

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590421

研究課題名(和文) 分子異常に基づいた肺腺がんの分類と浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文) Pathological classification and progression mechanism of the lung adenocarcinoma based on molecular analyses

研究代表者

大橋 健一(Ohashi, Kenichi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40231203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：気道上皮細胞に変異型KRAS遺伝子、EGFR遺伝子を導入すると、共通してサイトカイン、ケモカイン遺伝子の高発現が誘導される。IL-1 β について検討すると、肺がん細胞株と肺がん組織において高発現が認められ、遺伝子導入によって細胞増殖速度の上昇が起きた。肺腺がん組織では、高悪性度病変において高い発現が認められ、肺がんのプログレッション、がん細胞の悪性化に關与するものと考えられた。

特発性間質性肺炎に合併する肺がんは高齢者、男性、重喫煙者に好発していた。合併腺がんでは高円柱状細胞亜型が多く、EGFR変異の頻度は低かった。また全生存期間、無再発生存期間についてI期の腺がんでは予後不良であった。

研究成果の概要(英文)：By mutated KRAS and EGFR genes transfection, several kinds of cytokine and chemokine genes were elevated in bronchial cells. As for IL-1 β , its expression was increased in several cell lines and tissues of lung carcinomas, and the speed of proliferation was elevated by transfection. In the lung adenocarcinoma tissues, its expression was especially elevated in the high grade histological types. Expression of IL-1 β is probably associated with progression and grading of lung adenocarcinomas.

In idiopathic interstitial pneumonias(IIPs) patients, the incidence of lung carcinoma was high, and it was related to aging, male sexuality and heavy smoking habit. Pathologically, the frequency of high columnar cell subtype was high, and the frequency of EGFR gene mutation was low. As for overall survival and disease free survival, the prognosis of lung adenocarcinoma in stage I in IIPs patients was poorer than non-IIPs patients.

研究分野：病理学

キーワード：病理学 がん 肺がん 腺がん 間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の分類はがんの細胞学的、組織学的特徴に基づいた病理学的所見によって行われている(組織型)。各組織型に特有な生物学的特性があり、腫瘍の転移、患者の予後、治療効果などと相関があれば、分類は有意義であるが、そのような完全な分類を形態のみに基づいて作成することは困難である。近年、腫瘍の有する遺伝子異常、発現する分子の違いによって腫瘍を亜分類する試みが進められており、その結果新しい分子標的薬の開発、分子レベルの特徴に合わせた治療法の選択が試みられつつある。

肺がんは日本人がん死の 20%異常を占める致死率の高いものである。一次予防として喫煙対策は進んでいるが、喫煙と必ずしも関係のない腺がんの比率は増加している。日本人肺がんの中で最も多い組織型である腺がんは腫瘍組織の構築、増殖様式の違いによりさらに腺房型、乳頭型、充実型、細気管支肺胞上皮型、混合型などに亜分類されている。一方、分子レベルの異常については EGFR、KRAS 遺伝子の変異、EML4/ALK キメラ遺伝子などについて研究が進み、それぞれの遺伝子異常を有した肺がんの特徴が明らかにされ、分子標的薬の開発が進められている。一般に EGFR 遺伝子に変異を有するものは非喫煙者、女性の細気管支肺胞上皮型に多く、予後は比較的良好であり、KRAS 変異を有するものには粘液腺がんが多く、予後は不良とされている。

