

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460431

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌の化学療法感受性-癌特性と個人体質の組み合わせによる予測

研究課題名(英文) Chemoresistance of non-small cell lung cancer-Its prediction by combination of tumor characteristics and personal predisposition

研究代表者

後藤 明輝 (Goto, Akiteru)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90317090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌の術後化学療法感受性と関連する癌特性および個人体質を探索し、感受性予測システムを構築することを目指す研究である。癌特性に関しては肺腺癌の核グレードや、mir-451の発現低下が術後化学療法抵抗性因子であることが示された。個人体質に関しては、抗酸化作用や第二相解毒酵素の発現にかかわるKeap1-Nrf2系とmir-17-92クラスターの相互作用に影響を及ぼすマイクロRNAターゲット部位の遺伝子多型が術後化学療法感受性に関わる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To clarify the factors related to chemoresistance of non-small cell lung cancer (NSCLC), histopathological, molecular pathological, and gene polymorphism studies were performed. Histopathologically, high nuclear grade was correlated with resistance to adjuvant chemotherapy in lung adenocarcinoma. Molecular pathological analyses revealed lower expression of mir-451 was correlated to the resistance. We also analysed immunohistochemical expressions of Keap1 and Nrf2 proteins, which are involved in detoxification of chemotherapeutic reagents in lung adenocarcinoma. The immunohistochemical study confirmed inverse expressions of these proteins. As mir-17-92 cluster was hypothesized to target the Keap1/Nrf2 system, the genetic polymorphisms of target sequence were searched with the database for Keap1/Nrf2-related genes. The genotyping data of the cases are under correlation analyses between chemoresistance, status of Keap1/Nrf2 system, and expressions of mir-17-92 cluster in NSCLC.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 化学療法感受性 マイクロRNA 遺伝子多型

### 1. 研究開始当初の背景

早期発見例の増加や、分子標的治療法の開発に関わらず、非小細胞肺癌では第 1 期症例の手術後や手術不能例など、化学療法が導入されることが多い。こうした症例での化学療法の有効性そのものは大規模研究で確認されているが、なお個別症例の化学療法感受性には差があり、化学療法感受性の予測システムの確立が待たれる。とくに、EGFR や ALK 遺伝子異常など、分子標的治療の対象となる遺伝子異常を持たない症例では、喫緊の課題である。従来、癌の特性、あるいは個人の体質のどちらかに絞って非小細胞肺癌化学療法の感受性を予測する試みはなされているものの、いまだ実用に耐える高精度の予測システムは確立されていない。また、各因子の生物学的特性を考えたとき、マイクロ RNA が癌細胞のステムネスを介して化学療法抵抗性につながるなど、相互に関連を有する可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では癌の特性と個人の体質の双方を組み合わせることにより、高精度で実用に耐える非小細胞肺癌の化学療法感受性予測システムの構築をめざす。同時に化学療法抵抗性やステムネスの克服につながりうる治療標的としてのマイクロ RNA 同定を目指す。

### 3. 研究の方法

非小細胞肺癌症例のうち、術後化学療法施行例につき、病理組織学的評価、遺伝子型の評価、臨床病理学的評価を行う。次いで各症例の病理検体を用い、免疫組織化学によるステムネスの評価と半定量的 PCR を用いたマイクロ RNA の測定を施行する。続いて、各症例の DNA 修復および薬物動態関連の複数遺伝子につき、遺伝子多型を決定する。

#### 病理組織学的、免疫組織化学の評価

平成 16 年-25 年に秋田大学医学部附属病院で手術切除された非小細胞肺癌のうち、術後化学療法施行例を対象として病理組織学的再評価(特に腺癌では詳細組織パターンについて)臨床病理学的各因子や化学療法プロトコルの再確認、予後情報の更新を行う。

EGFR 遺伝子異常の有無については、また、対象例の EGFR 遺伝子異常の有無につき、検索する。各症例の病理組織標本の免疫組織化学での評価として、DNA 修復に関連する ERCC1 (excision repair cross complementary 1) が幹細胞マーカーとされる ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1), CD133, EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) につき検討を行った。

