(G)、TypeF(H)においては陽性を示した。

図15 IGBP1陽性例と陰性例との生存曲線における比較検討

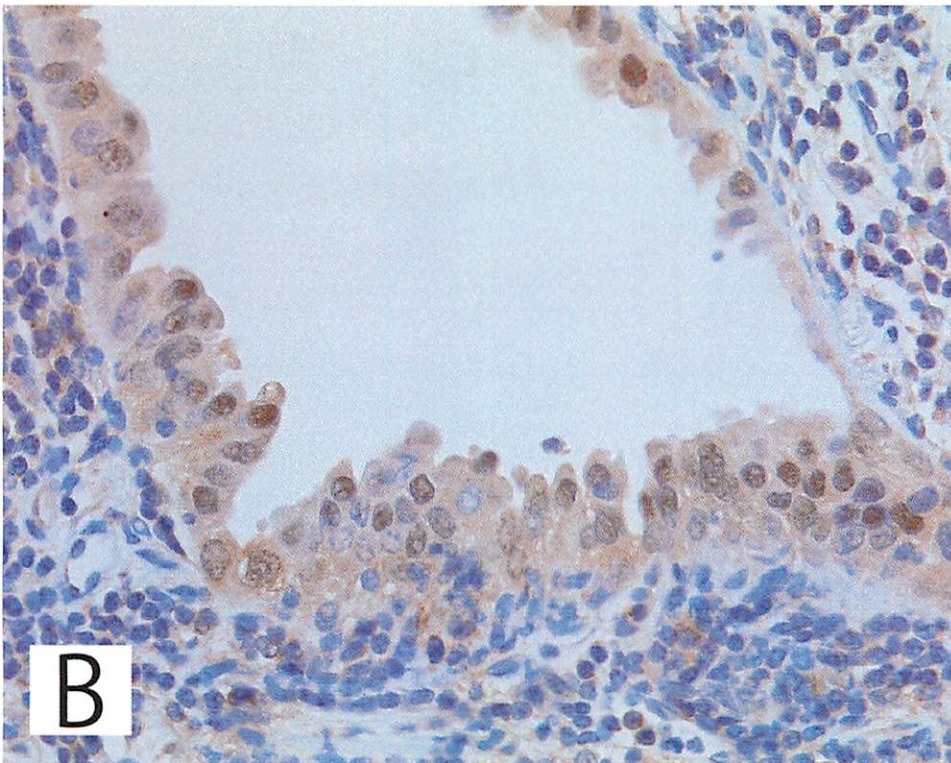
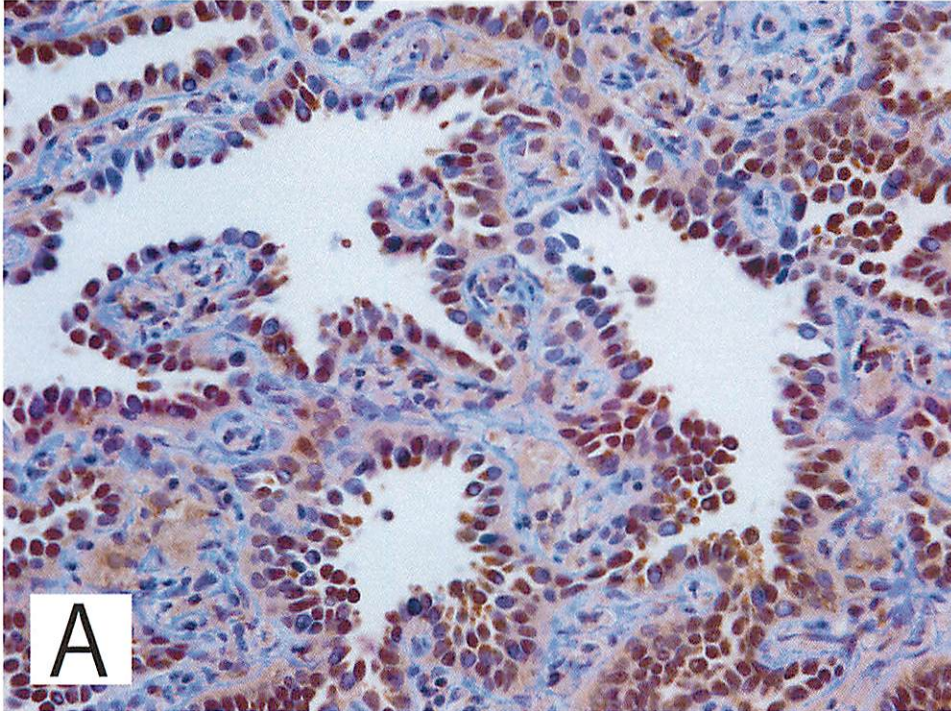


IGBP1陽性例とIGBP1陰性例の生存率を Kaplan-Meier 曲線を比較した。IGBP1陽性症例は陰性症例と比較して有意に ($p < 0.01$) 予後が悪かった。

(統計手法は log-rank 検定を用いた。統計ソフトは SPSS を用いた。)

