

平成 22 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790294
 研究課題名 (和文) ロジスティック回帰分析を用いた小型肺腺癌の予後を予測するための研究
 研究課題名 (英文) Development of a logistic regression predictive model for the outcome of patients with resected lung adenocarcinoma of 2cm or less in size

研究代表者 佐久間 裕司 (SAKUMA YUJI)
 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター (臨床研究所) ・
 がん分子病態研究部門・主査

研究者番号：10364514

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、最大径 2cm 以下の小型肺腺癌の術後再発を概ね正確に予想するため判別式を作製することができた。さらに術後再発を規定する最大の因子は脈管浸潤の有無であったため、脈管内に浸潤した肺腺癌細胞をアポトーシス (細胞死) させるための研究も併せて行い、Src の活性化が肺腺癌のアポトーシス抵抗性に関与していることを示すことができた。

研究成果の概要 (英文) : We were able to develop a logistic regression predictive model that can predict with considerable accuracy whether or not patients with small lung adenocarcinoma experience relapse after surgery. It was apparent that the presence of vessel invasion most strongly affects the outcome. We thus conducted several experiments in order to induce apoptosis in intravessel lung adenocarcinoma cells, which usually resist apoptosis (anoikis). The results obtained clearly showed that the kinase activity of Src plays a critical role in the anoikis resistance in lung adenocarcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：小型肺腺癌、術後再発、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

小型肺腺癌患者の約 2 割に根治術後の再発が生じることは知られていたが、再発の有無を予測可能な診断基準は確立されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 小型肺腺癌の中で根治術後に再発する腫瘍の診断基準は確立されていなかったため術後再発を予測可能な判別式の作製を目指して本研究を行った。

(2) (1)の研究から小型肺腺癌の術後再発を規定する最大の因子は脈管浸潤の有無であることが分かった。そこで肺腺癌組織の脈管内に浮遊する癌細胞が容易にアポトーシスに陥らない (anoikis 抵抗性を示す) 分子機構の解明を目指して実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 研究(1)の研究手法

① 対象：神奈川県がんセンターで臨床病期 I 期、最大径 2cm 以下の solid-density type 腺癌と画像診断され、肺葉切除+縦隔リンパ節郭清を受けた 53 例を対象とした。53 症例は病理学的に原発性肺腺癌であり pN0 が確認されている (病理病期 I 期)。男性 28 人、女性 25 人であり、年齢の中央値は 64 歳 (24-80 歳) である。喫煙者 31 人、非喫煙者 22 人。16 人 (平均観察期間 39 ヶ月、11-72 ヶ月) は術後に再発が確認され (10 人は肺癌死している)、残り 37 人 (平均観察期間 92 ヶ月、60-127 ヶ月) は 5 年間以上無再発である。神奈川県がんセンター男性症例から作成された再発予測モデルの妥当性を検証するため茨城県立中央病院で手術された男性の肺腺癌患者 11 人 (最大径 2cm 以下) のデータを用いた。

② 組織学的検索：HE 染色および EVG 染色がなされた病理標本を全例再検し組織学的に再分類を行った。組織型に関しては Terasaki らの分類 (*Am J Surg Pathol* 2003; 27: 937-51) に準じた。静脈浸潤、リンパ管侵襲、および乳頭癌成分の有無についても検索した。

③ 免疫染色：MIB-1, TTF-1, CEA, p53 の免疫染色を行った。

④ 遺伝子変異検索：K-ras codon 12 と EGFR exon 18, 19, 21 の変異検索を行った。

⑤ 統計学的解析：個々の臨床病理学的因子や遺伝子変異の有無が再発の有無と相関するか否かを Fisher's exact probability test を用いて解析した。その後、Fisher 検定で統計学的有意差 ($p < 0.05$) の得られた因子を独立変数とする logistic model を作成したが、最終的に正分類率が最も高く、かつ独立変数の最も少ないモデルを本研究での再発予測モデルとした。予測再発確率 0.5 (50%) を cut off 値として logistic model での正分類率を検証した。予測再発確率 > 0.5 を recurrence group、予測再発確率 ≤ 0.5 を non-recurrence group と分類した。Recurrence group、non-recurrence group それぞれに Kaplan-Meier 法で無再発生存曲線を描いた。その検定は log-rank test で行った。

