

## 肺癌におけるGST- $\pi$ とメタロチオネインの発現

### Expression of Glutathione S-transferase- $\pi$ (GST- $\pi$ ) and Metallothionein (MT) in Lung Cancer

藤野 了<sup>1</sup>・坂本 晃<sup>2</sup>・福田 実<sup>1</sup>・高谷 洋<sup>1</sup>・福田正明<sup>3</sup>  
早田 宏<sup>4</sup>・井上祐一<sup>5</sup>・木下明敏<sup>6</sup>・岡三喜男<sup>1</sup>・河野 茂<sup>1</sup>

**要旨：**細胞内解毒酵素であるグルタチオンS-トランスフェラーゼ $\pi$ (GST- $\pi$ )やメタロチオネイン(MT)が癌細胞の抗癌剤耐性に関与していることが実験的に示唆されている。本研究では、GST- $\pi$ とMTの発現を手術肺癌97例で免疫組織染色にて分析し、化学療法との関係を検討した。GST- $\pi$ は未治療の非小細胞肺癌56例で86%陽性と小細胞肺癌より有意に発現が高かった( $P < 0.0001$ )。未治療の小細胞肺癌8例すべて陰性、シスプラチンを含む化学療法を行った18例の小細胞肺癌で78%陽性と有意に化学療法により誘導された( $P = 0.0003$ )。MTは未治療の非小細胞肺癌56例で28%陽性、治療の非小細胞肺癌15例で80%陽性と有意に化学療法により誘導された( $P = 0.0005$ )。非小細胞肺癌の腫瘍マーカーとしてGST- $\pi$ は有用であり、小細胞肺癌で治療により有意にGST- $\pi$ が誘導され薬剤耐性に関与し、非小細胞肺癌で治療により有意にMTが誘導され薬剤耐性に関与すると考える。

(肺癌 37(2): 135~141, 1997)

**Key words：** Glutathione s-transferase- $\pi$ , Metallothionein, Lung cancer, Drug resistance, Chemotherapy

#### 緒 言

化学療法薬剤に対する耐性は、肺癌化学療法において重要な問題である。グルタチオンやメタロチオニンによるアルキル化剤、プラチナ製剤の解毒もしくは不活化が、薬剤耐性において重要な役割を担っていることが、耐性肺癌細胞株での検討で明らかになりつつある<sup>1)</sup>。

Glutathione S-transferases(GSTs)ファミ

リーは、細胞の中に豊富に存在するグルタチオンを利用し、生体内で生じた親電性の毒性物質を中和する酵素であり、正常組織に比べて癌組織でしばしば発現が高まっていることが知られている。また、GSTsファミリーの中でもGlutathione S-transferase- $\pi$ (GST- $\pi$ )は肺、胎盤、腎臓、脳、睪丸などに比較的多く発現している。これまでの研究で、GST- $\pi$  mRNAの高発現とGST- $\pi$ の上昇が多剤耐性の非小細胞肺癌細胞株で見られ<sup>2)</sup>、化学療法を行ったヒト小細胞肺癌で有意にGSTの活性が上昇しアルキル剤に耐性になる<sup>3)</sup>。

一方、メタロチオネイン(Metallothionein, MT)は分子量6,000の小さなタンパクで、必須金属の

1. 長崎大学第2内科
2. 長崎市立成人病センター内科
3. 日本赤十字長崎原爆病院内科
4. 公立みつき総合病院内科
5. 健康保険諫早総合病院内科
6. 長崎市立市民病院内科

恒常性の維持などに関与すると考えられている<sup>4)</sup>。そして、MTの濃度が癌細胞中で増加するとその癌細胞は数種の抗癌剤に耐性を示すようになる<sup>5)</sup>。

今回の研究目的は、肺癌組織のGST- $\pi$ とMTの発現を免疫組織染色で検討し、術前化学療法施行例(以後、治療例と略する)と未施行例(以後、未治療例と略する)を比較し、化学療法によるGST- $\pi$ とMTの誘導の有無、さらに薬剤耐性との関連を明らかにすることである。

