

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：24791464
研究課題名(和文) 原発性肺癌における肺組織幹細胞関連遺伝子の発現解析

研究課題名(英文) Lung primary

研究代表者

波呂 祥(Haro, Akira)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：90546558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肺癌切除標本を用い、肺幹細胞関連遺伝子の役割を調べた。(1)Sox9、CD133、Id2、N-myc、FoxA1のmRNAの発現は、癌部において発現が高かった。(2)Id2遺伝子のタンパク発現は、小細胞肺癌には発現せず(0/6)、肺腺癌の52%(12/23)、扁平上皮癌の14%(2/14)に発現していた。予後には有意差を認めなかった。Id2発現は、肺腺癌症例、高分化症例、pT1症例とに有意な相関を認めた。またCD133のタンパク発現は臨床病理学的因子との相関は認めなかったが、予後解析により予後不良因子と判明、再発および予後に密接な役割を担っていることが予想された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of lung stem cell genes in primary lung carcinoma using human primary lung carcinoma tissues.

(1) We showed that mRNA expression of Sox9, N-myc, FoxA1, CD133 and Id2 in lung carcinoma tissues was higher than in normal lung tissues. (2) We showed that protein of Id2 gene was expressed in 52% of lung adenocarcinoma (12/23 cases), in 14% of lung squamous cell carcinomas (2/14 cases). There was no protein expression of Id2 gene in small cell lung carcinoma (0/6). Id2 gene was not a significant prognosis factor. The protein had a significant associations to adenocarcinoma histology, well differentiated histology and pT1 stage. Furthermore, expression of CD133 gene had no associations to clinicopathological factors. However, CD133 gene was a poor prognostic factor in 5-years overall survival and 5-years disease free survival. These results insist that CD133 gene should have an important role in recurrence and metastasis of human primary lung carcinoma.

研究分野：呼吸器外科

科研費の分科・細目：肺癌

キーワード：原発性非小細胞肺癌 肺組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、原発性肺癌は、我が国において癌関連死亡の第一位となっている。治療として、外科的治療に加え、化学療法や放射線治療を含めた集学的治療が行われているが、治療後に転移および再発を来すことが多く、その死亡率は高いのが現状である。特に再発に関しては、最近までに国内外での、抗がん剤の耐性などの研究により胃癌、大腸癌、肝癌などの各種癌に共通する癌幹細胞の概念が提唱され、肺癌においても癌幹細胞の存在が確認されている。原発性肺癌においては、CD133、c-kitなどの癌幹細胞のマーカーと薬剤耐性に関する報告がされている。

肺幹細胞関連遺伝子として、胎生期の pseudoglanular 期の肺胞上皮に同定された肺幹細胞には発現する Id2、Sox9、N-myc などの遺伝子が報告されている。最近では、肺組織幹細胞に発現する Id2、Sox9 などの肺幹細胞関連遺伝子が原発性肺癌、特に肺腺癌に発現することが報告されており、肺幹細胞関連遺伝子が、肺癌幹細胞においても実際にその幹細胞の発現・維持に関与し、再発、薬剤耐性に非常に密接に関与することが予想される。また扁平上皮癌においても、気道上皮においても、気道障害後の修復の際に発現する K5 遺伝子の発現が報告され、今後肺幹細胞関連遺伝子の関与について検討する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、実際に当科にて切除された原発性肺癌の切除標本を用いて、原発性肺癌の新規治療法を開発することを目的として、肺幹細胞関連遺伝子の役割およびその新たな標的遺伝子およびそのシグナル経路の特定し、原発性肺癌の治療に応用することを目的とする。これまで当研究室は、以下の研究業績に示すように原発性肺癌の上皮間葉転換機構 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) に関する研究に取り組み、最近では EMT 関連遺伝子である Brachyury 遺伝子の解析でリンパ節転移などを介して予後が不良となることを解明した。今後さらに、再発に関与すると考えられる肺組織幹細胞関連遺伝子に着目し、肺癌組織標本における発現を解析し、それらの遺伝子が癌幹細胞の特性維持にどのような遺伝子が関与しているかを明らかにする予定である。

3. 研究の方法

【1】 原発性肺癌切除標本における肺組織幹細胞関連遺伝子の発現 mRNA およびタンパク質を RT-PCR 法および免疫組織化学染色法にて評価

【2】 肺組織幹細胞関連遺伝子の発現 (mRNA およびタンパク) と予後および臨床病理学的因子の解析を行う。

【3】 肺組織幹細胞関連遺伝子と、原発性肺癌においてこれまで報告されている予後規定因子 (Ki67, bc12, VEGF, p53 などのタンパク) との関連性を検討する。