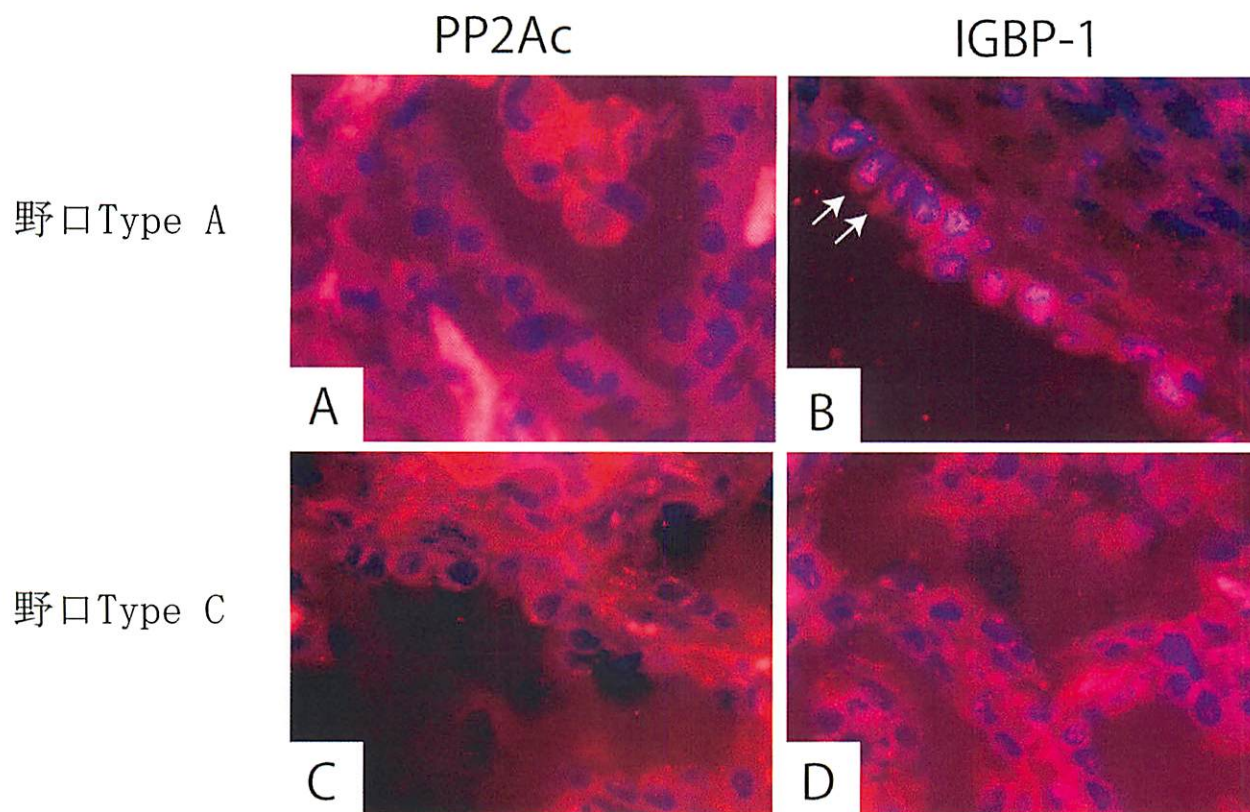
図16 IGBP1が核に強い陽性像を呈する

野口Type A, 野口type B腺癌



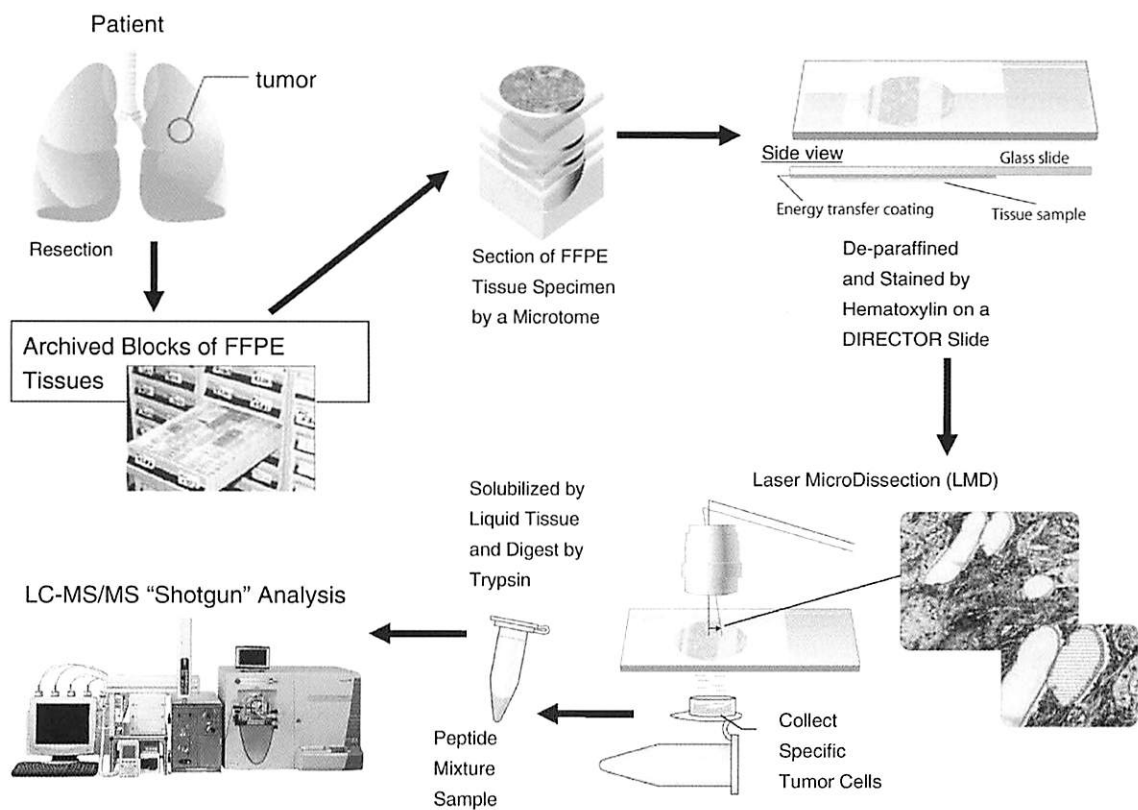
パラフィン切片に対するIGBP1の免疫染色。野口分類TypeA(A)およびTypeB(B)腺癌においては、核に強く染色される像が高頻度に認められた(typeA:42.9%、typeB:81.3%)。それに対し、TypeC-Fの腫瘍では、核の染色像と細胞質の染色強度はほぼ同様であった。

図17 PP2AcとIGBP1の染色部位に対する蛍光免疫染色を用いた検討



野口分類Type AおよびType C腺癌に対するPP2AcとIGBP1の免疫染色の比較(全てx1000)。
PP2AcはType A、Type Cともに細胞質内にのみ陽性を示し、核には陰性を示した。
IGBP1はType A、Type Cともに細胞質内に陽性を示したが、Type C腫瘍と比較してType A腫瘍の方が核に対する陽性像が強く認められた。

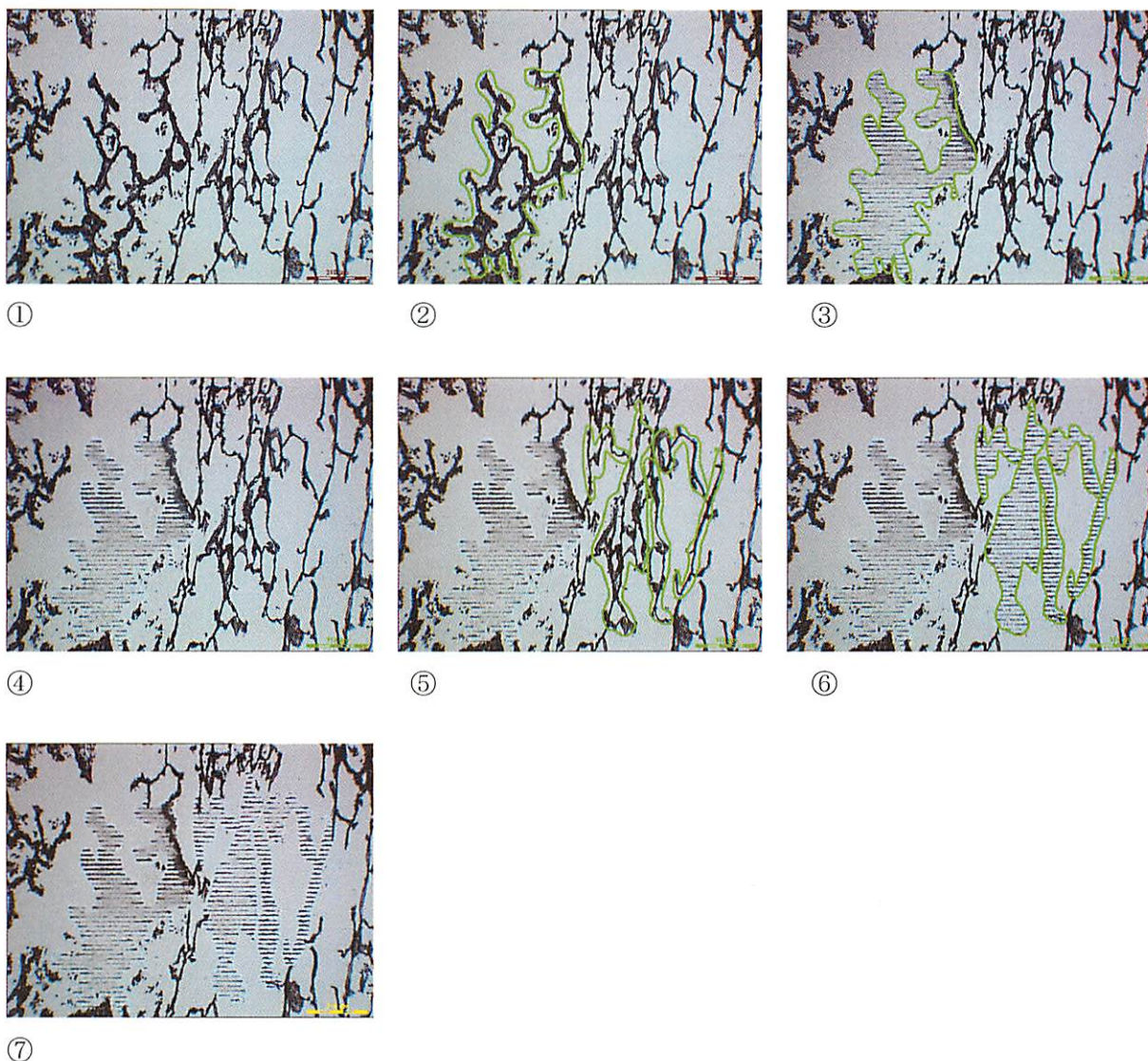
図18 プロテオームの流れ



検体は、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いる。
 LaserMicroDissection法によって病変部を削り取り、トリプシン処理を行った
 後にLc-MS/MSのショットガン法によって、タンパク質が同定される。

(文献 42)