### 対象と方法

対象は長崎大学医学部第二内科および関連施設での原発性肺癌患者97例で、すべて外科的に切除された症例である。内訳は、扁平上皮癌 34例(治療例6例)、腺癌 36例(治療例9例)、大細胞癌 1例、小細胞癌 26例(治療例18例)である。

また、化学療法の併用薬剤としては、非小細胞肺癌ではMVP(mitomycin C, vindesine, cisplatin)を小細胞肺癌ではPE(cisplatin, etoposide)を各々2コース施行している。

### GST- $\pi$ の免疫組織化学的染色

パラフィン包埋ブロックを5 $\mu$ mに薄切し通常の標準病理手法で脱パラする。0.1%トライトンX-100加磷酸緩衝食塩水(PBS)で5分間洗浄し、内因性ペルオキシダーゼブロックのためメタノール150mlに過酸化水素1.5mlを加えたものに30分間浸す。PBSで20分間洗浄し、10%正常ヤギ血清に20分間反応させる。一次抗体として300倍希釈のウサギポリクロナール抗ヒトGST- $\pi$ 抗体(Dako社)を加え<sup>6)</sup>、4℃の湿室に12時間放置する。蒸留水で洗い、PBSにて10分間2回洗浄する。二次抗体としてビオチン標識された抗ウサギIgGヤギ血清を加え、室温にて60分間放置する。その後、PBSにて10分間2回洗浄し、streptavidin-biotin標識ペルオキシダーゼ複合体(histofine-kit; ニチレイ社)と30分間反応させる。PBSで10分間1回洗浄し、0.05Mトリス-塩酸緩衝液100mlに3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB)20mg、過酸化水素17 $\mu$ lを加え、1枚のスライドにつき100 $\mu$ lで反応させ、顕微鏡下で発色状態を見ながら蒸留水で反応を止める。ヘマト

**Fig. 1.** Immunohistochemical staining for GST- $\pi$  in a previously untreated squamous cell carcinoma specimen (well differentiated). Note the strong and homogeneous positive staining of tumor cells. ( $\times 100$ )



キシリン液に10秒間浸漬し、脱水-キシレン透徹後、封入する。発色程度は、腫瘍細胞が陰性(発色しない)か陽性(正常気管支上皮と同程度もしくはそれ以上発色している)かで判定した。気管支上皮を陽性コントロールとした。

### MTの免疫組織化学的染色

一次抗体として、50倍希釈のマウスモノクロナール抗MT抗体(Dako社)を使用し<sup>7)</sup>、二次抗体として、ビオチン標識された抗マウスIgGウサギ血清を用い、他はGST- $\pi$ の免疫組織化学的染色に準じた。発色程度は腫瘍細胞が陰性(発色しない)か陽性(正常肺間質と同程度もしくはそれ以上発色する)かで判定した。

肺間質を陽性コントロールとした。

統計処理には、Fisher's exact probability test, Scheff testを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### 結果

GST- $\pi$ の発現についてみると、未治療の非小細胞肺癌の86%が陽性であり、組織別にみると扁平上皮癌でFig. 1に示すように全例が陽性で腺癌に比し有意に( $P < 0.05$ )陽性率が高かった(Table 1)。未治療の小細胞肺癌では全例陰性と、非小細胞肺癌に比して、有意に( $P < 0.0001$ )陽性率が低かった。治療の非小細胞肺癌の87%がGST- $\pi$ 陽性であり、組織別にみると扁平上皮癌で全例陽

**Table 1.** Glutathione S-transferase-pi expression in previously untreated lung cancer.

Histology	Negative (%)	Positive (%)	Total
Non-small cell carcinoma	8 ( 14)	48 ( 86) <sup>a</sup>	56
squamous cell carcinoma	0 ( 0)	28 (100) <sup>b</sup>	28
adenocarcinoma	7 ( 26)	20 ( 74)	27
large-cell carcinoma	1 (100)	0 ( 0)	1
Small cell carcinoma	8 (100)	0 ( 0) <sup>c</sup>	8
Total	16 ( 25)	48 ( 75)	64

<sup>a</sup>P<0.0001 compared to value for small cell carcinoma by Fisher's exact probability test.

