

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460441

研究課題名(和文) KRAS変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性(S100蛋白質の関与)

研究課題名(英文) Pathological Analysis for Lung Adenocarcinomas with KRAS Mutations and Strong Proliferating Activity (in Association with S100 Proteins)

研究代表者

禹 哲漢 (WOO, Tetsukan)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：90537177

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)：申請者らは、先行研究で、KRAS変異を伴い且つ高い増殖活性を示す肺腺癌の術後再発率が特に高い事、および変異型KRAS下流の網羅的解析で複数のS100分子が高発現している事を明らかにした。当該研究では、肺腺癌における複数のS100分子の発現解析、および臨床病理学的因子との相関解析を行った。その結果、S100A11は、KRAS変異を伴い且つ高い増殖活性を示す一群において、有意に高い発現を示した。これは、S100A11が、KRAS変異を伴い且つ高い増殖活性を示す予後不良な肺腺癌の一群において、高悪性度を規定する分子基盤の一部を担っている可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that patients with lung adenocarcinomas with KRAS gene mutations and strong proliferating activity had poorer outcomes and some S100 molecules were up-regulated by the oncogenic KRAS. The present study examined surgically resected primary lung adenocarcinomas for the expression of some S100 proteins, and analyzed the potential relationships between their levels and clinicopathologic factors. The results demonstrated that S100A11 expression levels were significantly higher in adenocarcinomas with KRAS mutations and strong proliferating activity. The results suggest that S100A11 plays a role in tumor progression, particularly in lung adenocarcinomas with KRAS mutations and strong proliferating activity.

研究分野：呼吸器外科学、人体病理学

キーワード：肺癌 KRAS 増殖活性 S100

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、現在まで呼吸器外科医として肺癌の外科的治療に携わる一方、未だ十分とは言えない肺癌の術後生存率を向上させるべく、その悪性を規定する分子基盤について研究を行ってきた。その過程において、KRAS 遺伝子変異を伴い、且つ高い増殖活性を示す肺腺癌の術後成績が極めて不良であることを報告した (Woo T, et al. Lung Cancer 2009)。KRAS 遺伝子変異を伴う肺腺癌は、種々の制癌剤、特に分子標的薬への感受性が低く、非切除症例には有効な治療法が無いのが実状である。目下、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性の解明は、それを標的とする新規治療法の開発に繋がる重要、且つ急務の研究案件である。

申請者は、特に、このような KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌に照準を当て、マイクロアレイを用いた変異型 KRAS 下流分子の網羅的 mRNA 発現解析から、その成り立ちに関わる複数の分子種を同定し報告してきた (Okudela K, Woo T, et al. Am J Pathol 2009, Pathol Int 2010)。この成果は、変異型 KRAS 下流分子の検索が、高悪性度肺腺癌 (KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌) の分子基盤を追求するうえで優れた戦略であることを示していた。

申請者は、更に研究を進め、従来の mRNA 発現アレイ解析では同定できなかった、翻訳後レベルで発現・修飾制御を受ける変異型 KRAS 下流分子群を、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析から網羅し、予備的解析において、それらのうち複数の S100 蛋白質の発現レベルが、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌で高く、また術後再発率との相関傾向を示す結果を得た。

S100 蛋白質は、細胞内シグナル伝達などに関わるカルシウム結合性蛋白質であり、現在までに 20 種類のサブファミリーが同定されている。S100 蛋白質は、これまでに (我々の着目している KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌での発現態度については報告がないものの)、肺癌細胞の増殖活性や浸潤性を促進すること示す報告が複数なされている (Naz S et al. Biochemical J 2012;447:81-91, Hao J et al. Mol Cell Biol 2012;359:323-32)。

以上の予備的解析結果と文献的考察を踏まえ、申請課題では、予備的解析で高発現を示した複数の S100 蛋白質に着目し、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の悪性を規定する責任分子としての可能性を検証する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、高悪性度肺腺癌 (KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌) の分子病理学的特性の一端を明確にすることである。申請者らは、これまでに、KRAS 変異を伴い且