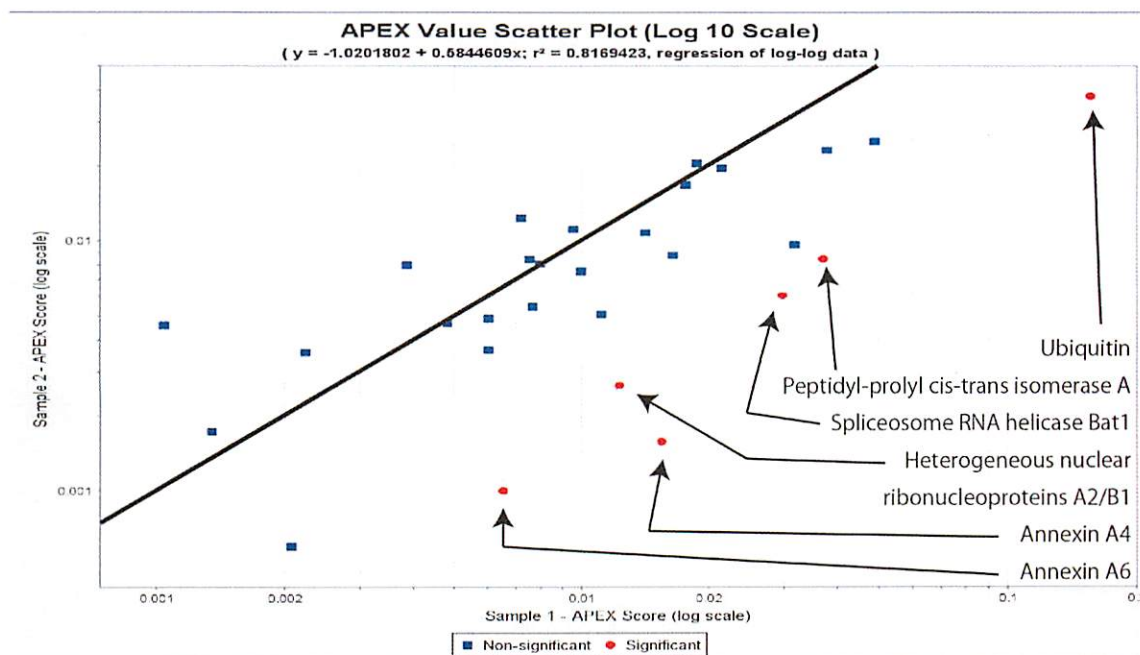
図19 マイクロダイセクション法(LMD6000)による検体採取法



- ①：スライドはヘマトキシリン染色のみで染色されており、図のように観察される。
- ②：AAH部分を囲む。
- ③：囲った部分だけにレーザーが当たり、検体を採取する事ができる。
- ④：レーザー照射後には図のようになる。
- ⑤：AAH部分の検体を採取した後、正常部分も同様に囲い
- ⑥：同様にレーザーを当てて検体を採取する。
- ⑦：最終的には、図のような形となる。

図20-1 APEXの結果 症例1

異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia:AAH) 対
正常肺胞上皮



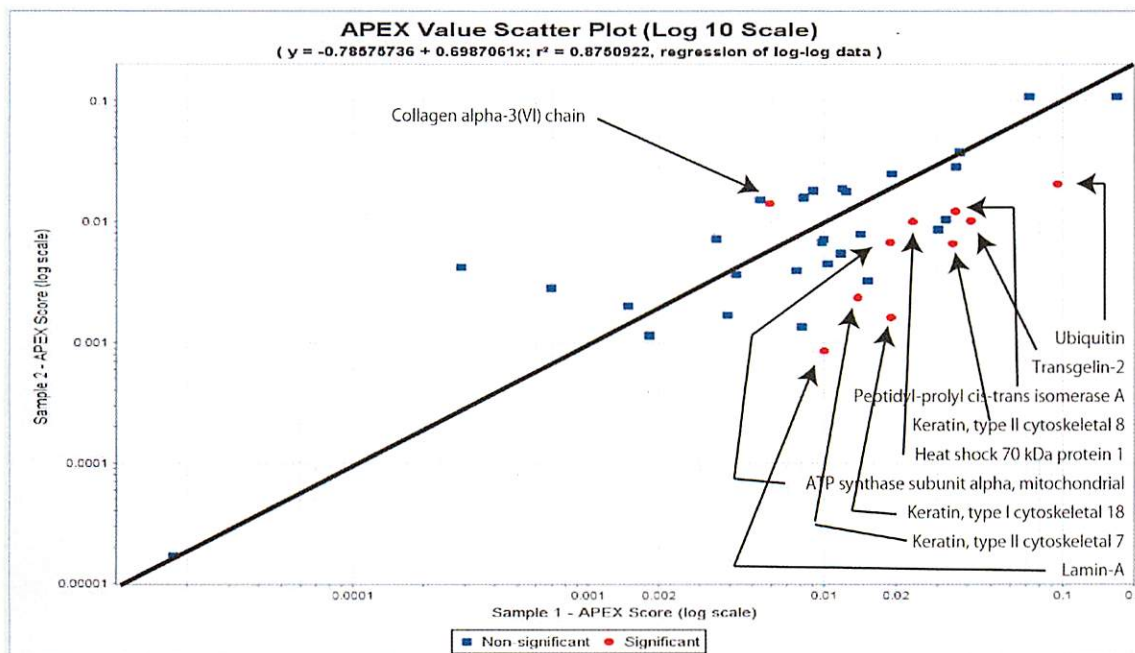
※ Sample1:AAH, Sample2:Normal

有意差が認められたタンパク質

	p-value.
Annexin A4	0.00752
Ubiquitin	0.009916
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0.017557
Spliceosome RNA helicase Bat1	0.030616
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	0.030616
Annexin A6	0.050334

図20-2 APEXの結果 症例2

異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia: AAH) 対
正常肺胞上皮



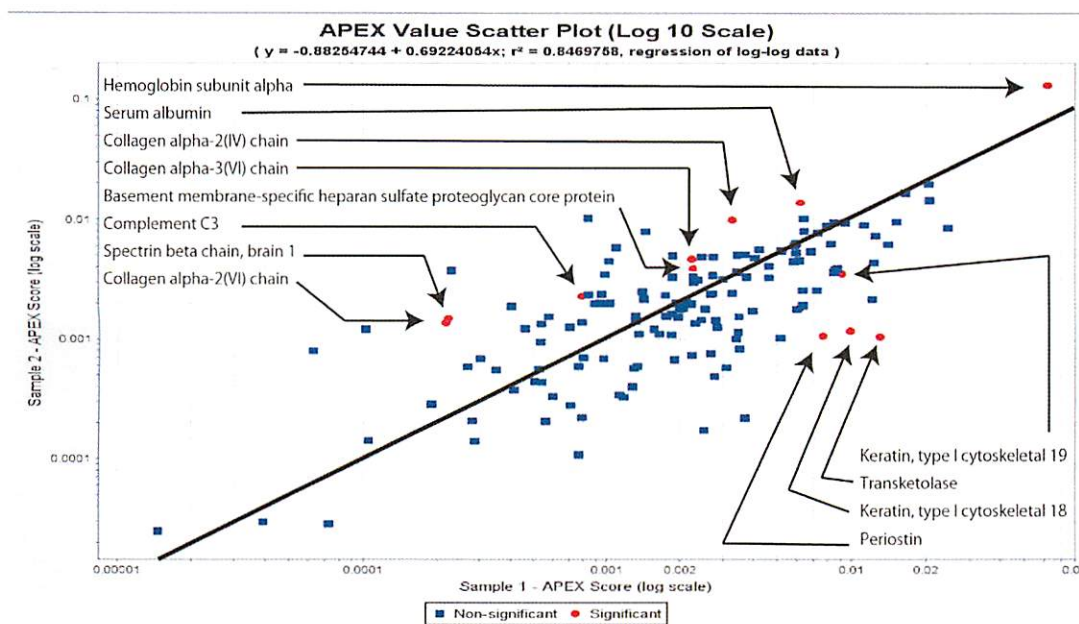
※ Sample1:AAH, Sample2:Normal

有意差が認められたタンパク質

	p-value.
Keratin, type II cytoskeletal 8	6.55E-07
Lamin-A	0.00169
Keratin, type I cytoskeletal 18	0.00169
Transgelin-2	0.005438
Heat shock 70 kDa protein 1	0.007379
Collagen alpha-3(VI) chain	0.025239
Ubiquitin	0.026805
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	0.036264
Keratin, type II cytoskeletal 7	0.047762
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0.04996