#### マイクロ RNA の検討

術後化学療法反応性に関わると考えられるマイクロ RNA を選定し、これらについて半定量的 PCR (TaqMan MicroRNA Assay: マイク

ロ RNA 測定の標準的方法である)によってその発現量を各症例の病理パラフィンブロックから測定した。

#### 個人体質に関する研究

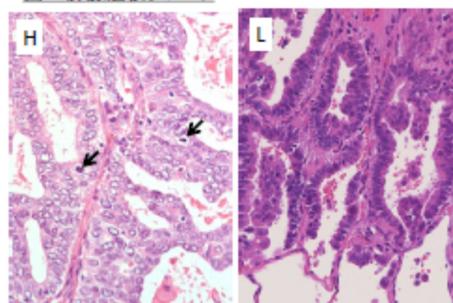
化学療法感受性、およびマイクロ RNA ターゲットと関連する遺伝子多型を検索する。今回の検討では、とくに抗酸化作用や第二相解毒酵素の発現にかかわる Keap1-Nrf2 系に着目した。ジェノタイプングの材料として、各手術検体の背景肺組織から抽出された DNA を用いた。

### 4. 研究成果

#### 病理組織学的、免疫組織化学の評価

病理組織学的因子のうち、肺腺癌については核グレードが術後化学療法反応性の予測因子であることが示された(図 1)。すなわち、検討した 138 例の IB, II, III 期術後化学療法施行肺腺癌症例のうち、高グレードの症例(41 例)では術後 5 年以内の再発、死亡が 24 例(58.5%)であるのに対し、低グレード症例(97 例)では 38 例(39.1%)であった( $p < 0.05$ , カイ 2 乗検定)

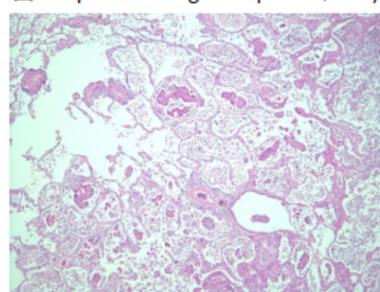
図1: 肺腺癌核グレード



高グレード例(H)では、多数(10高倍率視野で5個以上)の有糸分裂像を見る。低グレード例(L)では、有糸分裂像は少ない。

一方、近年着目される STAS (Spread through air space) については、STAS 陽性例(30 例)では術後 5 年以内の再発、死亡が 16 例(53.3%)であるのに対し、STAS 陰性例(108 例)では 46 例(42.5%)であり、統計学的に有意な差は認められなかった(図 2)。なお、核高グレードは腫瘍組織の壊死所見と、STAS 陽性は micro-papillary pattern の形成と、それぞれ有意な相関を認めた。

図2 Spread through air space (STAS)



腫瘍細胞が主腫瘍の範囲をこえて肺胞腔内にひろがっている。

免疫組織化学で検討した各因子については、ERCC1 は術後化学療法反応性との相関は見ら

れなかった。また、がん幹細胞マーカーとされる ALDH1, CD133 については既報の通り染色を行ったが、評価不能であった。検体の固定、保存状態の違いが影響を及ぼした可能性もある。一方、がん幹細胞マーカーとされる EpCAM については、評価可能であった。

術後化学療法を施行された非小細胞肺癌 183 例で、EpCAM 強発現例は 66 例にみとめられた (36.1%)。組織型 (腺癌 vs 扁平上皮癌) での差はなく、また、EpCAM 強発現例で予後不良傾向はあったが、統計学的に有意なものではなかった。さらに、肺腺癌で、EpCAM 発現と核グレード、STAS との相関を検討したが、有意な相関は見られなかった。

病理組織学的、免疫組織化学的評価という側面からは、肺腺癌核グレードを主体とし、それと相関する分子病理学的因子を探索していくことが術後化学療法反応性予測システムの開発につながると考えられる結果であった。

