

機関番号：32607

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591676

研究課題名 (和文) 微乳頭腺構造を有する肺腺癌をモデルとした癌浸潤・転移メカニズムの解析

研究課題名 (英文) Analysis on invasion and metastasis of lung adenocarcinomas with micropapillary pattern.

研究代表者

佐藤 之俊 (SATO YUKITOSHI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90321637

研究成果の概要 (和文)：微乳頭腺構造 (MPP) を有する肺腺癌と血管新生の関連性を解明するため肺腺癌切除 517 例を集積し解析した。MPP 陽性群は予後不良で、脈管侵襲頻度が高く、約半数にリンパ節転移が証明された。この群では、原発巣辺縁で MPP が目立ち、リンパ管、血管ならびに肺胞内に癌細胞集塊が浮遊するように存在すること、臓側胸膜浸潤と関連性が深いことが明らかとなった。VEGF-A, B, C 及び VEGF-R1, 2, 3 を用いた免疫染色の結果、VEGF-C 及び VEGF-R3 とともに、MPP 部分に高発現がみられた。また腫瘍間質でも、これらは高発現していた。MPP 陽性肺腺癌の進展に血管新生因子が関連していることと、腫瘍接種モデルでの検討から、間質の VEGFR-1, 2 の動員が腫瘍進展に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To analyze the relationship between lung adenocarcinomas with micropapillary pattern (MPP) and vascular endothelial growth factors (VEGF), 517 cases of resected lung cancers were collected and clinic-pathologic study was performed. MPP-positive lung cancers revealed poor prognosis, frequent vascular invasion, and frequent lymph node metastasis. Immunohistochemically, VEGF-C and -R3 strongly expressed in MPP portions. By the analysis on mice models, it was considered that VEGFR-1 and 2 plays an important role in tumor progression on the stromal tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

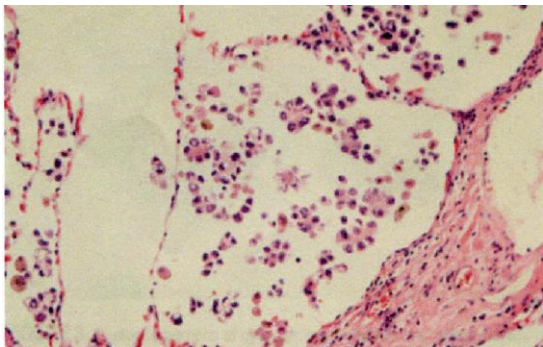
キーワード：肺癌、腺癌、微乳頭構造、免疫組織化学、血管新生因子

1. 研究開始当初の背景

本邦における肺癌の死亡数は年々増加を示し、悪性腫瘍の最も多い死亡原因である。現在では死亡数も 65,000 人を超え、それに対する治療法の進歩は日進月歩であり、徐々に 5 年生存率も改善傾向が見られているが決して満足できる状況ではない。肺癌の主な組織型としては 1. 腺癌、2. 扁平上皮癌、3 大細胞癌、4 小細胞癌の 4 つがある。1990 年代前半から癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常を予後因子として臨床応用する研究が数多く行われ

ていたが、TNM 分類をこえるような臨床マーカーは存在していないのが現状である。こうした中、我々は肺腺癌における微乳頭 (micropapillary) 構造 (MPP と省略) の出現に注目し、病理学的、細胞学的に本構造を有する I 期腺癌は予後不良であることを報告した (図 1；微乳頭構造の腺癌の I 期腺癌における 5 年生存率 *Am J Surg Pathol* 27: 101-109, 2003；*Cancer* 102: 81-86, 2004)。しかし、予後不良である理由は明らかとなっていない。

