

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592065

研究課題名(和文) TrkB / BDNF 経路を標的とした肺神経内分泌腫瘍に対する治療法開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic strategy for large cell neuroendocrine carcinoma targeting TrkB/BDNF signaling pathway

研究代表者

中村 勝也 (Nakamura, Katsuya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60585743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)およびその受容体Tropomyosin-related kinase B (TrkB)は原発性肺癌の中でも大細胞神経内分泌癌(LCNEC)の切除標本に強く発現していた。また切除標本におけるTrkB及びBDNFの高発現と、進行した病期、高い術後再発率及び低い生存率との間に有意な相関が認められた。さらにIn vitroの解析で、TrkB/BDNFシグナル経路はLCNECにおいて、足場非依存性増殖、腫瘍形成能、及びMMP-2、MMP-9発現を介した浸潤能に關与した。従ってTrkB/BDNFシグナル経路はLCNECに対する新たな治療標的及び予後予測因子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：There were significantly higher Tropomyosin-related kinase B (TrkB) and Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expressions in large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) specimen than those in any other histological types. Furthermore higher expressions of TrkB and BDNF in resected specimen significantly correlated with advanced stage, postoperative recurrence, and poor overall survival. In vitro experiment, TrkB/BDNF signaling contributed to the invasiveness through MMP-2 and MMP-9 expressions. In addition, TrkB/BDNF signaling was involved in anchor-independent growth and tumorigenesis. These results suggest that TrkB/BDNF signaling may be a potential therapeutic target and a prognostic factor for LCNEC.

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：TrkB BDNF 大細胞神経内分泌肺癌 肺神経内分泌腫瘍 分子標的治療 浸潤能 腫瘍形成能 コロニ-形成能

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は、本邦における死亡率一位の癌腫で、今後さらに増加すると予想される。肺癌は薬剤治療抵抗性の癌腫の一つであり、肺神経内分泌 (NE) 腫瘍 (小細胞肺癌および大細胞肺癌の一部) は、特に治療に抵抗性で、他の肺癌に比べ標準的治療法が未だ確立されていない (治療法開発が必要)。さらに、肺 NE 腫瘍は発育が急速であり、多くの症例が発見時に既に手術不能の状態にある (早期発見が困難)。その原因の一つに、生検材料や喀痰などのような微小组織材料を用いての NE 腫瘍の診断が困難な点がある (早期診断法確立の必要性)。すなわち、肺癌の予後改善のためには、悪性度の高い肺 NE 腫瘍の早期診断法および新たな治療標的分子の探索が急務である。

### 2. 研究の目的

我々は、これまで脳由来神経栄養因子 (BDNF) / その受容体 TROPOMYOSIN-RELATED KINASE B (TrkB) 経路の生物学的意義を解析してきた。その中で癌の治療標的となる可能性を得た。したがって、本研究の目的は、TrkB/BDNF 経路 (神経栄養因子ファミリーに属するチロシンキナーゼレセプター経路) が、悪性度の高い肺神経内分泌 (NE) 腫瘍に対する 1) 診断補助因子、2) 予後予測因子、および 3) 治療標的分子となり得るかを検証することである。

### 3. 研究の方法

主目的は「TrkB/BDNF 経路を標的とした肺 NE 腫瘍に対する診断および治療法を開発する」ことである。目的達成は、次の三段階である。

(1) TrkB/BDNF 経路の診断・予後予測への応用を検証するための、肺 NE 組織における NT ファミリー分子発現プロファイルを作成する。

(2) TrkB/BDNF 経路の治療標的としての可能性を検証するための、NE 腫瘍細胞株を用いて、TrkB/BDNF 経路の細胞生物学的意義を解析する。

(3) 臨床応用の可能性を高めるため免疫不全マウス移植系における包括的治療法としての検証を行う。

### 4. 研究成果

(1) 小細胞癌 8 例、大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) 11 例、大細胞癌 10 例、腺癌 20 例、扁平上皮癌 55 例の計 104 症例での免疫組織学的解析 (図 1) を行った。次に TrkB 高発現群と低発現群に分け、その予後解析を行い、その結果、TrkB 高発現群で有意に生存率が低いことが分かった (図 2)。LCNEC はすべて TrkB 高発現であった。また全組織型における解析では TrkB 高発現群は有意に病期分類で進行例が多く、術後再発率が高い結果であった。