これまで申請者が所属する研究室では、肺がんを材料としてがん細胞の有する形態異常(異型性)を引き起こす分子基盤について研究をしてきた。変異型 KRAS 遺伝子がヒト気道上皮細胞に著しい形態変化(細胞異型)を誘導することを明らかにし、遺伝子マイクロアレイを用いた KRAS 下流分子の網羅的な検索から形態異常、悪性化に関わる複数の候補分子を抽出し、それらの働きを明らかにしてきた。KRAS 変異を有している肺がんの予後は不良であるが、さらにその中に増殖活性が高い群が存在し、予後が特に悪いことを明らかにした。また、EGFR 遺伝子変異群は予後が比較的良好なものが多いとされているが、我々の preliminary な解析ではその中にも KRAS 変異群と同様に予後が不良な一群が存在していることがわかり、EGFR 変異群では KRAS 変異群と共通した、あるいは異なった下流分子群が高発現されている可能性があり、KRAS 変異群と同様に高悪性度群を明らかにし、その増殖、浸潤・転移などに関与する分子機構を明らかにする必要がある。

肺がんは予後不良な疾患であるが、その中でも、特に特発性間質性肺炎(IIPs)に合併した肺がんは、合併していないものに比べて予後不良とされている。また、IIPsを基礎疾患に持つ患者は、肺がんの合併率も高いと報告されている。例えば、特発性肺線維(IPF)

患者で、5年経過観察中に15.4%、10年経過観察中に54.7%の発生率がある。しかし、未だにIIPsを合併した肺がんの研究は少なく、その病理学的特性、その分子レベルの発症メカニズムは十分な解明されておらず、K-RAS, EGFR 遺伝子の異常、それらの下流分子の関与は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺癌の発生・進展の分子基盤の一端を明確にすることである。

(1) KRAS, EGFR 遺伝子を不死化気道上皮細胞へと導入し、強制発現による mRNA 発現変化をマイクロアレイを用いて下流分子の網羅的検索を行う。発現変化の変動が著しかった分子の中には複数のケモカインやサイトカインが含まれていたが、サイトカインについては炎症、免疫反応の調節ばかりでなく、がんの発生、浸潤、転移にも関係していることが近年報告されている。本研究では特に IL-1 に着目してヒト肺がんにおける発現を検証した。

(2) 特発性間質性肺炎(IIPs)に合併する肺がんの特性を解明するため、原発性肺がんの手術症例を対象とし、IIPsを合併した肺がん症例とIIPsを合併していない肺がん症例を臨床・病理学的、分子病理学的に比較検討し、予後不良な特殊な肺がんにおける分子メカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 肺がんにおける IL-1 の発現

KRAS 遺伝子(G12V)とEGFR遺伝子(L858R, Del19)を不死化気道上皮細胞へと導入し、強制発現による mRNA 発現変化をマイクロアレイを用いて下流分子の網羅的検索を行った。空ベクターや正常 KRAS 遺伝子、正常 EGFR 遺伝子を導入したものと発現を比較し、肺がんの発生・進展に関与すると考えられる分子種を同定した。これらの分子は細胞増殖を促進するものばかりでなく抑制するものも含まれており、促進因子の過剰発現や抑制因子の低下が発がん過程の進展に関与すると考えられた。これらの因子の中にはサイトカインやケモカインなど炎症に関連する因子も複数含まれており、EGFR と KRAS の共通の下流経路を構成する重要な因子であると予想された。

肺がん細胞株 HOP62 の mRNA を逆転写し作製した cDNA を鋳型に PCR 法によって IL-1 の遺伝子配列をクローニングした。その後制限酵素処理を行い、pQCXIP Retroviral Vector(Clontech)に組み込んで IL-1 発現ベクターを作製した。不死化気道上皮細胞にウイルスベクターを感染させ IL-1 発現細胞を作製した。

KRAS, EGFR 遺伝子を不死化細胞に導入したものである IL-1 の mRNA 発現変化、IL-1 タンパク質の発現変化を定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法により検証

した。

種々の代表的肺がん細胞株における IL-1 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法により検証した。

IL-1 導入細胞の細胞増殖曲線を作成し、軟寒天内でのコロニーフォーメーションアッセイにより、導入細胞の増殖能の変化を検証した。

原発肺がん切除生材料、72 例から RNA を抽出した後、逆転写反応を行い、cDNA を腫瘍部と非腫瘍部それぞれ作製した。そして IL-1 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法によって解析し、それぞれの症例の臨床病理学的情報と照らし合わせて比較解析を行った。