図20-3 APEXの結果 症例3

異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia AAH) 対
正常肺胞上皮



※ Sample1:AAH, Sample2:Normal

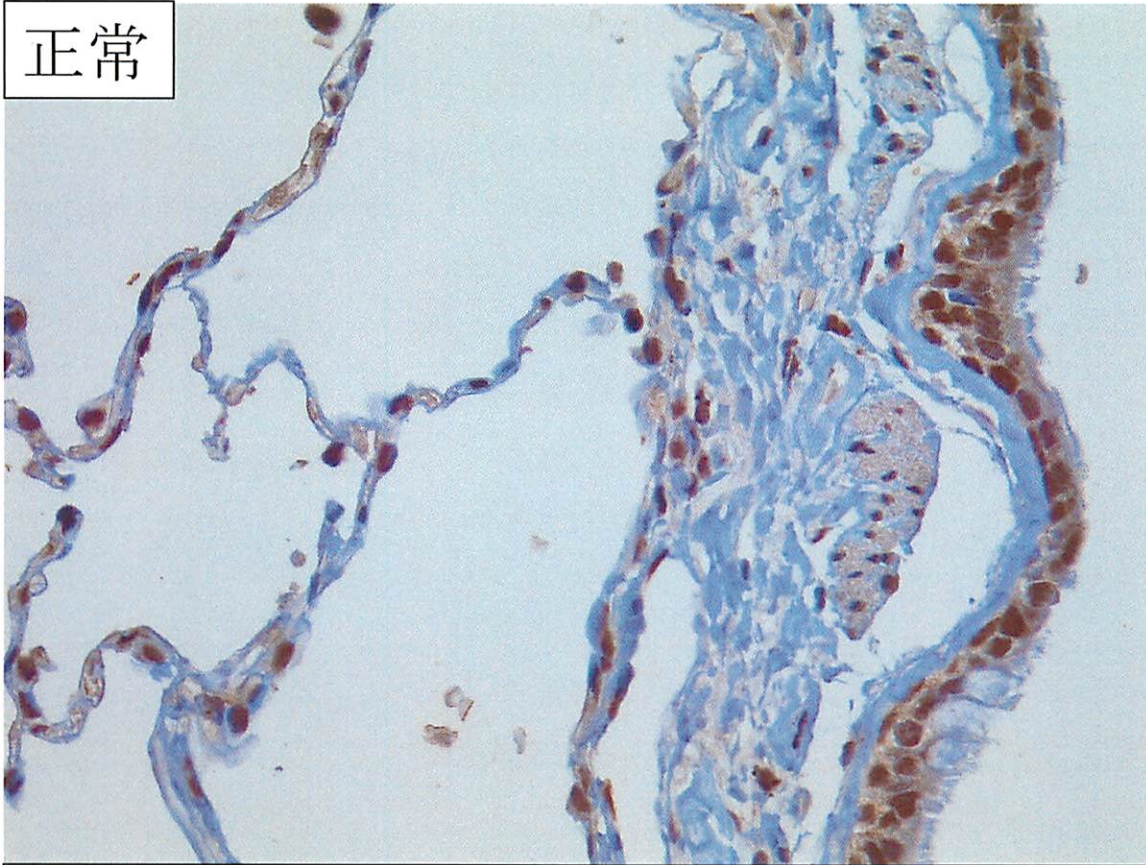
有意差が認められたタンパク質

	p-value.
Serum albumin	2.39E-04
Periostin	2.77E-04
Keratin, type I cytoskeletal 18	8.15E-04
Collagen alpha-3(VI) chain	0.001581
Transketolase	0.0023
Spectrin beta chain, brain 1	0.002834
Hemoglobin subunit alpha	0.004333
Collagen alpha-2(VI) chain	0.004666
Keratin, type I cytoskeletal 19	0.011303
Complement C3	0.04434
Collagen alpha-2(IV) chain	0.04523
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0.048353
参考所見(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A)	0.07608