図 1

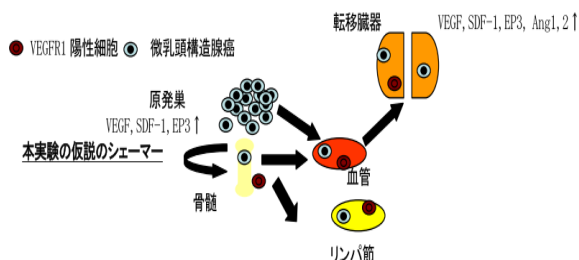


2. 研究の目的

癌の間質組織は腫瘍の微小循環を形成する重要な組織であり、腫瘍の増殖及び浸潤転移に深く関与している。共同研究者天野はこれら腫瘍周囲のストローマに、炎症性メディエーターの一つであるプロスタグランジン E2 (PGE2) のサブタイプ EP3 受容体の発現が癌の増殖、浸潤転移に重要な因子であることを報告した (*J Exp Med* 20: 197: 221-32, 2003)。また創傷治癒モデルを用いた実験でその EP3 受容体が骨髄由来の Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR-1) 陽性細胞を誘導し、創傷治癒を促進することを明らかにした (*Am J Pathol* 169:1458-72, 2006)。従来、血管新生のバイオマーカーとして Endothelial Progenitor Cell (EPC; CD34+ VEGFR-2+) が有用とされていたが Kaplan は腫瘍進行において VEGFR1 陽性細胞がケモカイン受容体 (CXCR4) 発現腫瘍細胞を転移臓器に引き寄せることを明らかにし VEGFR-1 陽性細胞が腫瘍の浸潤及び転移に重要な役割を担っていることが推測された (*Nature* 438:820-827 2005)。

従来、血管新生のバイオマーカーとして Endothelial Progenitor Cell (EPC; CD34+ VEGFR-2+) が有用とされていたが Kaplan は腫瘍進行において VEGFR1 陽性細胞がケモカイン受容体 (CXCR4) 発現腫瘍細胞を転移臓器に引き寄せることを明らかにし VEGFR-1 陽性細胞が腫瘍の浸潤及び転移に重要な役割を担っていることが推測された (*Nature* 438:820-827 2005)。

図 2



そこで申請者は非微乳頭構造の腺癌と比

較し、浸潤・転移を起こしやすい微乳頭構造の腺癌の間質組織において、(1) EP3 受容体の発現及び特に骨髄由来の VEGFR-1 陽性細胞の発現が非微乳頭構造の腺癌と比較し有意に増強しているか否か、(2) 血管新生促進因子の発現、の 2 点について検討する計画を立案した。

3. 研究の方法

(1). 臨床研究

①. 手術検体

解析の対象は北里大学医学部呼吸器外科、北里大学病理部ならびに癌研究会研究所病理部で収集してきた肺腺癌のうち、病理組織学的に微乳頭構造を有すると診断された病理病期 I 期の肺腺癌の切除例である。対照群としては同時期に切除された肺腺癌で、真の乳頭状構造を示す癌 (乳頭腺癌) で且つ微乳頭構造が陰性と判定された症例の外科的切除された検体を用いる。

②. 症例患者の臨床情報及び予後調査

対象となった患者の喫煙歴、合併症の有無などの詳細の臨床情報、臨床診断及び予後調査を、診療録などを用いて再調査する。

③. 免疫組織化学による切除肺組織における EP3 受容体及び VEGFR-1 の発現評価

手術検体肺組織に対し EP3 受容体及び VEGFR1 の抗体を使用し染色し無作為に場所を選び EP3 受容体及び VEGFR-1 の陽性細胞の定量化を行う。

④. 免疫組織化学による切除リンパ節における EP3 受容体及び VEGFR-1 の発現評価

手術検体リンパ節組織に対し EP3 受容体及び VEGFR-1 の抗体を使用し染色し無作為に場所を選び EP3 受容体及び VEGFR-1 の陽性細胞の定量化を行う。

⑤. 5 年生存率の検討

B, C の定量結果を集計し微乳頭構造を有する群と微乳頭構造が陰性と判定された群の 5 年生存率について検討する。

(2). 基礎研究

培養細胞株の樹立

現在微乳頭構造の腺癌の細胞株は残念ながら樹立されていない。しかしながら、研究分担者癌研究所の石川は有明病院で手術施行された症例全例の癌細胞を培養しており、現在微乳頭構造の腺癌の細胞株の樹立にむけての実験を行っている。その他使用する細胞は正常肺細胞、低分化型腺癌、腺癌細胞株である。細胞培養とデータ処理については当大学薬理学教室の協力によって行う。

①. *in vitro* 実験：細胞株による血管新生促進因子の分泌の違いの検討

正常肺細胞、低分化型腺癌、腺癌細胞株、微乳頭構造の腺癌細胞株を培養し VEGF, SDF-1, Ang2 蛋白濃度を ELISA kit で測定する。

VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, SDF-1, Ang1, Ang2 及び PGE2 の受容体 (EP1-EP4) の RNA の発現について定量的 PCR を用いて測定する。定量的 PCR については当大学薬理学教室の協力によって行う。

②. *in vivo* 実験：腫瘍接種モデルにおける腫瘍増殖・転移・予後の相違の検討

3. 0.1×10^6 個の低分化型腺癌、腺癌細胞株、微乳頭構造の腺癌細胞株をヌードマウスの皮下に接種し、経時的に腫瘍の大きさを計測する。28 日後吸入麻酔を用いてヌードマウスを犠牲死させ、肺を摘出しその表面に形成された転移数 (コロニー数) を計測する。

③. 免疫組織化学による切除腫瘍及び肺組織における EP3 受容体及び VEGFR1 の発現評価

28 日後摘出したヌードマウスの腫瘍及び肺組織を EP3 受容体及び VEGFR1 の抗体を使用し染色し、無作為に選んだ部位における EP3 受容体及び VEGFR1 の陽性細胞の定量化を行う。

④. 血中の VEGFR1 陽性細胞の発現の増強, VEGF, SDF-1, Ang2 濃度の測定

経時的に腫瘍移植したマウスに対しフローサイトメトリーを用いて VEGFR1 陽性細胞の発現, ELISA kit を用いて VEGF, SDF-1, Ang2 濃度の測定を行う。なお、フローサイトメトリーを用いた CXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞の発現の解析は、当大学免疫学教室の協力によって行う。

4. 研究成果

(1) 臨床研究

微乳頭腺構造を有する肺腺癌 (MPP) 根治切除例の切除標本を癌研有明病院の 209 例と、北里大学病院における肺腺癌の根治切除症例 308 例を収集し、それらにおいて細胞診における微乳頭腺構造の有無と患者の喫煙歴、合併症の有無などの詳細の臨床情報、臨床診断、病理学的事項及び予後を、診療録などを用いて再調査するとともに、臨床病理学的事項との関連性を検討した。その結果、I 期という早期に分類される肺腺癌症例において、細胞形態的に微乳頭腺構造を示す細胞集塊の出現している一群は予後不良の傾向であった (図 3a, b)。

図3a Overall survival of patients with reference to the results of MPC findings (n=209).

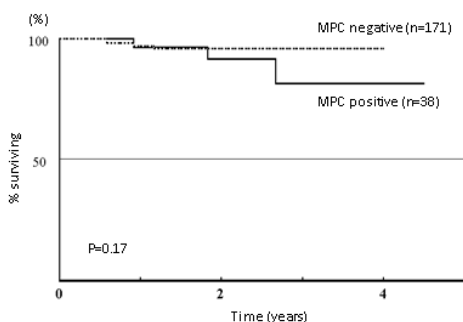
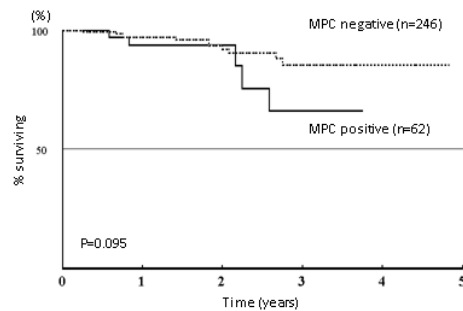


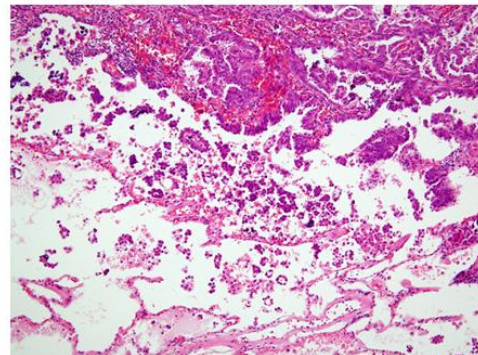
図3b Overall survival of patients with reference to the results of MPC findings (n=308).



とくに、北里大学の切除例 308 例では、細胞形態的に微乳頭腺構造を示す細胞集塊の出現している 62 例では、有意差はないが予後不良の傾向であった (5 年生存率で 66%; これに対して MPP 陰性群は 86%; $P=0.095$)。これは、対象例の術後観察期間が短いと考えられたが、臨床的には $P=0.095$ と marginal であり予後不良群と判断された。

MPP 陽性群は脈管侵襲陽性の頻度が高く、また、臨床的にリンパ節転移が陰性と判断されたものであっても、術後その約半数にリンパ節転移が組織学的に証明された。さらに、病理標本の詳細な検討からは、腺癌の原発巣辺縁部において、MPP が目立つこと、リンパ管ならびに肺泡構造に癌細胞集塊が浮遊しているように存在すること (図 4)、臓側胸膜浸潤 (PL 因子) と関連性が深いこと等の特徴が明らかとなった。

