

非喫煙者肺癌の発症における微量元素の影響の検討

千葉亮祐¹、森川直人¹、世良耕一郎²、細川貴子³、守口 知¹、重枝 弥⁴、出口博之⁴、
友安 信⁴、齊藤 元⁴、石田和之⁵、菅井 有⁵、前門戸 任¹

¹岩手医科大学内科学講座呼吸器・アレルギー・膠原病内科
020-8505 盛岡市内丸 19-1

²岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森348-58

³日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森348-58

⁴岩手医科大学呼吸器外科学講座
020-8505 盛岡市内丸19-1

⁵岩手医科大学病理診断学講座
020-8505 盛岡市内丸19-1

1. はじめに

肺癌は一般的に喫煙と強い関連を持つが、近年、非喫煙者の肺癌が増加傾向であり、その発症メカニズムは明らかになっていない。肺は外気と接する部位であるため、吸入された物質による発がんへの影響を示唆する報告がある。Radon (Rn) をふくむ幾つかの微量元素は、癌抑制遺伝子である TP53 遺伝子異常の誘因となり、発がんの契機となる可能性も報告されており^{1,2}、微量元素が肺癌、特に非喫煙者肺癌の発症の上で重要な役割を果たしている可能性がある。

肺癌と微量元素の関連を見た研究の多くは環境調査や疫学研究、in vitro での検討であり、臨床検体を用いて組織中の微量元素を直接測定した研究は非常に少ない。

また、EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 遺伝子変異や ALK (Anaplastic Linpho) 融合遺伝子などの、いわゆる Driver Mutation は非喫煙者における頻度が高く、非喫煙者肺癌の発がんに関与していると考えられている。

Driver Mutation は若年の肺腺癌に多いが、これらの Driver Mutation が生じるメカニズムは不明であり、微量元素の関係をみた研究は今までない。

以上の背景をもとに、本研究では「微量元素の慢性的な吸入・蓄積が、非喫煙者の肺癌、とりわけ Driver Mutation をもつ肺癌の発がんに関連している」という仮説を検討するため、非喫煙者肺癌 (Driver Mutation を持つ症例を含む)、喫煙者肺癌、健常肺の 3 群について、当院呼吸器外科での手術検体を用いて、微量元素の集積を検査し比較した。

2. 対象および方法

2.1 対象患者

2013年1月から2016年12月までの間に、当院呼吸器外科で外科的肺切除を受けた1157人のうち、非小細胞肺癌と診断された325人から手術検体が利用可能な80例を使用。80例を組織型と遺伝子変異の有無により下記の4グループに分類。20例の非癌症例の手術検体をControlとして使用。

(i) Lung adenocarcinoma (Ad) with *EGFR* mutation (Ad EGFRm+)

(ii) Ad with *KRAS* mutation (Ad KRASm+)

(iii) Ad without *EGFR*, *ALK*, or *KRAS* mutation (Ad wt)

(iv) Squamous cell carcinoma (Sq)

2.2 標本作製

それぞれの症例について術後パラフィン包埋検体の腫瘍部を4 μmで薄切し、未染パラフィン切片を2枚作成した。

2.3 元素解析 (PIXE : 仁科記念サイクロترونセンター)

a) 検体に対し、「無標準法」に基づきPIXE測定用試料を作成。

b) PIXE法により微量元素の濃度を測定。肺癌やその他の肺疾患と微量元素の関係に関し喫煙歴の有無や組織型、Driver Mutation (*EGFR* 遺伝子変異)の有無をもとに検討した。

3. 結果

患者背景についてはTable 1の通りとなっている。コントロールである非癌症例と比較し、腺癌症例で女性が多く、扁平上皮癌症例では男性が多い傾向があった。

Table 1

	Control (n = 20)	Ad wt (n = 30)	Ad <i>EGFR</i> m+ (n = 20)	Ad <i>KRAS</i> m+ (n = 10)	Sq (n = 20)
Age					
median (range)	63 (27-79)	70 (45-84)	70 (50-80)	72.5 (64-79)	73.5 (54-85)
Sex					
Female	9	26	13	10	1
Male	11	4	7	0	19
Smoking history					
never	10	30	20	10	0
PY < 30	3	0	0	0	0
30 ≤ PY	7	0	0	0	20
Stage					
I/II	-	25	19	10	18
III/IV	-	5	1	0	2
EGFR mutation type					
Ex19	-	-	14	-	-
Ex21	-	-	6	-	-