4. 研究成果

【1】 mRNA の発現

まず、原発性肺癌外科的切除症例 40 症例において、 β -catenin をコントロール遺伝子とし、Sox9、CD133、Id2、N-myc、FoxA1 の mRNA の発現を調べた。

1. Sox9: 正常肺組織では 0.60 ± 0.05 、癌組織では 0.23 ± 0.44 。癌部が有意に ($p=0.009$) 発現していた。

2. CD133: 正常肺組織では 0.15 ± 0.28 、癌組織では 0.69 ± 1.54 。癌部が有意に ($p=0.0183$) 発現していた。

3. Id2: 正常肺組織では 1.75 ± 0.17 、癌組織では 1.10 ± 1.14 。正常肺組織が有意に ($p=0.0146$) 発現していた。

4. FoxA1: 正常肺組織では 0.06 ± 0.01 、癌組織では 0.14 ± 0.11 。癌部が有意に ($p<0.0001$) を発現していた。

5. N-myc: 正常肺組織では 0.01 ± 0.01 、癌組織では 0.04 ± 0.08 。癌部が有意に ($p=0.0109$) 発現していた。

以上の結果より、mRNA の発現に関して、RT-PCR 法にて、発現を調べ、上記に如く、Sox9、N-myc、FoxA1、CD133 の遺伝子は、癌部において、非癌部 (正常部) より mRNA の発現が高いことが示した。

【2】 タンパクの発現

(1) 原発性肺癌症例における Id2 遺伝子のタンパクの発現

特に肺幹細胞関連遺伝子である Id2 遺伝子のタンパク発現に関して、原発性肺癌切除症例 44 症例の組織検体を用いて、免疫組織化学染色により Id2 遺伝子のタンパクの発現を調べた。Id2 遺伝子タンパクは、小細胞肺癌には発現せず (0/6)、肺腺癌の 52% (12/23)、扁平上皮癌の 14% (2/14) に発現していた。しかしながら、免疫組織化学染色法を用いた、Id2 遺伝子の発現の有無による予後解析においては、Id2 発現陽性症例は、Id2 発現陰性症例と比較して、5 年全生存率が有意差を認めないものの ($p=0.4085$, $p=0.1354$)、5 年無再発生存率が高い傾向にあった。またサブセット解析において、Id2 発現陽性の症例は、肺腺癌症例、分化度が高い分化である症例、pT1 症例との間に有意な相関を認めた。これらの結果は、肺組織幹細胞関連遺伝子である Id2 遺伝子は、肺癌細胞においても、その幹細胞特有の役割を残しているものと考えられた。

(2) 原発性肺癌症例における CD133 遺伝子のタンパクの発現

次に我々は、Id2 遺伝子に引き続き、原発性肺癌切除症例において、CD133 のタンパク発現に関して、免疫組織化学染色法を用いて、検討した。

CD133 に関しては、これまで肺癌組織において十分に検討されておらず、我々は、マウスの腎臓の近位尿細管をポジティブコントロールとして用いて、免疫組織化学染色法にお

ける条件検討を行った。
臨床病理学的因子(年齢、性別、組織型、分化度、pT stage、pN stage、pM stage)との相関性に関して検討を行ったが、CD133 とに相関性を示す臨床病理学的因子との相関は認めなかった。しかしながら、CD133 タンパク発現症例は、非発現症例と比較して、5 年全生存率(p=0.0001)および 5 年無再発生存率(p=0.0378)において予後不良であり、CD133 遺伝子は、再発および予後に密接な役割を担っていることが予想された。

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 10 件)

How should synchronous multiple primary adenocarcinomas of the lung be resected?

Yasuda M, Nagashima A, Haro A, Saitoh G. *Ann Thorac Surg.* 2014 May;97(5):e151-3. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.02.057.

Local treatment of oligometastatic recurrence in patients with resected non-small cell lung cancer.

Yano T, Okamoto T, Haro A, Fukuyama S, Yoshida T, Kohno M, Maehara Y. *Lung Cancer.* 2013 Dec;82(3):431-5. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.08.006. Epub 2013 Sep 19.

Treatment of the postoperative recurrence of lung cancer in octogenarians. Yasuda M, Nagashima A, Haro A, Saitoh G. *Surg Today.* 2013 Sep 12. [Epub ahead of print]

Aspergilloma mimicking a lung cancer. Yasuda M, Nagashima A, Haro A, Saitoh G. *Int J Surg Case Rep.* 2013;4(8):690-2. doi: 10.1016/j.ijscr.2013.02.028. Epub 2013 Apr 18.