図4 病変の辺縁部におけるMPP (HE染色)



(2) 免疫組織化学による切除肺組織における VEGF 及び VEGF 受容体の発現評価

① 組織学的に MPP と診断された 13 例と、対照として腺癌 56 例の手術検体の肺癌組織を用い、VEGF-C 及び VEGFR-3 の抗体を使用し免疫組織化学染色を行った。さらに、染色結果の半定量的評価方法としては、染色性を 0, 1, 2, 3 の 4 段階に判定し、陽性細胞の出現頻度を 0, 1, 2, 3 の 4 段階に判定し、両者の合計を染色スコアとして算出した。

その結果、VEGF-C 及び VEGFR-3 の陽性例ではいずれも有意差を認めなかった ($P=0.12$;

P=1)。しかし、両群とも微乳頭構造部分で over-expression がみられた(図 5)。しかし、染色性をスコア化し比較したところ、VEGF-C においては、MPP 群ではスコアの平均 3.7 で、対照群の 3.5 と比較して有意差はみられなかった(P=0.54)。次に、VEGFR-3 においては、MPP 群ではスコア平均が 4.9 で、対照群は 3.7 であり、両群に有意差は認められなかったが、高発現の傾向にあった(P=0.56)。さらに、発現の程度を高発現 (Score 4 以上) と低発現 (Score 3 以下) に分類し比較したところ、R3 において MPP 陽性群で高発現の傾向がみられた(表 1)。なお、間質における免疫組織化学染色の結果では、対照との差は明らかではなかった。

転移リンパ節についての検討では、本学の MPP 陽性 62 例中 30 例 (48%) にリンパ節転移が見られ、その転移リンパ節での免疫染色では、原発巣の結果と同様であった。ゆえに、腫瘍の血管新生における性質は転移巣においても保持されているものと考えられた。

図5 MPP部分におけるVEGF-C染色

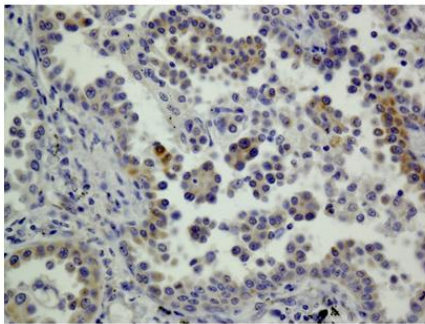


表 1 VEGF-CとR3の染色性

	MPP+ (n=13)	対照群 (n=56)	P value
VEGF-C			
Positive	10	52	0.12
Negative	3	4	
VEGF-R3			
Positive	12	52	1
Negative	1	4	
VEGF-C			
Score 3以下	4	24	0.63
Score 4以上	9	32	
VEGF-R3			
Score 3以下	1	19	0.08
Score 4以上	12	37	

従来の報告では、リンパ管新生増強作用に 関与する VEGF-C とその受容体 VEGFR-3 の発現は、非浸潤性肺腺癌において低頻度であるとされているが、VEGF-C とリンパ節転移との 関連性については、positive とする報告と

negative という報告があり、明確な結論はな されていない。しかし、本検討から、有意差は ないが MPP 陽性腺癌の腫瘍細胞において VEGF-C ならびに R-3 が他の浸潤性肺腺癌より 高発現の傾向であったことから、腫瘍細胞に おける VEGFR-3 の発現が MPP 陽性肺癌の予後 不良に対し関連している可能性が示唆され た。

② VEGF-A, B ならびにそれらの受容体であ る R-1, R-2 を用い MPP 陽性群 13 例における 発現を検索した。

表 2 に VEGF-A, B, C と VEGFR-1, 2, 3 の腫瘍 細胞における染色スコアを示す。有意差はな いが、VEGF-A, R-1 のスコアが VEGF-C, R-3 の スコアより高値の傾向が示された。これ は、MPP 陽性群の腫瘍はリンパ管新生のみならず、血管新生にも密接に関与していること が推定された。ゆえに、MPP を有する肺腺癌は 脈管浸潤の頻度が高く予後不良であること の理由として、腫瘍が血管ならびにリンパ管 新生に直接関与していることが考えられた。