(2) 特発性間質性肺炎 (IIPs) に合併した肺がんの特性

1994 年 4 月から 2013 年 4 月に神奈川県立循環器呼吸器病センターで手術を施行した原発性肺がん 1169 例 (1240 病変) を対象とし、IIPs 合併肺がん 205 例 (224 病変) (IP 群、with IIPs) と IIPs を合併していない肺がん 964 例 (1016 病変) (non-IP 群、without IIPs) の 2 群にわけた。IP 群と non-IP 群間での臨床・病理所見を比較検討した。特発性間質性肺炎の診断は、ATS/ERS/JRS/ALAT 2011 に従い、組織学的に再検討を行った。KRAS および EGFR mutation 検索は、主に PCR Direct Sequencing 法を用いて行った。DNA の抽出は凍結検体または FFPE を使用した。

4. 研究成果

(1) 肺がんにおける IL-1 の発現

変異 KRAS 遺伝子を導入して 10 倍以上発現が上昇した遺伝子数は 22、変異 EGFR 遺伝子を導入して 10 倍以上発現が上昇した遺伝子数は 33 であった。どちらにおいても 10 倍以上の発現上昇が見られたものは全部で 5 つ存在し、IL-1、IL-24、CCL3、MMP-1、MMP-3 であった。3 つはケモカインやサイトカインに関連したものであった。

Gene-chip マイクロアレイによる KRAS、EGFR の下流分子の網羅的検索から得られた結果を裏付けるために、KRAS、EGFR の各変異遺伝子を導入した NHBE-T 細胞の cDNA を用いて定量的 PCR 法による IL-1 の発現解析を行った。EGFR がん遺伝子、KRAS がん遺伝子いずれの変異遺伝子を導入した細胞において、野生型や空ベクターを導入したものに比べて高い発現が見られた。KRAS、EGFR の各変異型遺伝子を NHBE-T に導入した細胞抽出液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、IL-1 の発現上昇が確認できた。

様々な培養細胞株 (肺がんおよび非がん細胞株) の cDNA を用いて定量的 PCR 法による IL-1 の発現確認を行った。8 種類の肺がん細胞株において非腫瘍細胞に比べて著しい発現上昇が見られた。また一部の KRAS、EGFR 遺伝子変異がある細胞株において発現が高くなっていた。特に高い mRNA 発現の見られた細胞株においては、ウエスタンブロットに

よる解析でタンパク質レベルの発現を確認することが出来た。

IL-1 の発現ベクターを作製し、不死化気道上皮細胞 (NHBE-T) に導入して細胞増殖への効果を解析した。ウイルスベクターにより IL-1 を発現導入させた不死化気道上皮細胞においてウエスタンブロットの結果ではセンス (Sense) を導入したものにおいて IL-1 の顕著な発現が確認できた。細胞像について形態学的な変化は特に認めなかった。

細胞増殖を確認するため 30 日間継代培養し、集団倍加時間を求め、増殖曲線を作製した。IL-1 導入細胞において増殖速度は上昇していた。コロニーフォーメーションアッセイではコロニーの形成数の増加が認められた。軟寒天中でのコロニーフォーメーションアッセイにおいても IL-1 導入細胞ではコントロールに比べ多かった。

肺がんの切除材料による IL-1 の発現解析では、肺腺がん例において顕著な mRNA の発現上昇を示す症例を確認できた。特に、腺房型腺がん例 (Acinar subtype) や充実型腺がん例 (Solid subtype) では高いものが多く認められた。IL-1 の発現レベルと、組織型、組織亜型、がん遺伝子の変異型などの相関を解析した。統計学的な有意差は得られなかったものの、腺がん例において mRNA の発現レベルの高い傾向が見られ、特に、低分化腺がんや充実型腺がん (solid subtype)、腺房型腺がん (acinar subtype) で高い傾向が見られた。肺がん病変の進行度 (stage) やがん遺伝子型との相関を示す結果は得られなかった。