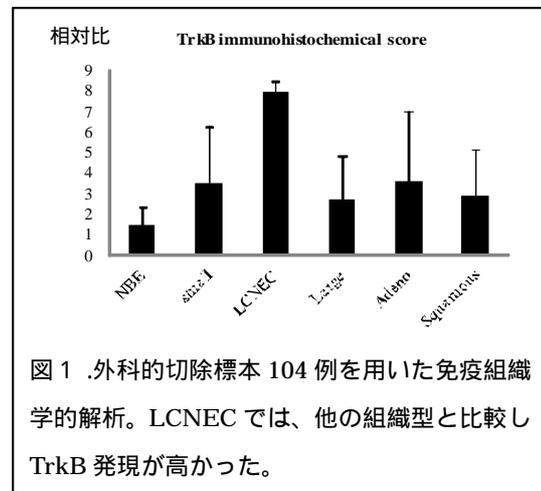


図 1 .外科的切除標本 104 例を用いた免疫組織学的解析。LCNEC では、他の組織型と比較し TrkB 発現が高かった。

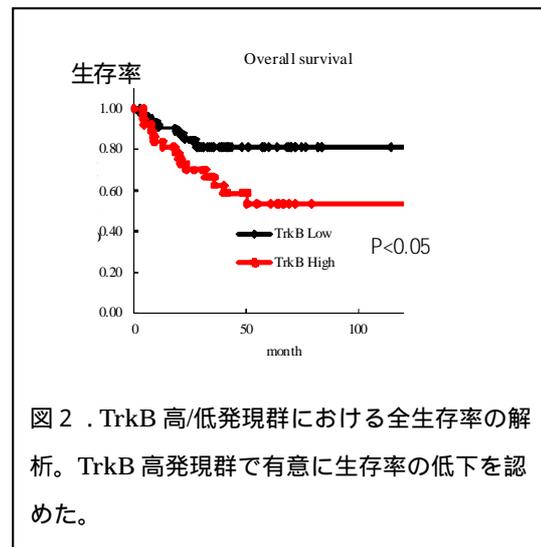


図 2 . TrkB 高/低発現群における全生存率の解析。TrkB 高発現群で有意に生存率の低下を認めた。

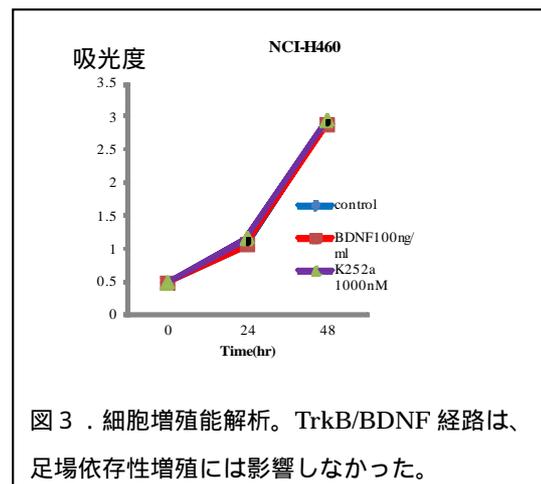


図 3 . 細胞増殖能解析。TrkB/BDNF 経路は、足場依存性増殖には影響しなかった。

(2) TrkB 陽性肺 NE 細胞株 (NCI-H460, NCI-H810) を標的細胞とした検討では、TrkB/BDNF 経路が、足場依存性細胞増殖 (図 3) には影響を及ぼさないが、細胞浸潤 (Matrigel invasion assay) (図 4) に大きく関与していることを siRNA を用いて検証