(2) 研究(2)の研究手法

対象は病理学的に高度のリンパ管侵襲を認めた原発性肺腺癌 20 例 (男性：13 人、女性：7 人；EGFR 遺伝子変異あり：9 人、同変異なし：11 人；年齢中央値：62 歳) と 9 種類の肺腺癌細胞株である。病理組織には Src, phospho (p)-Src, Cleaved-Caspase 3, E-cadherin 等の免疫組織化学染色を施行し、脈管内浮遊細胞と細胞外基質と付着した細胞を別個に解析した。培養細胞を用いた実験では、付着培養時 (通常の培養) と low-cell binding dish を用いた浮遊培養時での蛋白 (Src, p-Src, E-cadherin 等) 発現の変化を Western Blot 法にて調べ、比較検討した。また浮遊培養された 4 種の培養細胞に 2 種類の Src 阻害薬 (小分子化合物) である PP1, bosutinib を添加することによりアポトーシスが誘導されるか否かの検討も行った。

4. 研究成果

(1) 研究(1)の研究成果

8 因子 (性別、血管浸潤、リンパ管侵襲、組織型、P53 過剰発現、pap 成分、CEA 発現および喫煙歴) が単変量解析にて再発と有意に相関した。この内の 6 因子 (性別、血管浸潤、リンパ管侵襲、組織型、乳頭癌成分および喫煙歴) からなる logistic model が、最も変数が少なく、かつ正分類率が最も高かった (91%)。ただしこの model では全ての女性が non-recurrence group に分類されてしまうため、以後は対象を男性に限って検索した。男性患者 28 人を対象に 5 因子 (6 因子から性別を除いたもの) からなる logistic model を作成すると正分類率は 87% となった (図 1)。この model の妥当性を他院症例で検証すると統計学的有意差は得られなかったが、9/11 人 (82%) の再発の有無が正しく予想された (図 2)。

図 1. 神奈川県がんセンター症例の無再発生存曲線 (男性のみ)

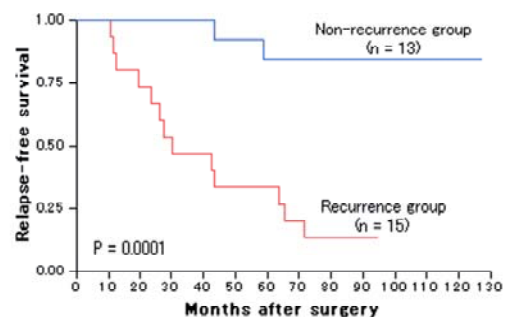
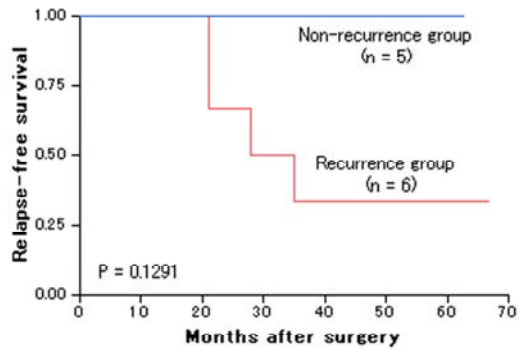


図 2. 神奈川県がんセンターで手術された男性患者から作成された再発予測モデルを茨城県立中央病院で手術された患者に当てはめた無再発生存曲線



(2) 研究(2)の研究成果

原発性肺腺癌組織の脈管内に浮遊した癌細胞は E-cadherin を発現しながら胞巣を形成していた。リンパ管内浮遊癌細胞と細胞外基質と付着した癌細胞の Cleaved-Caspase 3 の陽性率 (apoptotic index) に差を認めなかった。このことは脈管内で浮遊した癌細胞が anoikis 抵抗性を獲得していることを裏付けている。さらに脈管内浮遊癌細胞の Src および p-Src 発現は 細胞外基質と付着した細胞と比較すると顕著に強かった (図 3)。また検索した 9 種類の肺腺癌細胞株はいずれも anoikis 抵抗性を示したが、浮遊培養系で培養した際に 4 種の細胞株は明瞭な spheroid を形成することが分かった。この 4 種が形成する spheroid は p-Src と E-cadherin を発現し、リンパ管内浮遊細胞と類似していた。これらの細胞株が浮遊培養系で spheroid 形成した後に PP1 あるいは bosutinib で Src のキナーゼ活性を阻害するとアポトーシスが誘導され (図 4)、生細胞数が顕著に減少した (図 5)。以上の結果は脈管内で胞巣を形成しながら生存する肺腺癌細胞の治療薬として Src 阻害薬が有効であることを示唆していると考えられる。