図21 正常および異型腺腫様過形成 (AAH) に対する

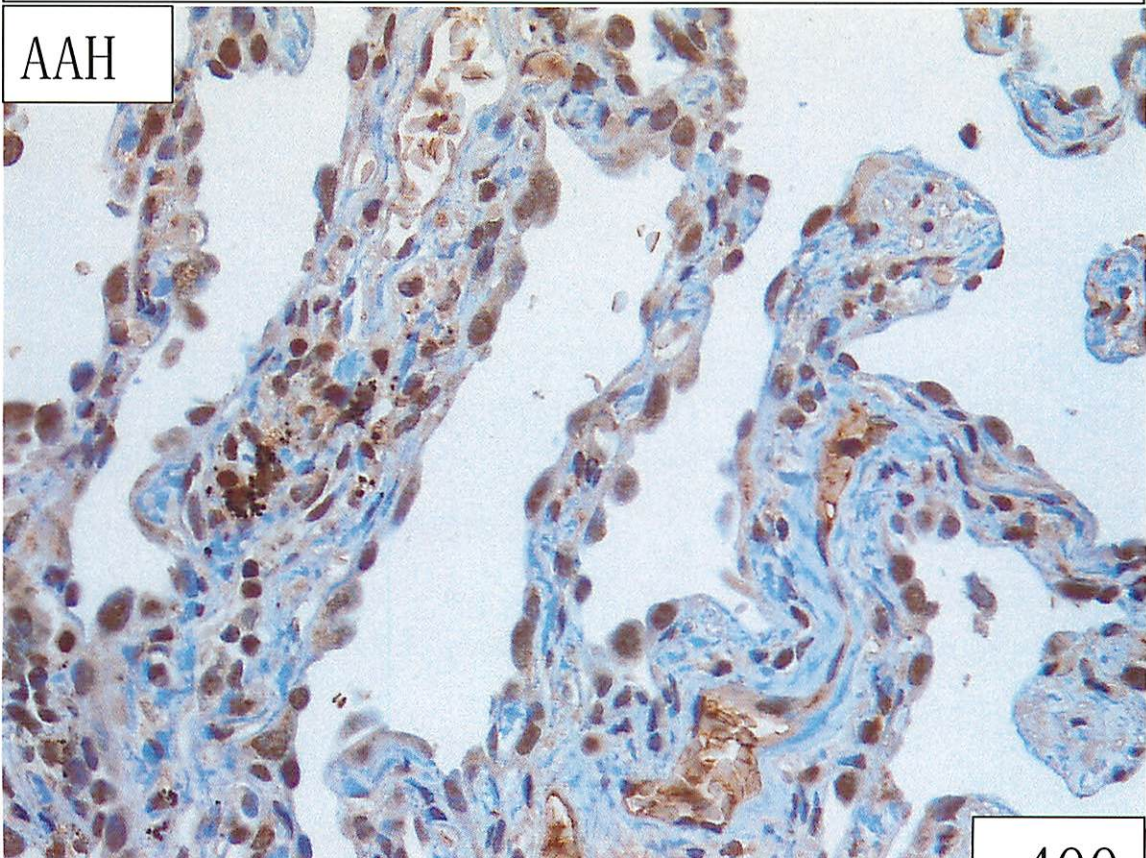
Cyclophilin Aの免疫染色

正常



正常肺の2型肺胞上皮・気管支上皮の胞体・核、全てに陽性像を示す x400

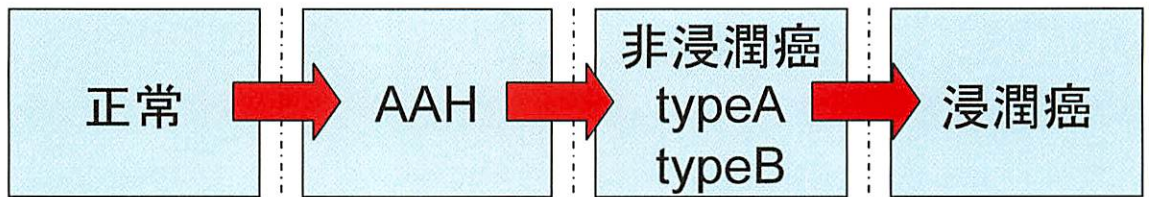
AAH



AAHの胞体・核、全てに陽性像を示す。

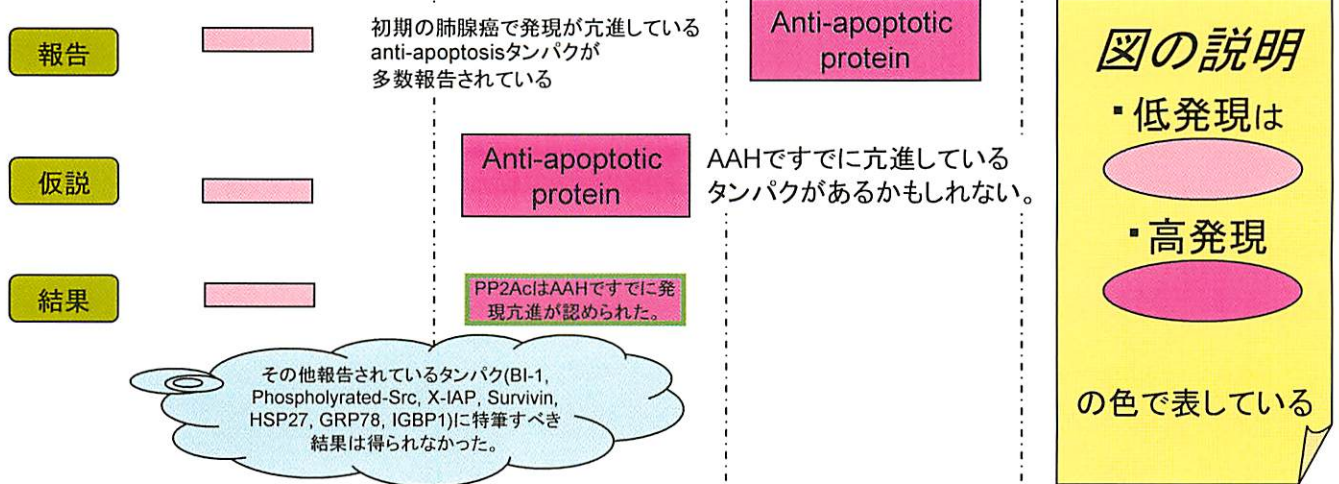
x400

図22 総括



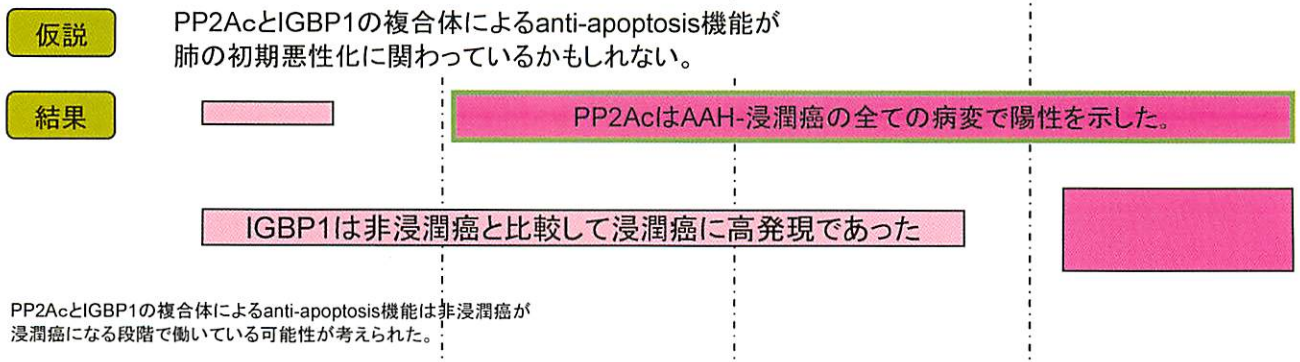
第1章

多発AAHにおけるanti-apoptosisタンパクに対する免疫組織学的検討



第2章

小型肺腺癌におけるPP2Ac・IGBP1の発現および臨床組織学的検討



第3章

多発AAHに対するプロテオーム解析

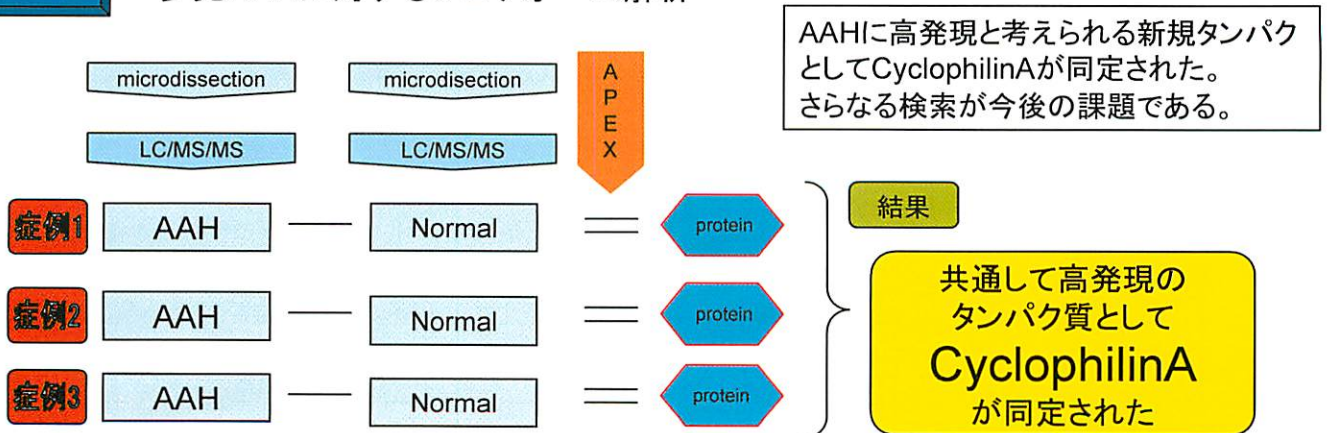


表1 末梢小型肺腺癌の組織分類

1-1 組織学的分類

Description	
肺胞上皮置換性に増殖する腺癌	
A	Localized bronchioloalveolar carcinoma(LBAC) 腫瘍内に線維化巣を認めない
B	LBAC with foci of collapse of alveolar structure 腫瘍内に肺胞虚脱型の線維化巣を認める
C	LBAC with foci of active fibroblastic proliferation 腫瘍内に線維芽細胞の増生を認める
肺胞上皮非置換性に増殖する腺癌	
D	Poorly differentiated adenocarcinoma 充実破壊性に増殖する低分化腺癌
E	Tubular adenocarcinoma 管状腺癌
F	Papillary adenocarcinoma with compressive and destructive growth 肺胞上皮非置換性に増殖する真の乳頭状腺癌

