

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590427

研究課題名(和文) 微小乳頭成分を有する肺腺癌の高い脈管侵襲・転移能に寄与する因子の解明

研究課題名(英文) Exploration of factors conferring increased malignancy on lung adenocarcinoma with micropapillary component

研究代表者

蒋 世旭 (Jiang, Shi-Xu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：70276153

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)：629症例の肺腺癌から101例(16.1%)のMPC腺癌が確認された。臨床病理学的検討では、non-MPC群に比べ、MPC群の脈管侵襲、リンパ節転移、術後病理病期、全生存期間と無再発生存期間が有意に悪く、MPC腺癌は独立した一つの高悪性度の臨床病理学的疾患単位であった。二次元電気泳動によるプロテオーム解析と免疫組織染色による半定量的検討では、non-MPC群よりMPC群におけるvimentinの発現が有意に高かった。また、MPC群のみにおいても、多変量解析でvimentinの高発現が予後不良因子であった。Vimentin高発現は、MPCのより低分化な性格ないし脱分化を反映している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lung adenocarcinoma with micropapillary component (AC-MPC) is more malignant than conventional adenocarcinoma (CAC). On proteomics based on 2-DE, vimentin was 3.5-fold up-regulated in AC-MPC. Immunostaining in 101 AC-MPC and 119 CAC revealed that vimentin was expressed in 95 MPC and the expression scores were higher than those of well- and moderately differentiated CAC ($P<0.0001$), but not different from those of poorly differentiated CAC ($P=0.561$). Even within the AC-MPC entity, higher vimentin expression was correlated with more frequent vascular invasion and node metastasis ($P<0.02$), and multivariate analysis showed that high vimentin expression was an independent indicator of adverse prognosis ($P<0.0053$). In conclusion, vimentin expression is prevalent and up-regulated in MPC, which might reflect the biological essence of poorer differentiation or dedifferentiation, and have a role in the acquisition and increase of invasiveness and consequent more malignant nature of MPC.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 微小乳頭腺癌 vimentin 予後因子 LCM DNAマイクロアレイ発現解析

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界的に年々増加しており、現在、本邦では肺癌が男性癌死の第1位、女性癌死の第2位を占める。肺癌は非小細胞癌と小細胞癌に大別され、そのうち非小細胞肺癌の一つの亜型である腺癌の増加は最も顕著であり、我が国では肺癌全体の約50%、特に女性肺癌の約70%を占める。肺腺癌は局所的な進展が比較的緩慢である一方、リンパ管侵襲・リンパ節転移を来しやすく、それが患者予後を大いに左右する。近年、肺癌や乳癌に於いては微小乳頭成分 (micropapillary component, MPC) を含有する腫瘍が高度のリンパ管侵襲・転移を起こすため予後が有意に悪く、MPCは予後不良の一つの形態学的指標であり、MPCを含有する肺腺癌は独立した一つの臨床病理学的疾患単位であると報告されている。しかし、他の組織亜型の肺腺癌に比べ、MPCの特異的なタンパク質・遺伝子発現は解明されておらず、MPCの高い脈管侵襲・転移能を規定する因子は未だに不明である。

2. 研究の目的

MPCの脈管侵襲・転移能に寄与する因子の同定を中心とした肺腺癌の生物学的特性の解明が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 外科病理材料を利用した retrospective 臨床病理学的研究。外科切除された肺癌の HE 染色標本をレビューし、MPCを有する症例を選び出す。純粋な MPC からなる腺癌が極めて少なく、殆どの症例には MPC が種々の割合で他の組織亜型の成分と混在していることから、MPCの有無、その割合と腫瘍脈管侵襲及びリンパ節転移と患者予後との関連をより詳しく分析し、MPCを含む肺癌の臨床病理学的特徴を検討する。

(2) 網羅的プロテオーム解析による MPC の特異的タンパク質の同定。MPCを含有すると含有しない肺腺癌の末固定腫瘍組織からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法にてそれぞれのタンパク質発現のプロファイルを比較検討する。定量的解析ソフトを用いて、発現量に2倍以上の差のあるものを選別する。最終的に質量分析装置 (MALDI-TOF/TOF MS) と MASCOT human data base を用いて MPC の特異的タンパク質を同定する。