#### マイクロ RNA の検討

術後化学療法反応性に関わると考えられる 8 種のマイクロ RNA につき、検討を行った。そのうち、mir-451 の発現低下が術後化学療法抵抗性に関わると考えられる結果であった。Mir-451 は報告者の先行研究 (基盤研究 (C) 研究期間: 2010~2012 課題番号: 22590307 研究課題名 小型肺腺癌浸潤とマイクロ RNA - マイクロダイセクションをとりいれた研究) で肺腺癌の浸潤に関与するマイクロ RNA として同定されたマイクロ RNA の一つであり、この発現低下が肺腺癌の化学療法抵抗性に関与するとの既報もある (Chen D, et al. Eur J Cancer. 2014;50(17):3050-67)。

術後化学療法を施行した IB、II、III 期非小細胞肺癌 183 例で mir-451 の測定を行った。U6 を内部コントロールとし、Ct 値で評価すると腺癌は平均

-0.48、扁平上皮癌は-0.24 であり、組織型による有意な差はみられなかった。また、腺癌において *EGFR* 遺伝子変異の有無による差はみられない。一方、mir-451 発現上位 1/3 (61 例) と下位 2/3 (122 例) で比較したとき、上位 1/3 で術後 5 年以内の再発、死亡が 22 例 (36.0%) であるのに対し、下位 2/3 (122 例) では 66 例 (54.1%) である ( $p < 0.05$ , カイ 2 乗検定)。今回検討したマイクロ RNA には、従来非小細胞肺癌の予後とのかかわりが指摘されている mir-21, mir-34a など含まれるが、これらのマイクロ RNA 発現と術後化学療法感受性とのかかわりは明らかではなかった。II, III 期非小細胞肺癌の術後化学療法施行例に絞った今回の検討では、I 期非小細胞肺癌手術例を数多く含む従来の研究とは異なる、腫瘍の病期、治療に直結した予後予測マイクロ RNA を同定できたものと考えている。また、肺腺癌に関しては核グレードが高グレ

ードの症例 (平均 Ct = -0.68) では低グレードの症例 (平均 Ct = -1.31) よりも mir-451 発現が低値であった ( $P = 0.08$ , t 検定)。

#### 個人体質に関する研究

抗酸化作用や第二相解毒酵素の発現にかかわる Keap1-Nrf2 系に着目し、検討を行った。データベース検索: TarBase ver 7.0 を用い、Keap1-Nrf2 系の各因子 (Keap1, NRF2, NQO1, GSTP1, ABCC1) に抑制的に作用するマイクロ RNA 候補を同定し、PolymiRTS version 3.0 により、マイクロ RNA ターゲット部位の遺伝子多型の検索同定を行った。その結果、Keap1-Nrf2 系の各因子 (Keap1, NRF2, NQO1, GSTP1, ABCC1) をターゲットとするマイクロ RNA として、各種の癌での異常発現が多く報告される mir-17-92 クラスターが同定された。うち、mir-92b の Keap1 に対する、mir-92a の GSTP1 に対するターゲット部位にはそれぞれ遺伝子多型が存在し、相互作用に影響を与えている可能性が考えられた。

免疫組織化学的検討で、Keap1 高発現は 138 例中 82 例でみとめられ、Nrf2 発現との逆相関が認められた。また、Keap1 と mir-17, mir-92b, Nrf2 と mir-17, mir-92a の相関を検討したが、明らかな逆相関関係を確認することはできなかった。また、Keap1 ないし Nrf2 の発現と術後化学療法反応性との相関は明らかではなかった。現在、mir-17-92 クラスターターゲット部位の遺伝子多型を各症例につき取りまとめ中であり、その結果をもとに Keap1-Nrf2 系の発現、mir-17-92 クラスターの発現、mir-17-92 クラスターターゲット部位の遺伝子多型を統合的に解析し、非小細胞肺癌術後化学療法反応性とのかかわりを明らかにする予定である。

#### 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)

Goto A, Dobashi Y, Tsubochi H, Maeda D, Ooi A. MicroRNAs associated with increased AKT gene number in human lung carcinoma. 査読有. Hum Pathol. 2016. pii: S0046-8177(16)30059-4. doi: 10.1016/j.humpath.2016.04.011  
Kuriyama S, Yoshida M, Yano S, Aiba N, Kohno T, Minamiya Y, Goto A, Tanaka M. LPP inhibits collective cell migration during lung cancer

dissemination. 査読有. *Oncogene*. 2016;35(8):952-64. doi: 10.1038/onc.2015.155.