図 3. p-Src を発現するリンパ管内に浮遊した肺腺癌細胞

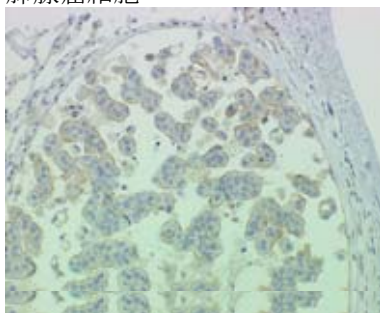


図 4. Src/Abl 阻害薬 bosutinib では肺腺癌細胞株 HCC827 にアポトーシスが誘導されたが、Abl 阻害薬 imatinib では細胞に影響は見られなかった

HCC827

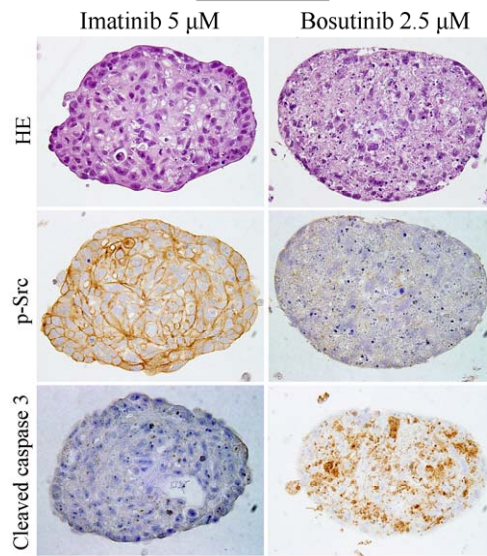
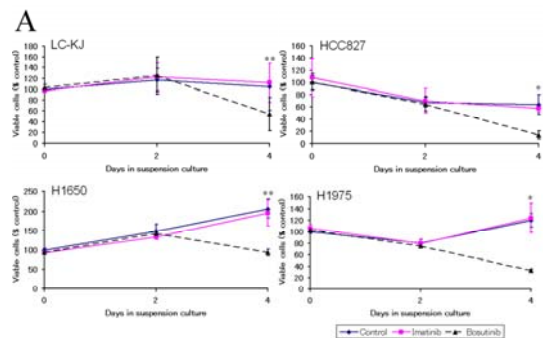


図 5. Src/Abl 阻害薬 bosutinib では 4 種類の肺腺癌細胞株の生細胞数が顕著に減少したが、Abl 阻害薬 imatinib では生細胞数に影響は見られなかった



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) (査読あり)

- 1) Sakuma Y, Takeuchi T, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Nakayama H, Ohgane N, Yokose T, Kameda Y, Tsuchiya E, Miyagi Y. Lung adenocarcinoma cells floating in lymphatic vessels resist anoikis by expressing phosphorylated Src. *J Pathol* 2010; **220**: 574-585.
- 2) Sakuma Y, Okamoto N, Saito H, Yamada K, Yokose T, Kiyoshima M, Asato Y, Amemiya R, Saitoh H, Matsukuma S, Yoshihara M, Nakamura Y, Oshita F, Ito H, Nakayama H, Kameda Y, Tsuchiya E, Miyagi Y. A logistic regression predictive model and the outcome of patients with resected lung adenocarcinoma of 2cm or

less in size. *Lung Cancer* 2009; **65**: 85-90.

〔学会発表〕（計2件）

- 1) Sakuma Y, Takeuchi T, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Yokose T, Kameda Y, Tsuchiya E, Miyagi Y. Lung adenocarcinoma cells floating in lymphatic vessels resist anoikis by expressing Src. (第68回日本癌学会総会、2009年10月1日-3日 横浜・パシフィコ横浜)
- 2) 佐久間 裕司、中村 圭靖、亀田 陽一、横瀬 智之、土屋 永寿、宮城 洋平：予後不良の小型肺腺癌の特徴を明らかにするための研究(第97回日本病理学会総会、2008年5月15日-17日 金沢・石川県立音楽堂)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 裕司 (SAKUMA YUJI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・がん分子病態研究部門・主査

研究者番号：10364514