1-2 野口分類による予後曲線

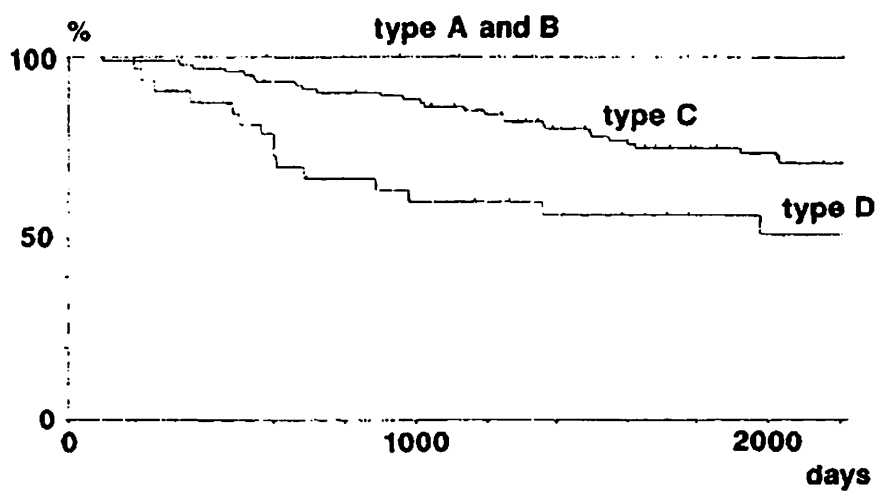
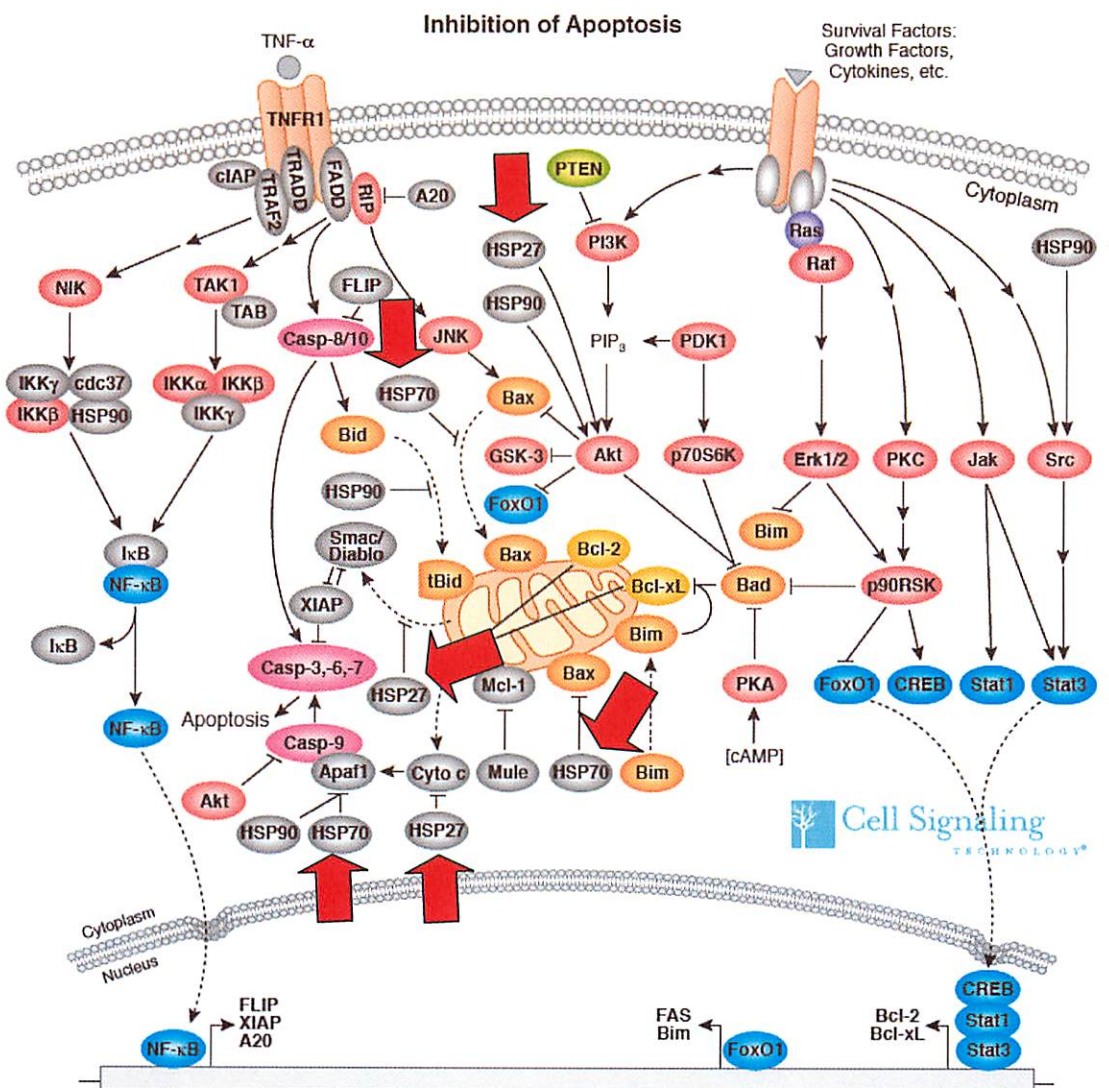


表2 多発異型腺腫様過形成に対する免疫染色にて検索したタンパク質の種類と機能

タンパク名	メカニズム	Ref.
Bax-Inhibitor(BI-1)	Baxに対する抑制	19
Phosphorylated-Src(P-src)	STAT3を活性化させる	24
X-linked inhibitor of apoptosis protein (X-IAP)	caspase3. 8. 9を直接blockする	20
Survivin	caspase3. 7を直接blockする	21. 22
Heat shock protein B1(HSPB1)	下図参照	23
Heat shock protein 70(GRP78)	下図参照	23
Phosphorylated proteinA, catalytic subunit (PP2Ac)	IGBP1と複合体をすることにより、anti-apoptosis機能を獲得する	25
Immunoglobulin binding protein 1(IGBP1)	PP2Acと複合体をすることにより、anti-apoptosis機能を獲得する	25



参照 <http://www.cstj.co.jp/pathways/apoptosis-signaling.php>

表3 抗体の賦活化条件、一次抗体濃度、二次抗体の種類

	メーカー名	希釈濃度	前処理	一次抗体の反応時間
Bax inhibitor 1	Santa Cruz	1:10	TE-buffer	6-8 時間
Phosphorylated-src	Cell signaling	1:50	クエン酸 buffer	30 分
X-IAP	abcam	1:500	クエン酸 buffer	30 分
Survivin	Novus Biologicals	1:1000	クエン酸 buffer	30 分
HSP27	SIGMA	1:50	クエン酸 buffer	30 分
GRP78	Santa Cruz	1:200	なし	30 分
PP2Ac	Santa Cruz	1:100	TE-buffer	30 分
IGBP1	SIGMA	1:250	クエン酸 buffer	30 分
CyclophilinA	abcam	1:300	クエン酸 buffer	30 分

二次抗体の種類

Bax inhibitor 1	Envision++ Dual Link System(Dako)
Phosphorylated-src	Envision++ Dual Link System(Dako)
X-IAP	Envision++ Dual Link System(Dako)
Survivin	Envision++ Dual Link System(Dako)
HSP27	Envision++ Dual Link System(Dako)
GRP78	ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(G)(ニチレイ)
PP2Ac	Envision++ Dual Link System(Dako)
IGBP1	Envision++ Dual Link System(Dako)
CyclophilinA	Envision++ Dual Link System(Dako)

表4 小型肺腺癌に対するIGBP1の免疫組織学的検索結果と臨床病理学的特徴の比較

Clinicopathological feature	All patient	IGBP-1 expression		p-value
		Negative	positive	
All patients	96	31	65	
Mean age (years)	65.3	60.9	67.4	
Sex				
male	48	10	38	0.028*
female	48	21	27	
Lymphatic permeation				
Negative	82	31	51	0.004*
Positive	14	0	14	
Vascular invasion				
Negative	79	31	48	0.001*
Positive	17	0	17	
Pathological stage				
Stage I	90	31	59	0.172
Stage II	4	0	4	
Stage III	2	0	2	
Stage IV	0	0	0	
Noguchi classification				
typeA	14	13	1 7.14%	<0.001*
typeB	16	9	7 43.80%	
typeC	46	9	37 80.43%	
typeD	13	0	13 100%	
typeE	3	0	3 100%	
typeF	4	0	4 100%	
Lymph node status				
N0/Nx	90	31	59	0.172
N1 and N2	6	0	6	
Pleural invasion factor				
pI0	81	31	50	0.002*
pI1-3	15	0	15	
Lepidic pattern				
Lepidic pattern (types A-C)	76	31	45	<0.001*
Non-lepidic pattern (types D-F)	20	0	20	

StageIはIAとIBを含み、StageIIはIIAとIIBを含み、StageIIIはIIIAとIIIBを含む。IGBP1の陽性率と、性別、リンパ管侵襲、血管浸潤、病理学的stage、野口分類、リンパ節転移、胸膜浸潤、肺胞上皮置換性成分の有無に有意差が認められた。

(検定はFisher's exact testで行った。統計ソフトはSPSSを用いた。)

表5 症例1-3の異型腺腫様過形成および正常肺胞で認められたタンパク質

※ name : Mascot accession name(タンパク名の登録名)