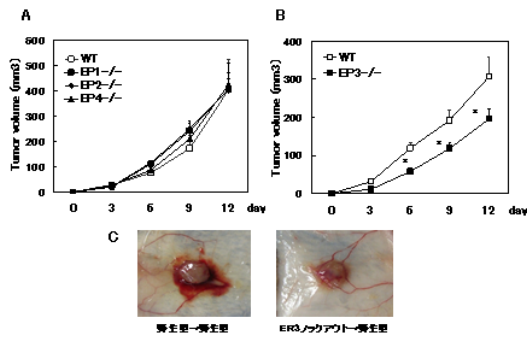
表 2 MPP陽性群におけるVEGFとVEGF受容体の染色性 (Score)

Case No.	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR3
1	6	5	6	5	6	6
2	4	6	6	5	6	6
3	5	6	6	6	6	6
4	6	6	6	6	6	6
5	5	5	5	6	6	5
6	5	6	4	6	6	4
7	4	5	5	6	5	6
8	5	5	2	6	5	4
9	5	5	4	4	5	6
10	0	5	0	5	6	0
11	4	5	4	6	6	5
12	4	5	0	6	6	5
13	4	4	0	4	5	5
Average	4.9	5.2	3.7	5.5	5.7	4.9

(3) *in vivo* 実験：腫瘍接種モデルにおける腫瘍増殖・転移・予後の相違の検討

われわれは、マウスにて腫瘍増殖時にプロ スタグランジンが間質細胞に作用し VEGF を 誘導することにより血管新生を増強している ことをこれまでに報告し、また、骨髄キメラ マウスを用いた検討から、PGE2 受容体 EP3 を発現する骨髄細胞の動員が重要であることを 明らかにしてきた。今回のマウス背部皮下 への腫瘍接種モデルの実験から、野生型キメラ マウスに比べ EP3 チロシンキナーゼノックアウト骨髄キメラマウスでは、有意に腫瘍 依存性の血管新生が抑制されたが、その際 EP3 ノックアウト骨髄キメラマウスの間質組 織では VEGF の発現量が低く、VEGFR-1 陽性細胞 および VEGFR-2 陽性細胞の間質への動員が 有意に抑制されていた。以上の動物実験から、 腫瘍間質でも VEGFR-1 陽性細胞の動員が転 移・増殖の鍵となることを見いだされた (図 6)。

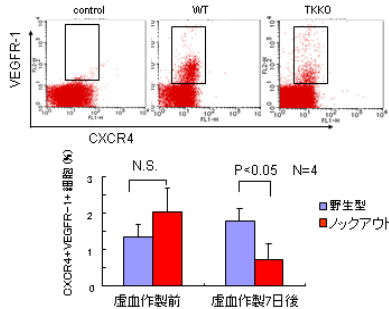
図6 EP3ノックアウト骨髄キメラマウスでの腫瘍増殖の抑制



(4) 血中の VEGFR1 陽性細胞の発現の増強, VEGF, SDF-1, Ang2 濃度の測定について

本研究期間では、腫瘍移植モデルでの VEGFR-1 野生型とチロシンキナーゼノックアウトマウスでの CXCR4 陽性/VEGFR-1 陽性細胞の血中変化の実験は遂行できなかった。しかし、C57BL/6 マウスを用いた下肢虚血モデルでの解析では、末梢血においては、虚血作製前では野生型とノックアウトでは差は認めなかったが、虚血作成 7 日目において末梢血への CXCR4 陽性/VEGFR-1 陽性細胞動員が抑制されていることが観察された。今後、これを腫瘍移植モデルに適応することにより、肺癌の転移・増殖のメカニズムが解明される可能性が示された(図 7)。

図7 CXCR4陽性VEGF-R1 陽性+細胞の末梢血での変化



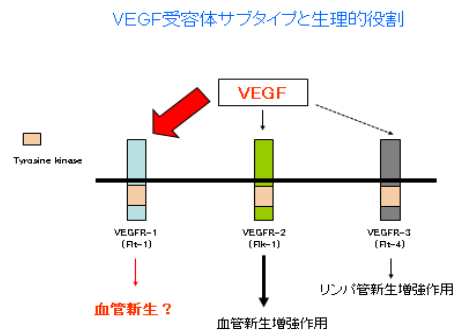
(5) 培養細胞株の樹立

組織学的に MPP 成分を含むと考えられる症例に対し、外科切除時の新鮮標本から腫瘍細胞を採取し、細胞株樹立を試みた。その結果、腺癌ならびに MPP 陽性腺癌での細胞培養は困難であった。唯一細胞株が樹立できたものは、切除後の病理学的ならびに免疫組織化学的検索にて、上皮マーカーと神経内分泌マーカーが陽性であり、肺大細胞神経内分泌癌への分化を示すものであったと結論された。

(6) まとめ

肺腺癌の一亜型である微乳頭構造を有する腺癌(MPP)は予後不良な腫瘍であり、脈管浸潤を高頻度に伴っているなど臨床病理学的に特徴ある一群の腺癌であることが確認された。本腫瘍では、血管新生因子 VEGF-A, B, C がいずれも MPP 部分の腫瘍細胞と腫瘍の間質組織に高発現していた。このことから、VEGF が MPP 陽性肺腺癌の進展に関与しているという仮説を立証することができた(図 8)。本腫瘍は、改訂される WHO の原発性肺癌組織分類において、腺癌の一亜型として採用されることが決定した。今後、細胞株の樹立による本腫瘍の分子生物学的特徴を明らかにすることによって、血管新生に関連した、癌の増殖・浸潤・転移のメカニズムを解明することが期待される。

図 8



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Hoshi R, Furuta N, Horai T, Ishikawa Y, Miyata S, Satoh Y, Discriminant Model for Cytologic Distinction of Large Cell Neuroendocrine Carcinoma from Small Cell Carcinoma of the Lung, J Thorac Oncol, 査読有 5 巻, 2010, 472-478
- ② Amano H, Ohnuma Y, Niibe Y, Hayakawa K, Satoh Y, Majima M, Combined Effect of Anti-Angiogenic Agents, Angiotensin Type 1 Receptor Antagonists and Radiation Therapy. Current Signal Transduction Therapy, 査読有 5 巻, 2010, 206-211
- ③ Amano H, Ito Y, Suzuki T, Katoh S, Senior R, Kitasato H, Hayash I, Satoh Y, Narumiya S, Majima M, Roles of a Prostaglandin E type Receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis, Cancer Sci, 査読有 100 巻, 2009, 2318-2324

- ④ Satoh Y, Hoshi R, Horai T, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Miyata S, Association of Cytologic Micropapillary Clusters in Cytology Samples with Lymphatic Spread in Clinical Stage I Lung Adenocarcinomas, Lung Cancer, 査読有 64 巻, 2009, 277-281

[学会発表] (計 5 件)

- ① 星 利良, 宝来 威, 文 敏景, 坂尾幸則, 奥村 栄, 中川 健, 堀池 篤, 大柳文義, 西尾誠人, 元井紀子, 石川雄一, 宮田 敏, 佐藤之俊. 原発性肺癌における細胞診での予後の推測に関する検討. 第 51 回日本肺癌学会総会 (2010 年 11 月 3 日, 広島)
- ② Amano H, Kato S, Ito Y, Satoh Y, Majima M. Angiogenesis enhanced by TP signaling- mediated platelet adhesion to neovascularized endothelial cells with VEGFR1+CXCR4 mobilization during hindlimb ischemia. 9th World Congress for Microcirculation. (2010.9.28, Paris)
- ③ Amano H, Ito Y, Matsui Y, Ogawa F, Kuroudu N, Nezu N, Iyoda A, Majima M, Satoh Y. Role of Angiotensin type 1a receptor signaling on tumor metastasis formation. 第 69 回 日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月 22 日, 大阪)
- ④ 佐藤之俊. 特別講演 肺癌診療における呼吸器細胞診: 現状と展望. 第 27 回日本臨床細胞学会北陸支部連合会学術集会. (2010 年 9 月 23 日, 福井)
- ⑤ Satoh Y, Hoshi R, Horai T, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Miyata S. Cytology of adenocarcinoma of the lung: peripheral non-invasive lesions and impact of micropapillary clusters on lung cancer treatment. (17th International Congress of Cytology, 2010 May 19, Edinburgh, Scotland, UK). Workshop 32.

[図書] (計 2 件)

- ① 柿沼廣邦, 佐藤之俊. 細胞診断. 青笹克之, 松原修 編集. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌 中山書店, 2011, 東京, p31-40.
- ② 柿沼廣邦, 佐藤之俊. 第 9 編 さまざまな医用画像. 第 8 章 細胞診. 石田 隆行, 桂川 茂彦, 藤田 広志 監修: 医用画像ハンドブック. オーム社, 東京, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 之俊 (SATOH YUKITOSHI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 90321637

(2) 研究分担者

天野 英樹 (AMANO HIDEKI)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 60296481

石川 雄一 (ISHIKAWA YUICHI)
(財) 癌研究会・がん研究所・部長
研究者番号: 80222975