肺がん細胞株と原発性肺がん病変において、IL-1 の発現レベルの顕著な上昇を示すものが複数あり、また、IL-1 の発現導入によって非がん細胞株 (不死化気道上皮細胞) に細胞増殖速度の上昇、足場非依存的な増殖能といったがん形質の獲得が起きた。これらの結果から、IL-1 は、細胞のがん化に促進的に作用する因子であることが示唆された。また、原発性肺がん病変においては、特に腺房型腺がん (Acinar subtype) や充実型腺がん (Solid subtype)、低分化腺癌がんといった高悪性度の病変において高い発現が認められ、肺がんのプロGRESSIONに関連して、がん細胞の悪性化に寄与するものと考えられた。肺がん細胞株や肺がん病変において IL-1 の発現レベルとがん遺伝子型 (KRAS 変異、EGFR 変異) との強い相関はなく、IL-1 が KRAS、EGFR の下流において共通のがん化経路活性化に関与しているとの考えを支持するものであった。

(2) 特発性間質性肺炎 (IIPs) に合併した肺がんの特性

IIPs を合併した IP 群における肺がんの発生は non-IP 群と比較して高齢者 (70.0:67.1, $p < 0.0001$)、男性 (91.7%:62.1%, $p < 0.0001$)、喫煙者 (85.9%:66.4%, $p < 0.0001$) に有意に高

く、Brinkman Index も有意に高かった (1031:649, $p < 0.0001$)。Kaplan-Meier 法により全生存率 OS、無再発生存率 DFS を両群で比較するとでは IP 群、特に腺がん例で有意に低かった。腺がん例において、平均観察期間は OS で 2216:3843 日、 $p < 0.0001$, DFS において 2061:3308 日、 $p < 0.0232$ であった。IP 群では扁平上皮がんの比率が有意に高かった (39.7%:22.2%, $p < 0.0001$)。肺腺がんについて組織亜型については両者に有意な相違は認められなかったが、細胞亜型については高円柱状細胞亜型 (31.7:10.0%, $p < 0.0001$)、気管支表面上皮型 (50.5:25.4%, $p < 0.0001$) の出現頻度が有意に高かった。IP 群では TTF-1 陽性率が有意に低かった (64.3:85.2%, $p < 0.0001$)。IP 群で EGFR mutation を有する頻度が有意に低かった (15.5:40.8%, $p < 0.0001$) が、KRAS mutation を有する頻度については両群間で相違はなかった (7.7 : 8/6%)。

IIPs と肺がん発生には性別と喫煙が強く関わっていることは、過去の報告と矛盾しなかった。IIPs に合併する肺がんは扁平上皮がんの比率が高かったのは、喫煙との関連が考えられる。IIPs 合併する肺腺がんについては特徴的な細胞亜型を呈し、TTF-1 陽性率が有意に低く、中枢気道上皮細胞の由来の可能性が考えられた。IIPs 合併肺腺がんは単に喫煙による影響のみではなく、IIPs 合併特有の分子異常を背景に発生している可能性が考えられる。EGFR・KRAS mutation の割合がともに低く、IP 群では特徴的な oncogene mutation type をもつ可能性が考えられるが、重要な下流分子の発現についてさらに検証する必要がある。

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 12 件)

Okudela K, Suzuki T, Umeda S, Tateishi Y, Mitsui H, Miyagi Y, Ohashi K. A comprehensive search for microRNAs with expression profiles modulated by oncogenic KRAS: Potential involvement of miR-31 in lung carcinogenesis. *Oncol Rep*. 査読有 32, 2014, 1374-1384.