※ 表内の数字は“同定されたペプチド数”を表す。2個以上ペプチドが同定されればタンパク質が同定されたと見なされる。同一のタンパク質においての同定されたペプチド数の差は、結果的に量的な差を反映するものであるが、有意差の同定にはAPEX softwareなどを用いた半定量的解析が必要である。

name	症例 1 AAH	症例 2 AAH	症例 3 AAH	症例 1 正常	症例 2 正常	症例 3 正常
VIME_HUMAN	9	14	41	20	24	28
ALBU_HUMAN	7	5	10	22	24	32
ACTB_HUMAN	6	9	29	11	15	27
HBB_HUMAN	6	8	21	35	21	53
K1C19_HUMAN	6	6	20	5	3	8
H4_HUMAN	5	16	11	11	15	12
CO6A3_HUMAN	5	9	17	27	45	35
TBA1A_HUMAN	5	6			7	6
K2C8_HUMAN	4	11	32	6	3	8
TBB2C_HUMAN	4	6	12	6	8	14
HSP7C_HUMAN	4	5	13		4	9
PPIA_HUMAN	4	4	8	3	4	
ANXA5_HUMAN	4	3	10	12	9	12
HBA_HUMAN	3	7	10	14	10	21
K1C18_HUMAN	3	6	8	3		2
ENOA_HUMAN	3	3	8	6	5	4
UBIQ_HUMAN	3	2	3	4	2	4
SAMP_HUMAN	3	2		6	4	5
UAP56_HUMAN	3	2		2		
ANXA4_HUMAN	3		12			3
ANXA6_HUMAN	3		3	2	2	3
CO1A1_HUMAN	2	5	12	8	7	11
CO6A1_HUMAN	2	5	10	7	7	15
ATPA_HUMAN	2	5	2	5	4	4
HS90A_HUMAN	2	3	6	2	3	2
TRAP1_HUMAN	2	3		2	3	
H2A1A_HUMAN	2	3				3
ARF5_HUMAN	2	2				
CO6A2_HUMAN	2		4	7	7	17
TPM2_HUMAN	2		3	6	7	2
TBB2A_HUMAN	2			7		
IF4A1_HUMAN	2			3		
PRDX1_HUMAN	2					
K2C7_HUMAN		6	18	5	3	7
LMNA_HUMAN		5	28			16
TBB5_HUMAN		5	11		11	19
TAGL2_HUMAN		5	8	2	2	7
HSP71_HUMAN		5			4	
HS71L_HUMAN		4	6			5
ANXA2_HUMAN		3	10	5	9	14
GSTP1_HUMAN		3	8	3	3	4
ROA2_HUMAN		3	7	2	4	5
CO1A2_HUMAN		3	5	7	7	4
FABPE_HUMAN		3			2	

CENPA_HUMAN		2	2			
MYH9_HUMAN			28	2		25
ACTC_HUMAN			26			18
ATPB_HUMAN			15	6	5	10
H2B1B_HUMAN			14	6	7	11
POSTN_HUMAN			11	3		3
TBA1B_HUMAN			10	6		
MOES_HUMAN			10			11
FLNA_HUMAN			9	7	2	15
VINC_HUMAN			9			11
TKT_HUMAN			9			
TBA1C_HUMAN			9			
FINC_HUMAN			8	3	3	9
PGBM_HUMAN			8	2	4	19
ANXA1_HUMAN			8		2	6
PLEC1_HUMAN			8			7
KPYM_HUMAN			8			6
ACTN4_HUMAN			7			11
1433Z_HUMAN			7			7
ELN_HUMAN			7			7
TRY3_HUMAN			7			7
GRP78_HUMAN			7			4
FBN1_HUMAN			7			4
PDIA3_HUMAN			7			2
EZRI_HUMAN			6	3		
EF1A1_HUMAN			6			9
MLRM_HUMAN			6			3
DESM_HUMAN			6			3
TPIS_HUMAN			5	4		5
1433B_HUMAN			5	3		7
MYH10_HUMAN			5			5
DHB4_HUMAN			5			4
TPM3_HUMAN			5			2
HSPB1_HUMAN			5			
1433G_HUMAN			5			
H2A1B_HUMAN			4	2	5	
DEF1_HUMAN			4		3	3
HNRPK_HUMAN			4		2	3
FIBA_HUMAN			4			6
DPYL2_HUMAN			4			5
ROA1_HUMAN			4			4
TRY1_HUMAN			4			3
CATA_HUMAN			4			2
CH60_HUMAN			4			
PGK1_HUMAN			4			
IDHP_HUMAN			4			
LUM_HUMAN			3	6	5	7
MYL6_HUMAN			3	2		6
MYH14_HUMAN			3	2		5
ALDH2_HUMAN			3	2		
LAMC1_HUMAN			3		3	9
PROF1_HUMAN			3		3	
SPTA2_HUMAN			3			8
IQGA1_HUMAN			3			3
UBE1_HUMAN			3			3
SBP1_HUMAN			3			
LDHB_HUMAN			3			
MFAP4_HUMAN			3			
RSSA_HUMAN			3			
LDHA_HUMAN			3			
CALX_HUMAN			3			

NAPSA_HUMAN			3			
CAPG_HUMAN			3			
GRP75_HUMAN			3			
H1T_HUMAN			3			
IDHC_HUMAN			3			
KRT85_HUMAN			3			
PTRF_HUMAN			2	7	6	6
G3P_HUMAN			2	3	5	3
LAMA5_HUMAN			2	3	4	4
NIBL_HUMAN			2	2		
LAMB2_HUMAN			2		2	9
CO3_HUMAN			2			8
PDIA6_HUMAN			2			5
FIBG_HUMAN			2			4
HS90B_HUMAN			2			3
PHB2_HUMAN			2			3
KAC_HUMAN			2			3
SFPQ_HUMAN			2			2
HNRPU_HUMAN			2			2
TAGL_HUMAN			2			2
ANXA3_HUMAN			2			2
THIO_HUMAN			2			2
KV302_HUMAN			2			2
RS14_HUMAN			2			2
6PGD_HUMAN			2			2
1C04_HUMAN			2			2
LMNB2_HUMAN			2			
PSPB_HUMAN			2			
S10AB_HUMAN			2			
PRDX5_HUMAN			2			
TERA_HUMAN			2			
CLH1_HUMAN			2			
PLSL_HUMAN			2			
NPM_HUMAN			2			
MVP_HUMAN			2			
PPIB_HUMAN			2			
ANX11_HUMAN			2			
SC22B_HUMAN			2			
HNRPM_HUMAN			2			
RLA1_HUMAN			2			
RAB7A_HUMAN			2			
RL13_HUMAN			2			
PDIA1_HUMAN			2			
ALDOC_HUMAN			2			
HNRPD_HUMAN			2			
APEX1_HUMAN			2			
ECHA_HUMAN			2			
CAN2_HUMAN			2			
AGR2_HUMAN			2			
EF1D_HUMAN			2			
K2C1_HUMAN			2			
S10A4_HUMAN			2			
SQRD_HUMAN			2			
SFRS2_HUMAN			2			
IDH3A_HUMAN			2			
CO3A1_HUMAN			2			
PR285_HUMAN			2			
HBD_HUMAN				16	11	27
SFTA1_HUMAN				8		3
ACTA_HUMAN				8		
AOC3_HUMAN				4	4	7

BLVRB_HUMAN				4	3	
ARF1_HUMAN				3	3	
PRELP_HUMAN				3	3	
ACTN1_HUMAN				3	2	
TLN1_HUMAN				3		4
CLUS_HUMAN				3		2
PEBP1_HUMAN				3		
RS3_HUMAN				3		
PGS1_HUMAN				2	3	2
2DRA_HUMAN				2	2	
TIMP3_HUMAN				2	2	
1A01_HUMAN				2	2	
NID1_HUMAN				2	2	
AMBP_HUMAN				2		6
SPTB2_HUMAN				2		6
TRFE_HUMAN				2		4
CO4A2_HUMAN				2		
APOA1_HUMAN				2		
VTNC_HUMAN					4	
EHD2_HUMAN					3	3
ENOG_HUMAN					3	
PRDX3_HUMAN					2	
SFRS3_HUMAN					2	
AMPL_HUMAN					2	
RADI_HUMAN						7
1433T_HUMAN						5
TPM4_HUMAN						5
1433E_HUMAN						5
H12_HUMAN						5
RAGE_HUMAN						5
IGHG1_HUMAN						4
HSP77_HUMAN						4
HPT_HUMAN						4
MYH11_HUMAN						3
ALDOA_HUMAN						3
GELS_HUMAN						3
PRDX6_HUMAN						3
1A02_HUMAN						3
SDPR_HUMAN						3
MYO1C_HUMAN						3
FIBB_HUMAN						3
STOM_HUMAN						3
TGM2_HUMAN						2
PRDX2_HUMAN						2
HNRH1_HUMAN						2
THIL_HUMAN						2
H10_HUMAN						2
CP250_HUMAN						2
CAC1S_HUMAN						2
GNAI2_HUMAN						2
RL8_HUMAN						2
ODO2_HUMAN						2
LU_HUMAN						2
PDLI2_HUMAN						2
1B07_HUMAN						2
CAH1_HUMAN						2
HRG_HUMAN						2
PERM_HUMAN						2
COR1A_HUMAN						2
EMIL1_HUMAN						2
KCMA1_HUMAN						2

KLC4_HUMAN						2
H15_HUMAN						2
TRRAP_HUMAN						2
BAZ2B_HUMAN						2

参考文献

- 1 Travis WD, Muller-Hermelink KH, Harris CC. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*: Lyon: IARC Press 2004.
- 2 Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. *Cancer*. 1995; 75: 191-202.
- 3 Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer*. 1996; 77: 2464-70.
- 4 Valaitis J, Warren S, Gamble D. Increasing incidence of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 1981; 47: 1042-6.
- 5 Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, *et al*. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1995; 75: 2844-52.
- 6 Miller RR, Nelems B, Evans KG, Muller NL, Ostrow DN. Glandular neoplasia of the lung. A proposed analogy to colonic tumors. *Cancer*. 1988; 61: 1009-14.
- 7 Nakayama H, Noguchi M, Tsuchiya R, Kodama T, Shimosato Y. Clonal growth of atypical adenomatous hyperplasia of the lung: cytofluorometric analysis of nuclear DNA content. *Mod Pathol*. 1990; 3: 314-20.
- 8 Kerr KM, Carey FA, King G, Lamb D. Atypical alveolar hyperplasia: relationship with pulmonary adenocarcinoma, p53, and c-erbB-2 expression. *J pathol*.

1994; 174: 249-56.

9 Westra WH, Baas IO, Hruban RH, *et al.* K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res.* 1996; 56: 2224-8.

10 Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997; 111: 1710-7.

11 Hsu LH, Chu NM, Liu CC, *et al.* Sex-associated differences in non-small cell lung cancer in the new era: is gender an independent prognostic factor? *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2009; 66: 262-7.

12 Mountain CF. New prognostic factors in lung cancer. Biologic prophets of cancer cell aggression. *Chest.* 1995; 108: 246-54.

13 Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, *et al.* p53 gene mutation and protein expression in operable non-small cell lung cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev.* 2000; 9: 81-7.

14 Zhan P, Wang J, Lv XJ, *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 1094-103.

15 Kanteti R, Yala S, Ferguson MK, Salgia R. MET, HGF, EGFR, and PXN gene copy number in lung cancer using DNA extracts from FFPE archival samples and prognostic

significance. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2009; 28: 89-98.

16 Anami Y, Iijima T, Suzuki K, *et al.* Bronchioloalveolar carcinoma (lepidic growth) component is a more useful prognostic factor than lymph node metastasis. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 951-8.

17 Ishii A, Suzuki M, Satomi K, *et al.* Increased cytoplasmic S100A6 expression is associated with pulmonary adenocarcinoma progression. *Pathology Int.* 2009; 59: 623-30.

18 Uchihara T, Okubo C, Tanaka R, *et al.* Neuronatin expression and its clinicopathological significance in pulmonary non-small cell carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2007; 2: 796-801.

19 Tanaka R, Ishiyama T, Uchihara T, *et al.* Expression of the Bax inhibitor-1 gene in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer.* 2006; 106: 648-53.

20 Wu M, Orta L, Gil J, Li G, Hu A, Burstein DE. Immunohistochemical detection of XIAP and p63 in adenomatous hyperplasia, atypical adenomatous hyperplasia, bronchioloalveolar carcinoma and well-differentiated adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2008; 21: 553-8.

21 Akyurek N, Memis L, Ekinici O, Kokturk N, Ozturk C. Survivin expression in pre-invasive lesions and non-small cell lung carcinoma. *Virchows Arch.* 2006; 449:

164-70.

22 Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E. Survivin expression in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Amj. clin pathol.* 2003; 120: 712-9.

23 Malusecka E, Krzyzowska-Gruca S, Gawrychowski J, Fiszler-Kierzkowska A, Kolosza Z, Krawczyk Z. Stress proteins HSP27 and HSP70i predict survival in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Research.* 2008; 28: 501-6.

24 Sakuma Y, Takeuchi T, Nakamura Y, *et al.* Lung adenocarcinoma cells floating in lymphatic vessels resist anoikis by expressing phosphorylated Src. *The Journal of pathology.* 2010; 220: 574-85.

25 Kong M, Fox CJ, Mu J, *et al.* The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis. *Science (New York), NY.* 2004; 306: 695-8.

26 Inui S, Kuwahara K, Mizutani J, *et al.* Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptor-mediated signal transduction. *J Immunol.* 1995; 154: 2714-23.

27 Chuang E, Fisher TS, Morgan RW, *et al.* The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity.* 2000; 13: 313-22.

28 Everett AD, Brautigan DL. Developmental expression of alpha4 protein

phosphatase regulatory subunit in tissues affected by Opitz syndrome. *Dev Dyn.* 2002;

224: 461-4.

29 Murata K, Wu J, Brautigan DL. B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997; **94**: 10624-9.

30 Chen J, Peterson RT, Schreiber SL. Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *BBRC.* 1998; **247**: 827-32.

31 Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W, Muszynska G. Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta biochimica Polonica.* 2001; **48**: 921-33.

32 Sontag E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cellular signalling.* 2001; **13**: 7-16.

33 Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochemical pharmacology.* 2000; **60**: 1225-35.

34 Mumby MC, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiological reviews.* 1993; **73**: 673-99.

35 Wera S, Hemmings BA. Serine/threonine protein phosphatases. *The Biochemical Journal.* 1995; **311** (Pt 1): 17-29.

36 Ruediger R, Roeckel D, Fait J, Bergqvist A, Magnusson G, Walter G.

Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A

for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Molecular and Cellular Biology*. 1992; 12: 4872-82.

37 Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical Journal*. 2001; 353: 417-39.

38 Turowski P, Favre B, Campbell KS, Lamb NJ, Hemmings BA. Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit PR65alpha. *FEBS*. 1997; 248: 200-8.

39 Inui S, Sanjo H, Maeda K, Yamamoto H, Miyamoto E, Sakaguchi N. Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Blood*. 1998; 92: 539-46.

40 Xue C, Heller F, Johns RA, Everett AD. Developmental expression and localization of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A in rat lung. *Dev Dyn*. 1998; 211: 1-10.

41 Prieto DA, Hood BL, Darfler MM, *et al*. Liquid Tissue: proteomic profiling of formalin-fixed tissues. *BioTechniques*. 2005; Suppl: 32-5.

42 Kawamura T, Nomura M, Tojo H, *et al*. Proteomic analysis of laser-

microdissected paraffin-embedded tissues: (1) Stage-related protein candidates upon non-metastatic lung adenocarcinoma. *Journal of proteomics*. 2010; 73: 1089-99.

43 Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, *et al.* Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4: 1487-502.

44 Vogel C, Kirttil T, Oellig F, Stolte M. Lymph node preparation in resected colorectal carcinoma specimens employing the acetone clearing method. *Pathology, res. and prac.* 2008; 204: 11-5.

45 Howard BA, Furumai R, Campa MJ, *et al.* Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo. *Cancer research*. 2005; 65: 8853-60.

46 Lee J. Role of cyclophilin a during oncogenesis. *Archives of pharmacal research*. 33: 181-7.

47 Howard BA, Zheng Z, Campa MJ, *et al.* Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2004; 46: 313-23.

48 Campa MJ, Wang MZ, Howard B, Fitzgerald MC, Patz EF, Jr. Protein expression

profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003; 63: 1652-6.