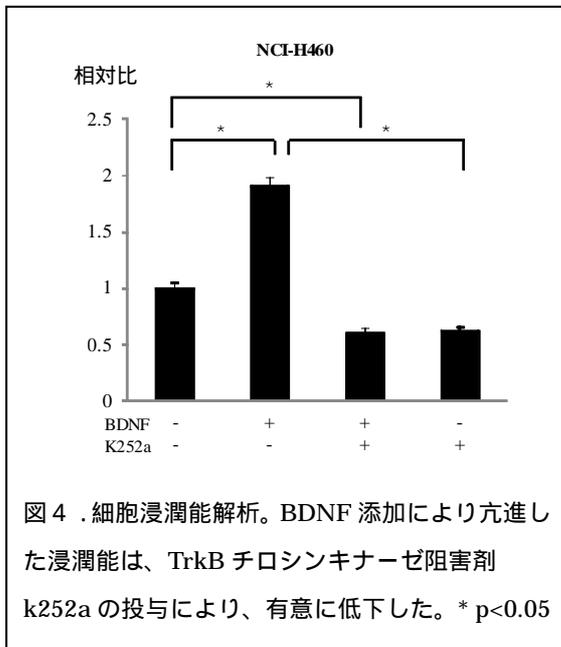


図4 . 細胞浸潤能解析。BDNF 添加により亢進した浸潤能は、TrkB チロシンキナーゼ阻害剤 k252a の投与により、有意に低下した。\* p<0.05

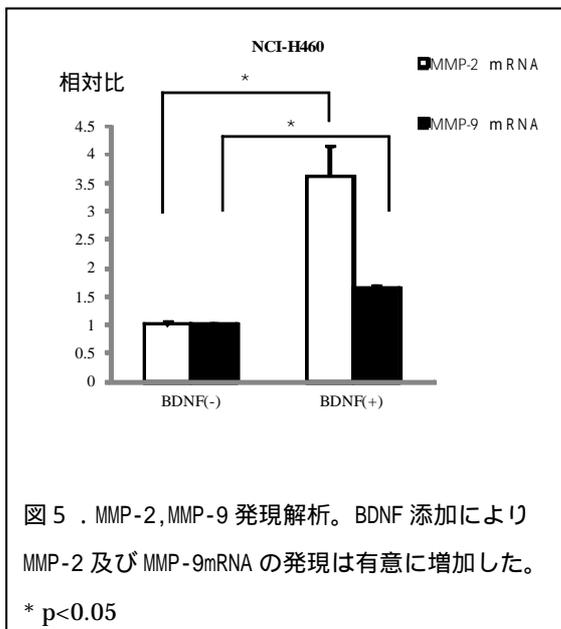


図5 . MMP-2, MMP-9 発現解析。BDNF 添加により MMP-2 及び MMP-9 mRNA の発現は有意に増加した。\* p<0.05

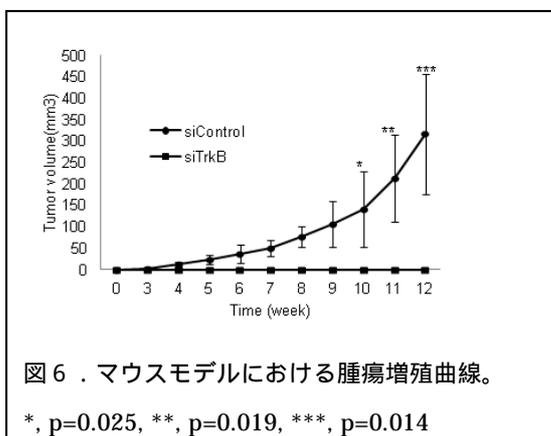


図6 . マウスモデルにおける腫瘍増殖曲線。  
\*, p=0.025, \*\*, p=0.019, \*\*\*, p=0.014

した。また、その浸潤能に MMP-2, MMP-9 が関与していることも検証し得た (図5)。また TrkB 陽性肺 NE 細胞株 (NCI-H460, NCI-H810) 両細胞株における足場非依存性増殖は

TrkB/BDNF 経路の活性化により有意に亢進し、経路抑制により有意に低下した。

(3) マウス移植モデルにおいて、移植細胞の TrkB 発現抑制により有意な腫瘍形成能の低下 (図6, 7) を認めた。

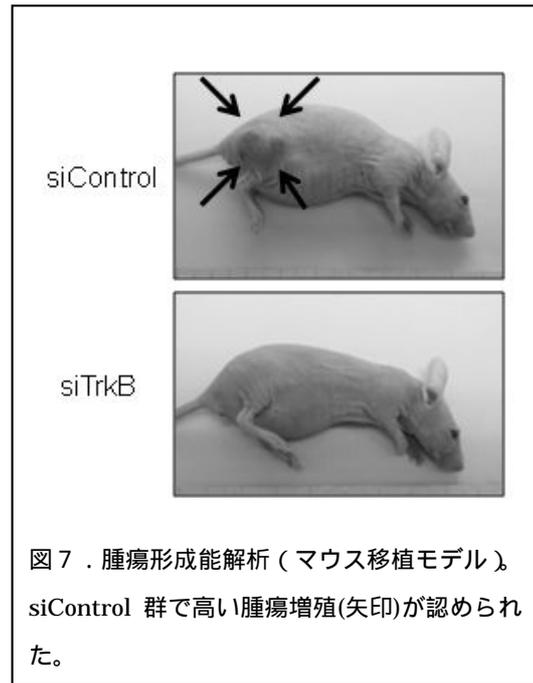


図7 . 腫瘍形成能解析 (マウス移植モデル)。siControl 群で高い腫瘍増殖 (矢印) が認められた。

#### 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2件)

Odate S, Onishi H, Nakamura K, Kojima M, Uchiyama A, Kato M, Katano M, Tropomyosine related kinase B inhibitor has potential for tumor regression and relapse prevention in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma, Anticancer Res, 査読有, 33(9), 2013, 3699-3703.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24023298>

Odate S, Nakamura K, Onishi H, Kojima M, Uchiyama A, Nakano K, Kato M, Tanaka M, Katano M, TrkB/BDNF signaling pathway is a potential therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma, Lung Cancer, 査読有, 79(3), 2013, 205-214.

Doi: 10.1016/j.lungcan.2012.12.004.

[学会発表] (計8件)

尾立 西市, TrkB/BDNF シグナル経路の肺大細胞神経内分泌癌治療標的としての可能性、2013年4月11日、第113

回日本外科学会定期学術集会、マリンメッセ福岡（福岡市）

尾立 西市、TrkB/BDNF シグナルは肺大細胞神経内分泌癌の治療標的となり得る、2013年2月3日、第5回福岡県医学会総会、福岡県医師会館（福岡市）

尾立 西市、神経栄養因子受容体 TrkB は肺大細胞神経内分泌癌の治療標的となり得る、第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2012年12月13日、倉敷市芸文館（倉敷市）

尾立 西市、Tropomyosin-related kinase B is a therapeutic target and prognostic factor for aggressive lung cancer including LCNEC、ESMO2012、2012年9月30日、Vienna（Austria）

尾立 西市、神経栄養因子受容体 TrkB は高悪性度肺癌の治療標的となり得る、第49回九州外科学会、2012年5月18日、マリトピア（佐賀市）

尾立 西市、高悪性度肺癌に対する神経栄養因子受容体 TrkB の治療標的としての可能性、2012年4月14日、第112回日本外科学会定期学術集会、幕張メッセ（千葉市）

尾立 西市、神経栄養因子受容体 TrkB は原発性肺癌の診断/治療標的となり得る、第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2011年12月1日、ダイワロイネットホテル和歌山（和歌山市）

尾立 西市、神経栄養因子受容体 TrkB は原発性肺癌の予後予測因子となり得る、第49回日本癌治療学会学術集会、2011年10月27日、名古屋国際会議場（名古屋市）

〔その他〕

ホームページ等  
九州大学大学院医学研究院 先端医療医学  
部門 腫瘍制御学  
<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 勝也（NAKAMURA, Katsuya）  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：60585743

### (2) 研究分担者

片野 光男（KATANO, Mitsuo）

九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：10145203

大西 秀哉（ONISHI, Hideya）  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：30553276

中野 賢二（NAKANO, Kenji）  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ  
研究拠点・教授  
研究者番号：00315061