Okudela K, Tateishi Y, Umeda S, Mitsui H, Suzuki T, Saito Y, Woo T, Tajiri M, Masuda M, Miyagi Y, Ohashi K. Allelic imbalance in the miR-31 host gene locus in lung cancer--its potential role in carcinogenesis. *PLoS One*. 査読有 9, 2014, e100581,doi: 10.1371/journal.pone.0100581. eCollection 2014 .

Okudela K, Katayama A, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tateishi Y, Umeda S, Tajiri M, Masuda M, Nagahara N, Kitamura H, Ohashi K. Proteome analysis for

downstream targets of oncogenic KRAS--the potential participation of CLIC4 in carcinogenesis in the lung. *PLoS One*. 査読有 9, 2014, e87193 doi: 10.1371/journal.pone.0087193. eCollection 2014.

Okudela K, Umeda S, Otara M, Honda E, Ohmori T, Tajari M, Kameda Y, Ohashi K. A case of pulmonary hamartoma with distinctive histopathological features: adiscussion of its differential diagnosis and histogenesis. *Pathol Int*. 査読有 64, 2014, 618-623.

Okudela K: An association between nuclear morphology and immunohistochemical expression of p53 and p16INK4A in lung cancer cells. *Medical molecular morphology*, 査読有 47, 2014, 130-136.

Sekine A, Satoh H, Iwasawa T, Tamura K, Hayashihara K, Saito T, Kato T, Arai M, Okudela K, Ohashi K, Ogura T. Prognostic factors for brain metastases from non-small cell lung cancer with EGFR mutation: influence of stable extracranial disease and erlotinib therapy. *Med Oncol*. 査読有 31, 2014, 228, doi: 10.1007/s12032-014-0228-9. Epub 2014 Sep 11.

Okudela K, Mitsui H, Suzuki T, Woo T, Tateishi Y, Umeda S, Saito Y, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K: Expression of HDAC9 in lung cancer--potential role in lung carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*, 査読有 7, 2013, 213-220.

Tateishi Y, Furuya M, Kondo F, Torii I, Nojiri K, Tanaka Y, Umeda S, Okudela K, Inayama Y, Endo I and Ohashi K. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha inactivated hepatocellular adenomas in patient with congenital absence of the portal vein: a case report. *Pathol Int*, 査読有 63, 2013, 358-363.

Okudela K, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tajiri M, Sakuma Y, Miyagi Y, Tateishi Y, Umeda S, Masuda M and Ohashi K. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas--its clinicopathologic and biological significance. *Int J Clin Exp Pathol*, 査読有 6, 2013, 1-12.

Okudela K, Mitsui H, Suzuki T, Woo T, Tateishi Y, Umeda S, Saito Y, Tajiri M, Masuda M and Ohashi K. Expression of HDAC9 in lung cancer - potential role in lung carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 査読有, 7, 2013, 213-220.

Nishii T, Tanabe M, Tanaka R, Matsuzawa T, Okudela K, Nozawa A, Nakatani Y and Furuya M. Unique

mutation, accelerated mTOR signaling and angiogenesis in the pulmonary cysts of Birt-Hogg-Dube syndrome. *Pathol Int* 査読有, 63, 2013, 45-55.

Arai H, Okudela K, Oshiro H, Komitsu N, Mitsui H, Nishii T, Tsuboi M, Nozawa A, Noishiki Y, Ohashi K, Inui K and Masuda M. Elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide (EMAST) in non-small cell lung cancers--a potential determinant of susceptibility to multiple malignancies. *Int J Clin Exp Pathol* 査読有, 6, 2013, 395-410.