<sup>b</sup>P<0.05 compared to value for adenocarcinoma by the Scheff test.

<sup>c</sup>P<0.05 compared to value for small cell carcinoma by the Scheff test.

**Table 2.** Glutathione S-transferase-pi expression in lung cases that had been given preoperative chemotherapy.

Histology	Negative (%)	Positive (%)	Total
Non-small cell carcinoma	2 (13)	13 ( 87)	15
squamous cell carcinoma	0 ( 0)	6 (100)	6
adenocarcinoma	2 (22)	7 ( 78)	9
Small cell carcinoma	4 (22)	14 ( 78) <sup>a</sup>	18
Total	6 (19)	27 ( 81)	33

<sup>a</sup>P=0.0003 compared to value for previously untreated small cell carcinoma by Fisher's exact probability test.

**Table 3.** Metallothionein expression in previously untreated lung cancer.

Histology	Negative (%)	Positive (%)	Total
Non-small cell carcinoma	41 ( 73)	15 ( 27)	56
squamous cell carcinoma	17 ( 61)	11 ( 39) <sup>a</sup>	28
adenocarcinoma	24 ( 89)	3 ( 11)	27
large-cell carcinoma	0 ( 0)	1 (100)	1
Small cell carcinoma	8 (100)	0 ( 0) <sup>b</sup>	8
Total	49 ( 77)	15 ( 23)	64

<sup>a</sup>P<0.05 compared to value for adenocarcinoma by the Scheff test.

<sup>b</sup>P<0.05 compared to value for squamous cell carcinoma by the Scheff test.

性，腺癌で78%陽性であった。治療の小細胞肺癌では78%陽性であり，未治療例に比し，有意に(P=0.0003)陽性率が高かった(Table 2)。扁平上皮癌で治療の有無にかかわらず全例が陽性であった。しかしながら，各症例のstage別でGST- $\pi$ の陽性率には有意差はなかった(データ呈示せず)。

MTの発現についてみると，未治療の非小細胞肺癌の27%が陽性であり，組織別にみると扁平上皮癌で39%陽性と腺癌に比し，有意に(P<0.05)陽性率が高かった(Table 3)。また，未治療の小細胞肺癌は全例陰性であった。治療の非小細胞肺癌の80%がMT陽性であり，組織別にみると扁平上皮癌で83%，腺癌で88%陽性であっ

**Table 4.** Metallothionein expression in lung cancer received preoperative chemotherapy.

Histology	Negative (%)	Positive (%)	Total
Non-small cell carcinoma	3 (20)	12 (80) <sup>a</sup>	15
squamous cell carcinoma	1 (17)	5 (83) <sup>b</sup>	6
adenocarcinoma	2 (12)	7 (88) <sup>c</sup>	9
Small cell carcinoma	13 (72)	5 (28)	18
Total	16 (48)	17 (52)	33

<sup>a</sup>P=0.0005 compared to value for previously untreated non-small cell carcinoma by Fisher's exact probability test.

<sup>b</sup>P<0.05 compared to value for small cell carcinoma by the Scheff test.

<sup>c</sup>P<0.05 compared to value for small cell carcinoma by the Scheff test.