[Chest surgery in patients with pulmonary metastasis from head and neck cancer].

Yano T, Haro A, Fukuyama S, Okamoto T, Maehara Y. *Kyobu Geka.* 2013 Apr;66(4):266-70. Japanese.

Expression of Brachyury gene is a significant prognostic factor for primary lung carcinoma.

Haro A, Yano T, Kohno M, Yoshida T, Koga T, Okamoto T, Takenoyama M, Maehara Y. *Ann Surg Oncol.* 2013 Dec;20 Suppl 3:S509-16. doi: 10.1245/s10434-013-2914-9. Epub 2013 Mar 1.

Differences in the expression of epithelial-mesenchymal transition related molecules between primary tumors and pulmonary metastatic tumors in colorectal cancer.

Kouso H, Yano T, Maruyama R, Shikada Y, Okamoto T, Haro A, Kakeji Y, Maehara Y. *Surg Today.* 2013 Jan;43(1):73-80. doi: 10.1007/s00595-012-0344-0. Epub 2012 Oct 7.

Serum antioxidant capacity and oxidative injury to pulmonary DNA in never-smokers with primary lung cancer.

Ito K, Yano T, Morodomi Y, Yoshida T, Kohno M, Haro A, Shikada Y, Okamoto T, Maruyama R, Maehara Y. *Anticancer Res.* 2012 Mar;32(3):1063-7.

A unique method for repairing intraoperative pulmonary air leakage with both polyglycolic acid sheets and fibrin glue.

Yano T, Haro A, Shikada Y, Okamoto T, Maruyama R, Maehara Y. *World J Surg.* 2012 Feb;36(2):463-7. doi: 10.1007/s00268-011-1355-5.

Ground-glass opacity lesions on computed tomography during postoperative surveillance for primary non-small cell lung cancer.

Haro A, Yano T, Kohno M, Yoshida T, Okamoto T, Maehara Y. *Lung Cancer.* 2012 Apr;76(1):56-60. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.09.002. Epub 2011 Sep 25.

[学会発表](計 7 件)

第 112 回日本外科学会定期学術集会 (2012 年 4 月 12~14 日 幕張メッセ、ホテルニューオータニ幕張「原発性肺癌の浸潤および転移における Brachyury の役割」九州大学病院 消化器・総合外科 波呂 祥、矢野 篤次郎、河野 幹寛、吉田 月久、岡本 龍郎、前原 喜彦

第 45 回日本胸部外科学会九州地方総会 平成 24 年 7 月 21 日(土)・22 日(日)、ハウステンボス「定位照射後の再増大を認めた転移性肺腫瘍の一例」北九州市立医療センター 呼吸器外科 波呂 祥、安田 学、斉藤 元吉、永島 明

第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013 年 4 月 11 日(木)~13 日(土) 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 「原発性肺癌術後における術後呼吸器合併症」北九州市立医療センター 波呂 祥、安田

学、齊藤 元吉、永島 明

第 37 回日本外科系連合学会学術集会
2012 年 6 月 28 日 (木) ~29 日(金) 九州大
学医学部百年講堂・同窓会館
「術後再発に対する局所療法追加により
長期生存が得られた原発性肺癌 3 症例」
九州大学大学院 消化器・総合外科 波呂 祥

第 250 回福岡外科集談会
平成 25 年(2013 年)7 月 27 日(土) 福岡国際会
議場「診断から 4 年間の経過観察を行った肺
原発類上皮血管内皮腫の一例」
北九州市立医療センター 波呂 祥、北原
大和、齊藤 元吉、永島 明

第 54 回日本肺癌学会九州支部学術集会
2014 年 2 月 28 日(金)~3 月 1 日(土) ホルト
ホール大分「原発性肺癌術後にステープルラ
イン上の再発を疑った非結核性抗酸菌症の
一例」 発表：3 月 1 日
北九州市立医療センター 波呂 祥、齊藤
元吉、永島 明

第 114 回日本外科学会定期学術集会
2014 年 4 月 3 日(木)~5 日(土)
国立京都国際会館・グランドプリンスホテル
京都
「若年性肺癌症例の検討」
Surgical resection of non-small lung carcinomas
in young adults
北九州市立医療センター 波呂 祥、齊藤
元吉、永島 明

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波呂 祥 (Haro, Akira)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：9 0 5 4 6 5 5 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし