

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791481

研究課題名(和文) 肺大細胞神経内分泌癌におけるがん幹細胞の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analyses of cancer stem-like cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung

研究代表者

菱田 智之(HISHIDA, TOMOYUKI)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：40544664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：肺高悪性度神経内分泌癌(小細胞癌および大細胞神経内分泌癌)に対し、新たな治療開発を目標として、各種がん幹細胞マーカーの発現を解析した。小細胞癌、大細胞神経内分泌癌いずれにおいても様々ながん幹細胞マーカーの発現を種々の割合で認めた。各マーカーのうち、ALDH1の発現は予後と関連しており、ALDH1陽性の肺高悪性度神経内分泌癌は、陰性例と比較し、有意に予後不良であった。ALDH1陽性細胞は微小リンパ節転移巣でも認められ、肺高悪性度神経内分泌癌の転移、予後規定に関与している可能性が考えられた。ALDH1は肺高悪性度神経内分泌癌における治療標的分子となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression and clinical significance of cancer stem-like cells (CSLC) markers in high-grade neuroendocrine carcinoma (HGNEC) of the lung, comprising small cell lung carcinoma (SCLC) and large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) in order to develop new treatment strategy. The expression of putative CSLC markers were examined immunohistochemically by using resected tumor specimens. HGNEC of the lung had various range of positive expression of CSLC markers. Among explored CSLC markers, ALDH1 expression was related to patient outcomes. ALDH1-positive HGNEC had significantly poorer survival than those with ALDH1-negative HGNEC. Multivariate analysis also revealed positive ALDH1 expression as an independent unfavorable prognostic factors. ALDH1-positive tumor cells were frequently observed even in micro lymph node metastases. These induced that targeting for ALDH1-positive tumor cells might be a future treatment strategy in HGNEC of the lung.

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：肺高悪性度神経内分泌癌 がん幹細胞 小細胞癌 大細胞神経内分泌癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の中でも神経内分泌癌の予後は極めて不良である。その中でも小細胞癌の治療法はほぼ確立しているが、1999年よりWHO分類に導入された大細胞神経内分泌癌の治療法は未だ確定していない。大細胞神経内分泌癌は、組織分類では非小細胞肺癌の一つである大細胞癌の亜型に分類されているため、切除可能であれば初回治療は非小細胞肺癌の標準治療に準じて手術が行われる。しかしながら、完全切除後も約半数が再発を来し、病理病期I期であっても5年生存率は60%に満たず、腺癌など他の非小細胞肺癌と比べ予後は極めて不良である。大細胞神経内分泌癌の再発形式の約70%は遠隔転移であることから、治療成績改善のため術後補助化学療法の必要性が示唆されてきた。大細胞神経内分泌癌は小細胞肺癌と同様神経内分泌学的特徴を有することから、シスプラチン+エトポシド、シスプラチン+イリノテカンなど小細胞癌で使用されている化学療法が探索的に行われているが、有効性は未だ証明されていない。従って、大細胞神経内分泌癌の組織学的、細胞学的特徴に特化した新たな治療戦略の開発が急務とされている。

(2) 肺癌に限らず、がん細胞の生物学的性状は不均一であることが知られる。近年の研究によれば、癌は未分化ながん幹細胞を頂点とした種々の分化段階の細胞からなるヘテロな集団であることが示唆されている。がん幹細胞は、非がん幹細胞と異なり高い自己複製能、腫瘍形成能を有す。また、盛んな薬剤排出能も有することから、抗癌剤にも耐性であることも示され、悪性度の高い癌の再発原因細胞と認識されるに至っている。固形腫瘍では、既に乳癌や脳腫瘍、大腸癌において主ながん幹細胞マーカーを用いた方法によって、がん幹細胞の同定、機能解析が行われ、がん幹細胞を標的とした治療の開発が始まっている。肺癌におけるがん幹細胞の研究は近年漸く報告され始めた所であるが、ALDH、Podoplaninなどががん幹細胞マーカーの候補として注目されている。肺癌の中でも特に悪性度の高い大細胞神経内分泌癌は、がん幹細胞が腫瘍の進展・増殖の根幹を成していると考えられ、がん癌幹細胞を標的とした治療の開発が治療成績向上の鍵と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 完全切除後の再発が高頻度でまた、未だ有効な化学療法も確立していない肺大細胞神経内分泌癌に対し、がん幹細胞を標的とした新規治療法開発を目指すことを目的とした。

(2) 肺小細胞癌も大細胞神経内分泌癌と同様、神経内分泌的特徴を有し、大細胞神経内分泌癌とともに肺高悪性度神経内分泌癌と総称される。小細胞癌は、初回治療としてシスプラチン併用化学療法の有効性が確立しているが、80-90%は再発し、3年生存割合は局限

型小細胞癌で20-40%、進展型小細胞癌では10%に過ぎない。再発/増悪患者に対する二次化学療法の標準治療は確立しておらず、再発/増悪後の余命は3-6ヶ月程度とされる。従って、小細胞癌も大細胞神経内分泌癌と同様、新規治療開発が急務と考えられたため、当初の大細胞神経内分泌癌に限定した対象を肺高悪性度神経内分泌癌(小細胞癌+大細胞神経内分泌癌)に広げ、がん幹細胞を標的とした新規治療開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) 1993年から2011年までの間に、当院にて切除された肺高悪性度神経内分泌癌の病理検体105例(小細胞癌:60例、大細胞神経内分泌癌:45例)の組織切片を用い、各種がんのがん幹細胞マーカーされる分子の発現を、免疫組織染色を用いて検討した。評価は、過去の研究に習い、免疫染色スコアシステム(腫瘍最大断面切片での各種マーカー陽性細胞の割合×染色強度[弱:1, 強:2]で算出)にて評価し、スコア ≥ 10 を陽性とした。

(2) 癌の進展・増殖には癌細胞のみならず、それを取り巻く間質細胞の重要性が指摘されている。間質細胞を標的とした治療開発も、がん幹細胞を標的とした治療開発同様、今後検討されるべき新規治療戦略の一つと考えられた。これまでの研究から、癌間質に存在するPodoplanin陽性の間質細胞、CD204陽性の腫瘍関連マクロファージ(TAM)、Foxp3陽性の制御性T細胞が、癌の予後を規定している可能性が示唆されているため、今回、肺高悪性度神経内分泌癌の切除標本を用い、細胞特異的免疫染色法により、の発現と、予後との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 肺高悪性度神経内分泌癌におけるがん幹細胞マーカーの発現

外科切除検体を用い、肺高悪性度神経内分泌癌における各種がん幹細胞マーカー(Caveolin, Notch, CD44, CD166, SOX2, ALDH1, Musashi1 [MSI1]の7マーカーを検討)の発現を検討したところ、次頁図1のごとく、様々な割合で発現が認められた。検討した7つのマーカーの発現陽性割合は、小細胞癌と大細胞癌神経内分泌癌で概ね類似していたが、細胞膜糖タンパクの一つであるCD166、および転写因子と呼ばれる因子の一つであるSOX2に関しては、小細胞癌と大細胞神経内分泌癌との間で有意差を認めた。CD166陽性は小細胞癌で27%であったのに対し、大細胞神経内分泌癌では47%。SOX2陽性は小細胞癌で58%であったのに対し大細胞神経内分泌癌では31%であった。

小細胞癌および大細胞神経内分泌癌は、ともに肺高悪性度神経内分泌癌に分類されるものの、組織病理所見ならびに、生物学的に差違が認められる。今回検討したがん幹細胞

マーカーの発現の差違も、組織病理所見ならびに生物学的差違を反映したものであることが示唆された。

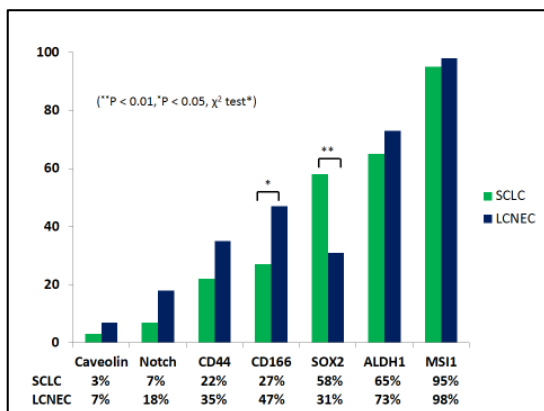


図 1: 肺高悪性度神経内分泌癌における各種がん幹細胞マーカーの発現 (SCLC: 小細胞癌, LCNEC: 大細胞神経内分泌癌)

(2) 各種がん細胞マーカーの発現と予後との関連の解析

各種がん幹細胞マーカー (Caveolin, Notch, CD44, CD166, SOX2, ALDH1, Musashi1 [MSI1]) の 7 マーカーを検討) と、切除後の予後 (無再発生存期間ならびに全生存期間を解析) を統計学的手法により解析した所、ALDH1 (小細胞癌の 65%、大細胞神経内分泌癌の 73%で陽性) 陽性の症例は、無再発生存、全生存とも有意に不良であることが判明した。

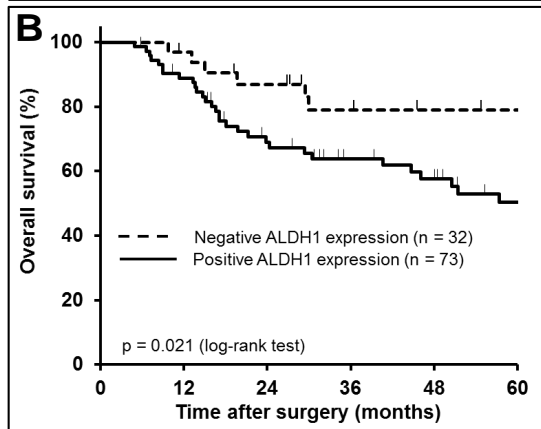
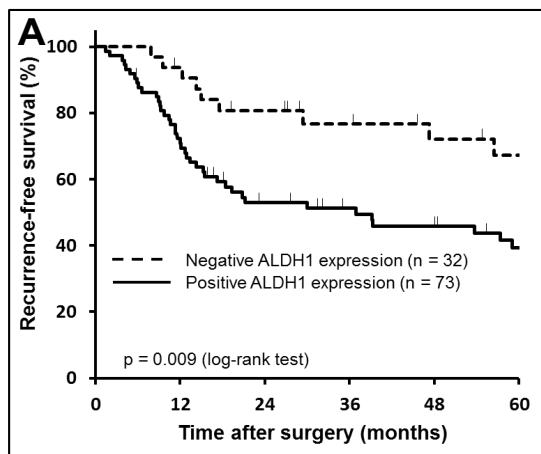


図 2: ALDH1 陰性症例 (点線) 陽性症例 (実線) での無再発生存 (A) ならびに全生存曲線 (B): ALDH1 陽性の肺高悪性度神経内分泌癌 (小細胞癌 + 大細胞神経内分泌癌) の無再発生存ならびに全生存は ALDH1 陰性症例に比べ有意に不良であった。

病理病期や、リンパ節転移の有無、微小血管浸潤・リンパ管侵襲の有無、胸膜浸潤の有無など、様々な予後因子との多変量解析であった。なお、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌に分けて解析した場合も同様の結果であった。本検討から、肺高悪性度神経内分泌癌 (小細胞癌 + 大細胞神経内分泌癌) の原発腫瘍における ALDH1 の陽性/陰性の情報は、統計学的に有意な予後因子であることが判明した。

なお、Caveolin, Notch, CD44, CD166, SOX2, Musashi1 [MSI1] の発現と予後 (無再発生存期間、全生存期間) との間に有意な関連は認められなかった。

また、ALDH1 陽性症例で、リンパ節転移が認められた症例 (31 例) を検討すると、原発巣が ALDH1 陽性であった症例では、リンパ節転移巣でも 86% で陽性であり、転移巣における、ALDH1 陽性/陰性状況は、原発巣の状況と統計学的に強く関連していた。微小リンパ節転移巣 (転移巣の大きさが <2mm) においても、同様の結果が認められ、ALDH1 陽性細胞は、腫瘍の転移・増殖に関与していることが示唆された。