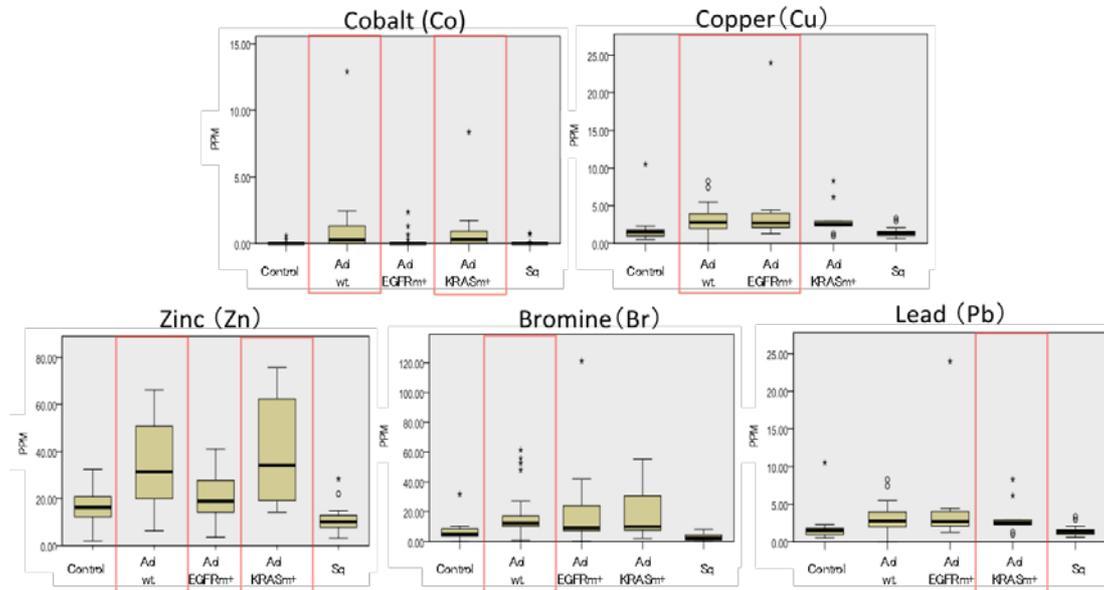
非癌症例と比較し、測定値に有意差があった元素についてFigure 1、Table 2にまとめた。

遺伝子変異がない肺腺癌においてはCo、Cu、Zn、Brが優位に高値であり、*EGFR* 遺伝子変異陽性肺腺癌においてはCu、Pbが有意差をもって高値だった。*KRAS* 遺伝子変異陽性肺癌においてはCo、Znが優位に

高値だった。

扁平上皮癌においては優位差のある元素はなかった。

Figure 1: Amount of trace elements in the tumor tissues of NSCLC patients



Control : tissue from patients without cancer ; $p < 0.05$ (*: $p < 0.01$)

Ad wt: Co*, Cu*, Zn*, Br*

Ad EGFRm+: Cu* , Pb

Ad KRASm+: Co, Zn

Sq: None

No significant difference:

Na, Mg, Al, Si, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Ga, As, Se, Rb, Sr, Nb, Mo, Y, Zr, and Hg

Not detected: Ge, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Cs, Ba, Ce, W, Pt, Au, and Rn

Table 2

それぞれの腫瘍組織と腫瘍周囲組織における微量元素量を非癌症例の組織と比較した (Table3, Figure2)。腺癌においては Control である非癌症例に比べ Co、Cu、Zn、Br が腫瘍部位で多く、腫瘍周囲組織ではさらに多く検出された。Driver-mutation の有無による微量元素量の差は認められなかった。扁平上皮癌にお

いては腫瘍と非癌症例との間に優位差のある微量元素はなかったが、腫瘍周囲組織においては Cu、Zn、Br の量が優位に多く検出された。

Table 3A: Average trace element levels (ppm) in the tumor tissues of NSCLC patients

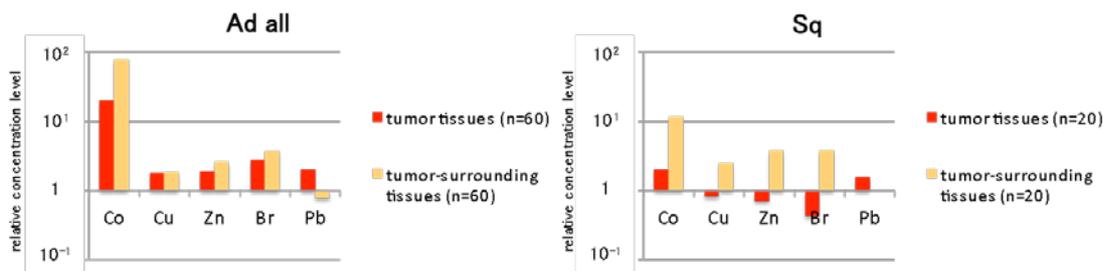
	Control (n = 20)	Ad all (n = 60)	Ad wt (n = 30)	Ad EGFRm+ (n = 20)	Ad KRASm+ (n = 10)	Sq (n = 20)
Co	0.04	0.8*	1.01**	0.25	1.22*	0.08
Cu	1.82	3.29**	2.78*	4.10**	3.21	1.5
Zn	16.59	31.7**	32.72*	26.03	39.98*	11.86
Br	6.51	18.18**	15.97**	21.54*	18.1	2.78
Pb	4.07	8.25	8.18	9.11*	6.72	6.4