Tanaka M, Shimamura S, Kuriyama S, Maeda D, Goto A, Aiba N. SKAP2 Promotes Podosome Formation to Facilitate Tumor-Associated Macrophage Infiltration and Metastatic Progression. 査読有. *Cancer Res*. 2016;76(2):358-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1879.

Tanino, M, Sasajima, T, Nanjo, H, Akesaka, S, Kagaya, M, Kimura, T, Ishida, Y, Oda. M, Takahashi, M, Sugawara, Y, Yoshioka, T, Nishimura, H, Akagami, Y, Goto, A, Minamiya, Y, Tanaka, S, R-IHC Study Group. (2015) Rapid immunohistochemistry based on alternating current electric field for intraoperative diagnosis of brain tumors. 査読有. *Brain Tumor Pathol*. 2015; 32(1), 12-19. doi: 10.1007/s10014-014-0188-y.

Takahashi M, Masuda H, Yoshida M, Ito Y, Nanjo H, Sugiyama T, Maeda D, Goto A. Clusters of proliferating endothelial cells and smooth muscle cells in rabbit carotid arteries. 査読有. *Pathol Int*. 2015;65(11):585-94. doi: 10.1111/pin.12348.

Tsuji T, Satoyoshi R, Aiba N, Kubo T, Yanagihara K, Maeda D, Goto A, Ishikawa K, Yashiro M, Tanaka M. Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells. 査読有. *Cancer Res*. 2015;75(2):356-66. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1693.

Maeda D, Akiyama Y, Morikawa T, Kunita A, Ota Y, Katoh H, Niimi A, Nomiya A,

Ishikawa S, Goto A, Igawa Y, Fukayama M, Homma Y. Hunner-Type (Classic) Interstitial Cystitis: A Distinct Inflammatory Disorder Characterized by Pancystitis, with Frequent Expansion of Clonal B-Cells and Epithelial Denudation. 査読有. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143316. doi: 10.1371/journal.pone.0143316.

Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. 査読有. *Hum Pathol*. 2014;45(7):1397-405. doi: 10.1016/j.humpath.2014.02.013.

Ozawa M, Kawakami E, Sakamoto R, Shibasaki T, Goto A, Yoshida N. Development of FGF2-dependent pluripotent stem cells showing naive state characteristics from murine preimplantation inner cell mass. 査読有. *Stem Cell Res*. 2014;13(1):75-87. doi: 10.1016/j.scr.2014.04.012.

Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, Sarchianaki E, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E. HPV-associated

lung cancers: an international pooled analysis. 査読有. Carcinogenesis. 2014; 35 (6) : 1267-75. doi: 10.1093/carcin/bgu038. Dobashi Y, Goto A, Endo T, Ooi A. Genetic aberrations as the targets of oncology research: Involvement of paraffin-embedded tissues. 査読有. Histol Histopathol. 2014; 29 (2) : 191-205. Imai K, Minamiya Y, Goto A, Nanjo H, Saito H, Motoyama S, Sato Y, Kudo S, Takashima S, Kawaharada Y, Kurihara N, Orino K, Ogawa J. Bronchioloalveolar invasion in non-small cell lung cancer is associated with expression of transforming growth factor-1. 査読有. World J Surg Oncol. 2013; 11: 113. doi: 10.1186/1477-7819-11-113.