(1-2) の結果から、肺高悪性度神経内分泌癌 (小細胞癌 + 大細胞神経内分泌癌) では、様々な割合で各種がん幹細胞マーカーの発現が認められることが明らかとなった。各種マーカーのうち、ALDH1 の発現は、多変量解析の結果、有意な予後不良因子であることが判明した。細胞実験レベルの段階であるが、ヒト頭頸部癌、乳癌、膀胱癌の細胞株にて、ALDH1 陽性腫瘍細胞の増殖が、特異抗体によって阻害されることが報告されている。今後、肺高悪性度神経内分泌癌 (小細胞癌 + 大細胞神経内分泌癌) の細胞株、新鮮切除標本を細胞を用いた、ALDH1 陽性細胞の詳細な機能解析ならびに、阻害実験等にて、更なる知見の獲得が期待され、ひいては難治癌である肺高悪性度神経内分泌癌に対する新規治療が開発されることが望まれる。

(3) 肺高悪性度神経内分泌癌における、間質細胞の免疫形質と予後との関連

CD204 陽性腫瘍関連マクロファージ (TAM) および、Foxp3-陽性制御性 T 細胞 (Treg) と予後との関連は認められなかったが、Podoplanin 陽性間質細胞を認める症例 (>50% 以上の間質細胞で Podoplanin が陽性の症例) は、陰性症例に比べ有意に予後が良好であった (5 年全生存割合: 陽性例 75%, 陰性例 45%)。なお、腫瘍本体における Podoplanin 発現と予後との関連は、陽性症例でやや予後が悪い傾向であったものの統計学的に有意

な差は認められなかった。

Podoplanin はがん幹細胞マーカーの候補の一つともされている。本検討から、腫瘍本体でのがん幹細胞マーカーの発現のみならず、癌を取り巻く間質におけるがん細胞マーカーの発現も予後規定に重要であることが示唆された。(1-2)で検討した、7つのがん幹細胞マーカーの間質細胞における発現、陽性間質細胞の機能解析、予後との関連解析が今後の課題と考えられた。

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4件)

1. Takahashi A, Ishii G, Kinoshita T, Yoshida T, Umemura S, Hishida T, Yoh K, Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Ohe Y, Nagai K, Ochiai A. Identification of prognostic immunophenotypic features in cancer stromal cells of high-grade neuroendocrine carcinomas of the lung. J Cancer Res Clin Oncol. 2013; 139:1869-78.
2. Hishida T, Yoshida J, Maeda R, Ishii G, Aokage K, Nishimura M, Nagai K. Prognostic impact of intratumoural microvascular invasion and microlymphatic permeation on node-negative non-small-cell lung cancer: which indicator is the stronger prognostic factor? Eur J Cardiothorac Surg. 2013; 43:772-7.
3. Hishida T, Yoshida J, Ishii G, Nagai K. Reply to Wang et al. Eur J Cardiothorac Surg. 2013; 43:1270.
4. Hishida T, Yoshida J, Ohe Y, Aokage K, Ishii G, Nagai K. Surgical outcomes after initial surgery for clinical single-station N2 non-small-cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol. 2014; 44:85-92.

[学会発表](計3件)

1. 三好智裕、菱田智之、石井源一郎、仁保誠治、荒牧直、松村勇輝、青景圭樹、吉田純司、大江裕一郎、永井完治：大細胞神経内分泌癌の予後因子 混合型大細胞神経内分泌癌を中心として 第54回日本肺癌学会総会(東京)11月、2013
2. Hishida T: Survival after bilateral lung resections of primary lung cancer with contralateral satellite nodules: should a small number of contralateral nodules be treated as M1a disease? 20th European Conference on General Thoracic Surgery (Essen, Germany). June, 2012.
3. Hishida T: Extended bronchoplasty for locally advanced lung cancer to avoid pneumonectomy. 21th European Conference on General Thoracic Surgery (Birmingham, UK). May, 2013.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

菱田智之(HISHIDA TOMOYUKI)

独立行政法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：40544664

(2)研究分担者

(3)連携研究者