Table 3B: Average trace element levels (ppm) in the tumor-surrounding tissues of NSCLC patients

	Control (n = 20)	Ad all (n = 60)	Ad wt (n = 30)	Ad EGFRm+ (n = 20)	Ad KRASm+ (n = 10)	Sq (n = 20)
Co	0.04	3.14*	3.92**	1.46**	4.15**	0.47
Cu	1.82	3.41**	3.31**	3.85**	2.86	4.56**
Zn	16.59	43.25**	47.84**	38.2**	39.61*	63.46**
Br	6.51	24.65**	25.55**	15.25*	35.45	25.11**
Pb	4.07	3.17	3.78	2.19	3.28	0**

•Control: tissues from patients without cancer
 •Significant difference compared with control *p < 0.05; **p < 0.01

Figure 2: Comparison of trace element levels in tissues between NSCLC patients and controls
 (Control: tissue from patients without cancer)



4. 考察とまとめ

非癌症例と比較し、いくつかの元素において測定値に優位な差がみられた。

先行研究では慢性的なコバルトの吸入がチロシンキナーゼ活性を高めて発がんに影響する可能性も示唆されている³が本研究における微量元素量の変化が癌の原因であるか結果であるかは明らかでない。組織型や

検体採取部位におけるこれらの微量元素の差違の原因として、喫煙による影響、腫瘍量や腫瘍周囲の炎症の程度、腫瘍増殖速度などが影響している可能性がある。今後それぞれの検体において、上記 data を加えさらなる解析を行う予定である。

参考文献

- 1) Harley NH1, Chittaporn P, Heikkinen MS, et al. Radon carcinogenesis: risk data and cellular hits. *Radiat Prot Dosimetry* 130(1): 107-9, 2008
- 2) Milner J, Clive Shrubsole C, Das P, et.al. Home energy efficiency and radon related risk of lung cancer. modelling study. *BMJ* 348: f7493 doi, 2013
- 3) *Kras*, *Egfr*, and *Tp53* Mutations in B6C3F1/N Mouse and F344/ NTac Rat Alveolar/Bronchiolar Carcinomas Resulting from Chronic Inhalation Exposure to Cobalt Metal. *Toxicol Pathol.* 43(6): 872–882, 2015

The chemical elements in lung tissue and lung cancer subtypes

Ryosuke Chiba¹, Naoto Morikawa¹, Koichiro Sera², Takako Hosokawa³, Satoshi Moriguchi¹, Wataru Shigeeda⁴, Hiroyuki Deguchi⁴, Makoto Tomoyasu⁴, Hajime Saito⁴, Kazuyuki Ishida⁵, Tamotsu Sugai⁵ and Makoto Maemondo¹

¹Division of Pulmonary Medicine, Allergy and Rheumatology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

³Nishima Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁴Department of Respiratory Surgery, Iwate Medical University School of Medicine
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

⁵Department of Molecular Diagnostic Pathology, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

Abstract

Background: Several studies have suggested that some trace elements may affect the onset of lung cancer. However, the effect of trace elements on lung cancer carcinogenesis is poorly understood. The aim of this study was to assess if trace elements may be the cause of carcinogenesis in lung cancer tissues of patients with lung cancer with a non-smoking history, driver mutations, or histology.

Methods: The study included patients with non-small cell lung cancer who had undergone surgical resection. For the measurement of trace elements, surgically resected samples were studied using particle induced X-ray emission analysis. In total, 54 elements were investigated in each sample. Based on the pathology and driver mutation status, samples were classified into the following groups: lung adenocarcinoma (LADC) with *EGFR* mutation (LADC *EGFR*m+); LADC with *KRAS* mutation (LADC *KRAS*m+); LADC without *EGFR* mutation, *KRAS* mutation, and *ALK* rearrangement (LADC wt); and lung squamous cell carcinoma (SCC). Tissues from 20 patients with a non-malignant disease were also analyzed for trace elements as controls.

Results: The levels of 6 trace elements were increased in the LADC wt group. Copper was increased in the LADC *EGFR*m+ group. Cobalt and zinc were increased in the LADC *KRAS*m+ group. There were no differences in trace element levels between the SCC group and the control group.

Conclusion: Trace elements may play a role in the pathology and molecular signature of lung cancer.