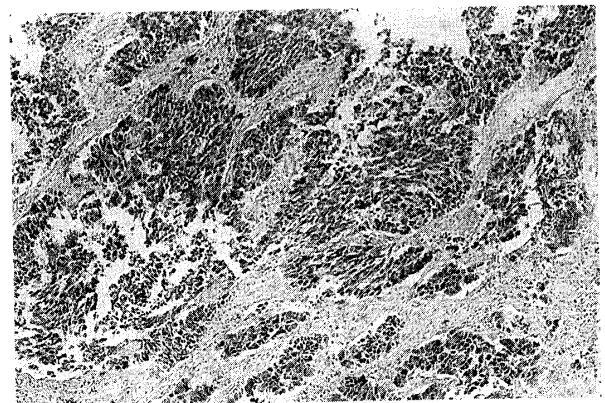
た(Table 4). またFig. 2に示すように治療の小細胞肺癌の28%が陽性であり, 扁平上皮癌(P<0.05)と腺癌(P<0.05)に比し, 有意に陽性率は低かった. 治療の非小細胞肺癌において, 未治療例に比し, 有意に(P=0.0005)陽性率が高かった(Table 4).

### 考 察

肺癌の治療において, 薬剤耐性が問題になる. その原因としてGST- $\pi$ あるいはMTの高発現による薬剤の不活化もしくは抗癌剤によるGST- $\pi$ あるいはMTの誘導による薬剤耐性が考えられる.

Volmらは未治療の非小細胞肺癌でGST- $\pi$ とdoxorubicin耐性に相関があったと報告<sup>8)</sup>している. 我々の検討でも, 未治療の非小細胞肺癌で未治療の小細胞肺癌に比し有意にGST- $\pi$ の陽性率が高く, このことが非小細胞肺癌と小細胞肺癌の抗癌剤に対する感受性に影響していると考ええる. また, Chinese hamster ovary(CHO)細胞にヒトGST- $\pi$ 遺伝子を移入すると1.4~3倍のシスプラチン(cisplatin, CDDP)耐性になる<sup>9)</sup>ことが知られており, 非小細胞肺癌の薬剤耐性の一因子としてGST- $\pi$ が関与している可能性が示唆される. 更に, 非小細胞肺癌の腫瘍マーカーとして血清GST- $\pi$ が有用である<sup>1)</sup>. 我々の検討でも扁平上皮癌で全例陽性, 扁平上皮癌と腺癌で小細胞癌より有意に陽性率が高く, またGST- $\pi$ は癌組織で誘導され, しばしば高発現し<sup>10)</sup>, 癌組織に特異的に染色されることから, GST- $\pi$ は非小細胞肺癌—特に扁平上皮癌—の腫瘍マーカー

**Fig. 2.** Immunohistochemical staining for MT in a treated small cell carcinoma specimen (intermediated cell type). The patient had received two cycles of cisplatin and etoposide preoperatively. The residual tumor cells show homogeneous positive staining. ( $\times 100$ )



として有用である.

Vriesらは未治療の小細胞肺癌の患者からの肺癌細胞株を治療を施行する毎度に樹立し, 治療と共にGST- $\pi$ の発現が増加すると報告<sup>11)</sup>しており, 我々の未治療の小細胞肺癌でGST- $\pi$ すべて陰性, 治療の小細胞肺癌で78%陽性と有意に増加したことはVriesらの報告を支持するものであった. また, Hospersらは, CDDPで選択した未治療の小細胞肺癌株はdoxorubicinやcarboplatinに交差耐性を持ち, 耐性株でのグルタチオンS-トランスフェラーゼ(Glutathione S-transferase, GST)が有意に増加しており, 小細胞肺癌の獲得耐性にGSTが関与していると報告<sup>11)</sup>している. CDDPを含む化学療法により有意に小細胞肺癌で

GST- $\pi$ が誘導されると18例もの小細胞肺癌手術症例で報告した論文は我々の検索した範囲では見あたらない。我々の18例はCDDPを含む化学療法を施行するも腫瘍が残存し手術となっているのでCDDPを含む化学療法に耐性であったと考えられる。更に、化学療法未施行の8例ではすべてGST- $\pi$ 陰性であることより、化学療法でGST- $\pi$ が誘導され、その結果としてCDDP耐性になったと推測される。したがって、GST- $\pi$ が小細胞肺癌の獲得耐性に関与していると考えられる。