[学会発表](計 16 件)

1. 前田大地, 秋山佳之, 森川鉄平, 後藤明輝, 深山正久. B-cell 異常に着目した間質性膀胱炎の病理組織学的研究. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
2. 前田大地, 後藤明輝, 深山正久. 卵巣平滑筋腫における *MED12* 遺伝子変異. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
3. 前田大地, 後藤明輝, 深山正久. 子宮頸部胃型腺癌における Claudin-18 発現. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
4. 吉田 誠, 前田大地, 伊藤行信, 浅部幸紹, 南條 博, 増田弘毅, 後藤明輝. 心筋右心室内腔に占拠性の転移層を形成した胃癌の剖検例. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
5. 廣嶋優子, 南條 博, 前田大地, 後藤明輝, 笹嶋寿郎, 清水宏明, 南谷佳弘, 津田真寿美, 田中伸哉. 迅速免疫組織化学染色を用いた膠腫における IDH1 染色の術中応用. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
6. 伊藤行信, 前田大地, 浅部幸紹, 吉田 誠, 高橋正人, 南條 博, 増田弘毅, 吉田朗彦, 後藤明輝. MDM2 増幅を示す心左室原発 intimal sarcoma の一剖検例. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
7. 南條 博, 吉岡年明, 廣嶋優子, 南谷佳弘, 笹嶋寿郎, 吉田 誠, 後藤明輝, 大森泰文, 中村竜太, 赤上陽一. 迅速免疫染色技術 (R-IHC) を用いた術中迅速病理診断—当院における 180 症例の検討—. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
8. 土橋 洋, 後藤明輝, 梶村春彦, 山田茂樹, 大井章史. 肺癌で AKT 遺伝子増幅に伴い変動する microRNA とその意義. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
9. 高橋正人, 伊藤行信, 吉田 誠, 後藤明輝, 杉山達朗, 増田弘毅. 人工透析患者のバスキュラアクセスとして用いられる動静脈吻合術後の静脈内膜肥厚の病理組織学的検討. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
10. 幕内大貴, 吉田 誠, 伊藤行信, 前田大地, 浅部幸紹, 南條 博, 増田弘毅, 後藤明輝. ヒト心不全症例の心筋介在板を中心とする心筋リモデリングの形態解析. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日
11. 小山 慧, 梅園 龍, 前田大地, 後藤明輝. 卵巣の子宮内膜性嚢胞における ARID1A 発現消失. 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日

- 日
12. 吉田 誠, 小松正代, 波田野善明, 南條博, 伊藤行信, 後藤明輝. 多発する炎症性偽腫瘍を合併した特発性血小板減少性紫斑病の一部検例. 第 103 回日本病理学会総会. 広島, 2014 年 4 月 24 日-26 日
  13. 伊藤行信, 吉田 誠, 高橋正人, 南條博, 杉山達朗, 川村公一, 増田弘毅, 後藤明輝. 静脈への動脈パッチ移植により発生した新生血管の研究. 第 103 回日本病理学会総会. 広島, 2014 年 4 月 24 日-26 日
  14. 廣嶋優子, 高橋正人, 南條博, 鶴生川久美, 亀岡吉弘, 伊藤行信, 吉田 誠, 川村公一, 大田泰徳, 後藤明輝. EBV 陽性大型異型リンパ球の増生が目立った AITL の一部検例. 第 103 回日本病理学会総会. 広島, 2014 年 4 月 24 日-26 日
  15. 南條博, 吉岡年明, 南谷佳弘, 笹嶋寿郎, 廣嶋優子, 吉田誠, 後藤明輝, 赤上陽一. 電界非接触攪拌迅速免疫染色技術を用いた術中病理迅速診断. 第 103 回日本病理学会総会. 広島, 2014 年 4 月 24 日-26 日
  16. 吉岡年明, 南條博, 伊藤智夫, 蛇口 琢, 矢野道広, 新井浩和, 吉野裕顕, 後藤明輝, 大森泰文. 新生児に発症した Fetal lung interstitial tumor (FLIT) の一例. 第 103 回日本病理学会総会. 広島, 2014 年 4 月 24 日-26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

(1) 研究代表者  
後藤 明輝 (GOTO AKITERU)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90317090

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )  
研究者番号：