(3) 網羅的プロテオーム解析にて同定した MPC の特異的タンパク質の in vivo 発現と、その臨床病理学的意義を検討する。

(4) Laser capture microdissection に基づいた DNA マイクロアレイによる MPC 成分の遺伝子発現の解析

(5) MPC 細胞株の樹立

4. 研究成果

(1) Retrospective 臨床病理学的研究で、外科切除された約1,100症例の肺癌をレビューした。他の組織型や不完全切除の症例を除いて、629症例の腺癌を対象とした。629症例の腺癌のうち101(16.1%)症例はその腫瘍成分の1%以上が MPC であり、これらの症例を AC-MPC (adenocarcinoma with MPC) とし、残りの528症例は通常型腺癌 (conventional adenocarcinoma, CAC) と診断した。CAC に比べ、Table 1 と Figure 1 で示しているように、AC-MPC 群の脈管侵襲、リンパ節転移、術後病理病期、全生存期間と無再発生存期間が有意に悪く、MPC 腺癌は独立した一つの高悪性度の臨床病理学的疾患単位であることを再確認した。

Table 1 The clinicopathological characteristics of the adenocarcinomas with micropapillary component, the conventional adenocarcinomas and the randomly selected control conventional adenocarcinomas

Characteristics	AC-MPC (n = 101)	CAC (n = 528)	control CAC (n = 119)	P-value
Age (years)				
<60	35 (34.7%)	100 (20.7%)	42 (35.3%)	0.0147*
≥60	66 (65.3%)	77 (64.7%)	0.0002**	
Gender				
Male	56 (55.4%)	286 (50.4%)	67 (56.3%)	0.359†
Female	45 (44.6%)	282 (49.6%)	52 (43.7%)	0.1415**
Smoking status				
Non-smoker	43 (42.6%)	253 (47.9%)	54 (45.4%)	0.315†
Smoker	58 (57.4%)	275 (52.1%)	65 (54.6%)	0.413**
Tumor size (cm)				
≤3.0	47 (46.5%)	363 (68.7%)	78 (63.9%)	<0.0001*
>3.0	54 (53.5%)	165 (31.3%)	43 (36.1%)	0.214**
Pleural invasion				
p0	46 (45.5%)	385 (72.9%)	83 (69.6%)	<0.0001*
p1-3	55 (54.5%)	143 (27.1%)	36 (30.2%)	0.3592**
Node metastasis				
Negative	37 (36.6%)	449 (85.0%)	90 (75.6%)	<0.0001*
Positive	64 (63.4%)	79 (15.0%)	29 (24.4%)	0.0023**
Vascular invasion				
Negative	13 (12.9%)	294 (55.7%)	61 (51.2%)	<0.0001*
Positive	88 (87.1%)	234 (44.3%)	58 (48.7%)	0.271**
Pathological stage				
Stage I	33 (32.7%)	404 (76.5%)	79 (66.4%)	<0.0001*
Stage II, III	68 (67.3%)	124 (23.5%)	40 (33.6%)	0.004**

AC-MPC, adenocarcinoma with micropapillary component; CAC, conventional adenocarcinoma.
*AC-MPC vs. CAC, **CAC vs. control CAC.