未治療の非小細胞肺癌94例中59例(63%)がMT陽性、59例中48例(81%)がdoxorubicin耐性であり、MTの発現とdoxorubicin耐性に相関があったとの報告<sup>12)</sup>がある。我々の検討では未治療の非小細胞肺癌56例中15例(27%)がMT陽性であった。MTの発現は細胞周期依存性であると推測されており<sup>13)</sup>、Volmらの報告と我々の結果の違いはいかなる因子によるものか興味もたれる。Volmらは未治療非小細胞肺癌でMTとGST- $\pi$ に有意の相関があると報告しているが、我々の検討では有意の相関は認められなかった(Table 5)。更に、MTの発現は種々の癌(甲状腺癌、睾丸胎児性癌、膀胱癌、乳癌、大腸癌)で認められ、癌細胞株での免疫組織化学染色では種々の局在(核に強く染まる、細胞質に強く染まる、核と細胞質両方に強く染まる)があり<sup>14)</sup>、その局在と薬剤耐性とは関連しているのかもしれない。我々の検討では、扁平上皮癌では細胞質に強く、腺癌では核と細胞質両方に強く染まる傾向があった。薬剤耐性癌細胞株の研究で、薬剤に接触させることで核内のMTが増加し、そのために薬剤耐性になるといわれている。我々の扁平上皮癌(治療

**Table 5.** Relationship between metallothionein expression and glutathione S-transferase-pi(GST-pi) expression of non-small cell lung cancers.

	Metallothionein		P-value
	positive	negative	
GST-pi negative	3	5	P=0.6676
GST-pi positive	12	36	

例)で核にも染色されてくることより、非小細胞肺癌(治療例)でMTが有意に誘導されるのは核内でのMTがその主たるものだと考える。

一方、ヒト膀胱癌細胞株(J82)をmitomycinC(MMC)で選択したJ82/MMCでMT-II A mRNAが高発現し、J82/MMCはCDDPに交差耐性を持つとの報告<sup>15)</sup>があり、我々の非小細胞肺癌の成績でMMCを含む化学療法でMTが有意に誘導された事実と一致するものであった。更に、ヒトMT遺伝子を移入した細胞でMTが高発現し、CDDP耐性になったとの報告<sup>5)</sup>、あるいはMTが上昇した卵巢癌細胞株でCDDP耐性になったとする報告より、化学療法を施行した非小細胞肺癌例でMTが有意に誘導され、その結果としてCDDPの獲得耐性に関与していると考えられた。

以上の検討により、1)非小細胞肺癌の腫瘍マーカーとして、GST- $\pi$ は有用である、2)小細胞肺癌において、治療により有意にGST- $\pi$ が誘導され、その結果として小細胞肺癌の薬剤耐性に一部関与する、3)非小細胞肺癌において、治療により有意にMTが誘導され、その結果として非小細胞肺癌の薬剤耐性に一部関与すると考えられた。

## 文 献

- 1) Hida T, Kuwabara M, Ariyoshi Y, et al : Serum glutathione S-transferase- $\pi$  level as a tumor marker for non-small cell carcinoma. *Cancer* 73 : 1377-1382, 1994.
- 2) Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara K, et al : Determinants of drug response in a cisplatin-resistant human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 81 : 527-535, 1990.
- 3) De Vries EGE, Meijer C, Timmer-Bosscha H, et al : Resistance mechanisms in three human small cell lung cancer cell lines established from one patient during clinical follow-up. *Cancer Res* 49 : 4175-4178, 1989.
- 4) Lazo JS and Basu A : Metallothionein expression and transient resistance to electrophilic antineoplastic drugs, *In* : *Seminars in cancer*