〔学会発表〕(計 14 件)

小島 陽子, 奥寺 康司, 梅田 茂明, 立石 陽子, 田尻 道彦, 小倉 高志, 益田 宗孝, 大橋 健一. 特発性間質性肺炎を合併した原発性肺癌の検討. 肺癌学会学術集会 2014 年 11 月 14 日 京都国際会議場(京都府京都市)

Okudela K, Suzuki T, Umeda S, Tateishi Y, Mitsui H, Miyagi Y, Ohashi K. A comprehensive search for microRNAs, the expressions of which were modulated by oncogenic KRAS - the potential involvement of miR-31 in lung carcinogenesis - 第 73 回 日本がん学会総会 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yoko Tateishi, Koji Okudela, Hideaki Mitsui, Shigeaki Umeda, Yoko Kojima, Kazuteru Watanabe, Naomi Kawano, Yoshiaki Inayama, Kenichi Ohashi. Expression of oncogenic modulator miR-31 and miR-21 are up-regulated in early CRC. 第 73 回日本癌学会総会 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Shigeaki Umeda, Kohji Okudela, Yoko Tateishi, Yoko Kojima, Kenichi Ohashi. Expression of IL24 in lung adenocarcinoma. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

奥寺康司, 片山 映, 永原 則之, 鈴木 健久, 三井 秀昭, 梅田 茂明, 立石 陽子, 禹 哲漢, 小島 陽子, 大橋 健一: Proteome analysis for downstream targets of KRAS - CLIC4 in lung carcinogenesis. 第 103 回 日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日 広島国際会議場(広島県広島市)

小島 陽子, 奥寺康司, 鈴木 健久, 三井 秀昭, 梅田 茂明, 立石 陽子, 禹 哲漢, 小島 陽子, 大森 隆広, 田尻 道彦, 小倉 高志, 益田 宗孝, 大橋 健一: 間質性肺炎に合併した肺癌の検討 第 103 回 日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日 広島国際会議場(広島県広島市)

立石 陽子, 奥寺康司, 三井 秀昭, 梅田 茂明, 河野 尚美, 大橋 健一: 早期大腸癌手術症例における microRNA 発現と悪性度の関連 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日 広島国際会議場(広島県広島市)

梅田 茂明, 齋藤 悠一, 奥寺 康司, 立石 陽子, 三井 秀昭, 小島 陽子, 鈴木 健久, 松村 舞依, 大橋 健一: 肺腺癌における IL-24 の臨床病理学的解析. 日本病理学会会 2014 年 4 月 24 日 広島国際会議場(広島県広島市)

齋藤 悠一, 奥寺 康司, 梅田 茂明, 鈴木 健久, 立石 陽子, 三井 秀昭, 小島 陽子, 大橋 健一: 肺癌の進行・悪性化における IL-1 の意義. 日本病理学会 2014 年 4 月 24 日 広島国際会議場(広島県広島市)

Yoko Tateishi, Koji Okudela, Hideaki Mitsui, Shigeaki Umeda, Yoko Kojima, Kazuteru Watanabe, Naomi Kawano, Kenichi Ohashi: The potential role of microRNA-31 in submucosal invasive colorectal cancer. 日本学会総会 2013 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

奥寺康司, 立石 陽子, 梅田 茂明, 禹 哲漢, 田尻 道彦, 大橋 健一: 肺発がんにおける miR-31 の役割. 日本癌学会総会 2013 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

奥寺 康司, 立石 陽子, 梅田 茂明, 三井 秀昭, 鈴木 健久, 禹 哲漢, 田尻 道彦, 大橋 健一: 肺癌の発生・進展における KRAS-miR-31 経路の意義. 日本病理学会 2013 年 6 月 6 日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

立石 陽子, 奥寺康司, 梅田 茂明, 三井 秀昭, 鈴木 健久, 河野 尚美, 大橋 健一: 早期大腸癌における microRNA-31 発現の検討. 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6 日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

梅田 茂明, 奥寺 康司, 立石 陽子, 三井 秀昭, 鈴木 健久, 大橋 健一: 変異型 EGFR 遺伝子の導入によって誘導される下流遺伝子の分子基盤について. 日本病理学会 2013 年 6 月 6 日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pathola/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 健一(OHASHI, Kenichi)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 40231203

(2) 研究分担者

奥寺 康司(OKUDELA, Koji)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号: 10326027