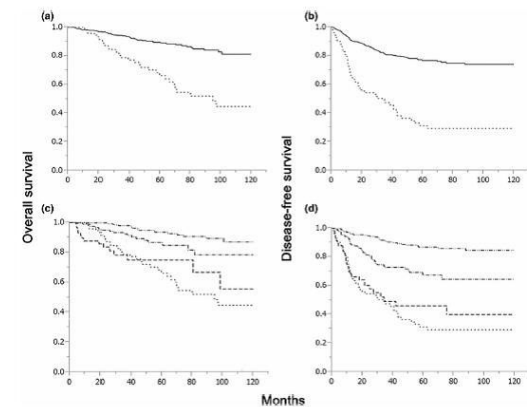


Figure 1 Kaplan-Meier survival curves and log-rank tests for the 101 AC-MPC and 528 CAC. (a) Overall survival and (b) disease-free survival. (c) Comparison of overall survival and (d) disease-free survival between AC-MPC and CAC, which were sub-grouped according to differentiation grade. Abbreviations: WD, MD, and PD stand for well-, moderately and poorly differentiated, respectively. (a, b) — CAC, n = 528, P < 0.0001; --- AC-MPC, n = 101, P < 0.0001; (c) --- AC-MPC, n = 101; - - - WD-CAC, n = 315; AC-MPC vs WD-CAC, P < 0.0001; --- MD-CAC, n = 156; AC-MPC vs MD-CAC, P < 0.0002; --- PD-CAC, n = 57; AC-MPC vs PD-CAC, P < 0.5289. (d) --- AC-MPC, n = 101; --- WD-CAC, n = 315; AC-MPC vs WD-CAC, P < 0.0001; --- MD-CAC, n = 156; AC-MPC vs MD-CAC, P < 0.0001; --- PD-CAC, n = 57; AC-MPC vs PD-CAC, P = 0.3992.

(2) 組織学的に MPC が確認された AC-MPC と MPC を有しない CAC の凍結生組織を用い、二次元電気泳動法にてそれぞれのタンパク質発現を比較検討した。CAC に比べ、AC-MPC において高発現するタンパク質の一つは vimentin であることが同定された。

(3) 免疫組織染色による半定量的検討では、CAC 群より AC-MPC 群における vimentin の発現が有意に高かった。また、AC-MPC 群のみにおいても、多変量解析で vimentin の高発現が予後不良因子であった。Vimentin 高発現は、MPC のより低分化な性格ないし脱分化を反映している可能性がある。

(4) ホルマリン固定・パラフィン包埋した同一腫瘍から MPC と non-MPC をそれぞれ microdissection し、cDNA マイクロアレイによる MPC において特異的に高発現あるいは低発現・欠失する遺伝子の同定を行った。MPC と non-MPC の間に発現比率 2 倍以上に変動した遺伝子が千個以上検出され、両者の遺伝子発現プロファイルの違いが示唆された。しかし、microdissection した組織から抽出した微量 RNA の前増幅が不可欠であるため、これから展開する MPC の高悪性度に寄与する因子の選別には慎重な分析が必要である。

(5) MPC 肺癌患者の胸水から一つの細胞株の樹立に成功し、その生物学的特性の詳細は現在検討中である。

引用文献

Nakashima H, Jiang SX, Sato Y, Hoshi K, Matsumoto T, Nagashio R, Kobayashi M, Matsuo Y, Shiomi K, Hayakawa K, Saegusa M, Satoh Y. Prevalent and up-regulated vimentin expression in micropapillary components of lung adenocarcinomas and its adverse prognostic significance. *Pathol. Int.* 65(4):183-192, 2015.

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 9 件)

Nakashima H, Jiang SX, Sato Y, Hoshi K, Matsumoto T, Nagashio R, Kobayashi M, Matsuo Y, Shiomi K, Hayakawa K, Saegusa M, Satoh Y. Prevalent and up-regulated vimentin expression in micropapillary components of lung adenocarcinomas and its adverse prognostic significance. *Pathol Int.* 査読あり、Vol.65, No.4, 2015, pp.183-192, DOI: 10.1111/pin.1225

Nagashio R, Ueda J, Ryuge S, Nakashima H, Jiang SX, Kobayashi M, Yanagita K, Katono K, Satoh Y, Masuda N, Murakumo Y, Hachimura K, Sato Y. Diagnostic and prognostic significances of MUC5B and TTF-1 expressions in resected non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 査読あり、Vol.5, 2015, 8649, DOI: 10.1038/srep08649.

Ken Katono, Yuichi Sato, Shi-Xu Jiang, Makoto Kobayashi, Ryo Nagashio, Shinichiro Ryuge, Eriko Fukuda, Naoki Goshima, Yukitoshi Satoh, Makoto Saegusa, Noriyuki Masuda. Prognostic Significance of MYH9 Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer.