- biology, WB Saunders Company, pp 267-271, 1991.
- 5) Kelley SL, Basu A, Teicher BA, et al : Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 241 : 1813-1815, 1988.
  - 6) Kodate C, Fukushi A, Narita T, et al: Human placental form of glutathione S-transferase (GST- $\pi$ ) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 77 : 226-229, 1986.
  - 7) Danielson KG, Ohi S and Huang PC : Immunochemical detection of metallothionein in specific epithelial cells of rat organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 2301-2304, 1982.
  - 8) Volm M, Mattern J and Samsel B : Relationship of inherent resistance to doxorubicin, proliferative activity and expression of P-glycoprotein 170, and glutathione S-transferase- $\pi$  in human lung tumors. *Cancer* 70 : 764-769, 1992.
  - 9) Miyazaki M, Kohno K, Saburi Y, et al : Drug resistance to cis-diaminedichloroplatinum (II) in chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase pi gene. *Biochem Biophys Res Commun* 166 : 1358-1364, 1990.
  - 10) Tew KD: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54 : 4313-4320, 1994.
  - 11) Hospers GAP, Mulder NH, De jong B, et al : Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diaminedichloroplatinum (II) *in vitro*. *Cancer Res* 48 : 6803-6807, 1988.
  - 12) Mattern J and Volm M : Increased resistance to doxorubicin in human non-small cell lung carcinomas with metallothionein expression. *Int J Oncol* 1 : 687-689, 1992.
  - 13) Cherian MG, Howell SB, Imura N, et al : Contemporary issues in toxicology-Role of metallothionein in carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 126 : 1-5, 1994.
  - 14) Lazo JS and Pitt BR : Metallothioneins and cell death by anticancer drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35 : 635-653, 1995.
  - 15) Singh SV, Xu BH, Jani JP, et al : Mechanism of cross-resistance to cisplatin in a mitomycin C-resistant human bladder cancer cell line. *Int J Cancer* 61 : 431-436, 1995.

---

(原稿受付 1996年3月29日/採択 1996年12月10日)

## Expression of Glutathione S-transferase-pi (GST-pi) and Metallothionein (MT) in Lung Cancer

*Satoru Fujino*<sup>1</sup>, *Akira Sakamoto*<sup>2</sup>, *Minoru Fukuda*<sup>1</sup>  
*Hiroshi Takatani*<sup>1</sup>, *Masaaki Fukuda*<sup>3</sup>, *Hiroshi Soda*<sup>4</sup>  
*Yuichi Inoue*<sup>5</sup>, *Akitoshi Kinoshita*<sup>6</sup>, *Mikio Oka*<sup>1</sup>  
and *Shigeru Kohno*<sup>1</sup>

1. Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Nagasaki University
2. Department of Internal Medicine, Nagasaki Medical Center for Adults
3. Department of Internal Medicine, Nagasaki Red Cross Hospital
4. Department of Internal Medicine, Public Mitsugi General Hospital
5. Department of Internal Medicine, Isahaya Health Insurance General Hospital
6. Department of Internal Medicine, Nagasaki Municipal Hospital

It has been suggested that glutathione S-transferase-pi (GST- $\pi$ ) and metallothionein (MT), which are an intracellular detoxification enzyme and detoxification protein, are contribute to anti-cancer drug resistance. In present study, GST- $\pi$  and MT expression was analyzed immunohistochemically in primary tumors from 97 patients with lung cancer and the relationship with the results of chemotherapy was examined. Of 56 previously untreated non-small cell lung cancer, 86% were positive for GST- $\pi$ , which was significantly higher than the degree for small cell lung cancer ( $P < 0.0001$ ). All 8 previously untreated small cell lung cancer were negative for GST- $\pi$  and 78% of 18 small cell lung cancer cases receiving preoperative chemotherapy with a regimen including cisplatin were positive. GST- $\pi$  was found to be induced after chemotherapy ( $P = 0.0003$ ). Of 56 previously untreated non-small cell lung cancers 27% were positive for MT and 80% of 15 non-small cell lung cancer received preoperative chemotherapy were positive. MT was significantly induced after chemotherapy ( $P = 0.0005$ ). We therefore suggest that GST- $\pi$  is an important tumor marker of non-small cell lung cancer, which is significantly induced after chemotherapy and related to drug resistance.