PLoS ONE. 査読あり、Vol.10, No.3, 2015, e0121460,

DOI:10.1371/journal.pone.0121460,

Kobayashi M, Nagashio R, Ryuge S, Murakami Y, Yanagita K, Nakashima H, Matsumoto T, Jiang SX, Saegusa M, Satoh Y, Masuda N, Sato Y. Acquisition of useful sero-diagnostic autoantibodies using the same patients' sera and tumor tissues. *Biomed Res.* 査読あり、Vol.35, No.2, 2014, pp.133-43,

DOI: doi.org/10.2220/biomedres.35.133

Ryuge S, Sato Y, Jiang SX, Wang G, Kobayashi M, Nagashio R, Katono K, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N. The clinicopathological significance of Lgr5 expression in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 査読あり、Vol.82, No.1, 2013, pp.143-148

DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.06.010

Xu CJ, Mikami T, Nakamura T, Tsuruta T, Nakada N, Yanagisawa N, Jiang SX, Okayasu I. Tumor budding, myofibroblast proliferation, and fibrosis in obstructing colon carcinoma: the roles of Hsp47 and basic fibroblast growth factor. *Pathol Res Pract.* 査読あり、Vol.209, No.2, 2013, pp.69-74,

DOI: 10.1016/j.prp.2012.10.008

Ryuge S, Sato Y, Jiang SX, Wang G, Matsumoto T, Katono K, Inoue H, Iyoda A, Satoh Y, Yoshimura H, Masuda N. Prognostic impact of nestin expression in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 査読あり、Vol.77, No.2, 2012, pp.415-420, DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.03.025

Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, Yanagita K, Nagashio R, Kawakami Y, Goshima N, Jiang SX, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y. CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer. *PLoS One.* 査読あり、vol.7, No.3, 2012, e33952

DOI:10.1371/journal.pone.0033952

Matsumoto T, Ryuge S, Kobayashi M, Kageyama T, Hattori M, Goshima N, Jiang SX, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y. Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Int J Oncol.* 査読あり、vol.40, 2012, pp.1957-1962,

DOI:10.3892/ijo.2012.1405

[学会発表](計 4 件)

蒋世旭、中島裕康、梅沢敦子、長塩亮、佐藤雄一、一戸昌明、早川和重、佐

藤之俊、村雲芳樹。Gene expressions in micropapillary component of lung cancer by microdissection-based DNA microarray. 第 104 回日本病理学会総会、2015/04/30, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

中島 裕康, 蔣 世旭, 林 祥子, 石井 大, 山崎 宏継, 内藤 雅仁, 三窪 将史, 小川 史洋, 塩見 和, 佐藤 雄一, 三枝 信, 佐藤 之俊。微乳頭成分を有する肺腺癌におけるタンパク発現の解析および臨床病理学的意義の検討第 103 回日本病理学会総会、2014/04/24, 広島国際会議場 (広島県広島市)

Hiroyasu Nakashima, Shi-Xu Jiang, Atsuko Umezawa, Kazu Shiomi, Yuichi Sato, Makoto Saegusa, Yukitoshi Satoh: A clinicopathological and proteomic analysis of pulmonary adenocarcinoma with micropapillary component. 第 73 回日本癌学会総会, 2014/09, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Hiroyasu Nakashima, Shi-Xu Jiang, Masahito Naito, Fumihiko Ogawa, Yoshio Matsui, Kazu Shiomi, Akira Iyoda, Makoto Saegusa, Yukitoshi Satoh. A clinicopathological analysis of pulmonary adenocarcinoma with micropapillary component. ASCVTS (Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery) 2013, 2013/04/06, Kobe. (Japan)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蔣 世旭 (JIANG Shi-Xu)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号 : 7 0 2 7 6 1 5 3

(2)研究分担者

長塩 亮 (NAGASHIO Ryo)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号 : 4 0 6 1 8 5 6 8