つ高増殖活性を示す肺腺癌の再発率が特に高いことを明らかにし、また、マイクロアレイを用いた KRAS 下流分子の網羅的発現解析から、このような高悪性度肺腺癌の成り立ちに関わる複数の分子種を同定し報告してきた。この成績は、KRAS 下流分子の検索が、高悪性度肺腺癌の分子基盤を追求するうえで優れた戦略であることを示していた。申請者らは、更に、プロテオーム解析を追加し、従来の発現アレイ解析では同定できなかった KRAS 下流分子を既に網羅している。それらのうち、複数の S100 蛋白質は、その発現レベルが KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌において高い傾向がみられ、特に興味を持たれた。

申請課題では、予備的解析で高発現を示した複数の S100 蛋白質に照準を当て、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌 (高悪性度肺腺癌) の悪性を規定する責任分子としての可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

申請課題では、予備的解析で高発現を示した複数の S100 分子に焦点を当て、下記の解析を行う。

(1)肺腺癌切除材料を対象に、上記 S100 分子の発現レベルを、Western blotting、免疫染色を用いて定量的・半定量的に解析する。

(2)KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌 (高悪性度肺腺癌) と他群における、上記 S100 分子の発現レベルを比較検討する。

(3)これらの予備解析結果を基に、更に症例数を拡張した集団において、上記 S100 分子の発現解析を行い、KRAS 遺伝子変異、細胞増殖活性 (Ki-67 免疫染色標識率) 術後再発との相関を解析する。

以上の解析を通じ、上記 S100 分子が真に KRAS 変異型・高増殖活性型肺腺癌 (高悪性度肺腺癌) の悪性の規定する責任分子であるか否かを検討する。

## 4. 研究成果

予備的解析において、空ベクター、野生型 KRAS、変異型 KRAS をそれぞれ培養細胞に導入し、高発現/低発現する分子を二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析で網羅した結果、S100A2、S100A11 分子は、変異型 KRAS 導入細胞で有意に高発現を示した。この結果は、国際誌に投稿・掲載された (Okudela K, Katayama A, Woo T, et al. PLoS One 2014 Feb 4;9(2):e87193)。

肺腺癌切除材料を用いて、上記 S100A2、S100A11 分子の発現レベルを、Western blotting、免疫染色を用いて定量的・半定量的に解析を行った。その結果、Western blotting と免疫染色との間で、S100A2、S100A11 発現レベルは、良好な相関を示した。また、S100A11 は、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌において、より高発現する傾

向を示した。

上記結果を基に、解析対象を Stage 肺腺癌手術症例 179 例に拡張し、S100A2、S100A11 発現レベルと、KRAS 遺伝子変異、細胞増殖活性 (Ki-67 免疫染色標識率) 術後再発との相関解析を行った。その結果、S100A11 は、KRAS 変異を伴い且つ高い増殖活性を示す、高悪性度肺腺癌の一群において、有意に高い発現を示した (P=0.038 Kruskal-Wallis test)。

また、S100A11 発現は、重回帰分析で腫瘍の分化度と有意な相関 (低分化でより高発現、P=0.039) を認めた。さらに、無再発生存解析では、S100A11 高発現群は、低発現群と比較して有意に短い無再発生存期間を示した (P=0.0182 Log-rank test)。

一方、S100A2 発現は、KRAS 変異、増殖活性、無再発生存期間などの各種臨床病理学的因子と、有意な相関を認めなかった。

以上の研究結果は、S100A11 が、KRAS 変異を伴い且つ高い増殖活性を示す、予後不良な肺腺癌の一群において、高悪性度を規定する分子基盤の一部を担っている可能性を示唆したものであり、国際誌で報告された (Woo T, Okudela K, Mitsui H, et al. PLoS One 2015 Nov 6;10(11):e0142642)。

## 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 7 件)

- 1 Okudela K, Mitsui H, Woo T, Kojima Y, Matsumura M, Arai H, Suzuki T, Umeda S, Tateishi Y, Saito Y, Tajiri M, Masuda M, Kameda Y, Ohashi K. Expression of tropomyosins in lung cancer - a potential role in carcinogenesis and its utility in a histopathological diagnosis. *Histol Histopathol*. 2016 Jan 11;11721. (査読あり)  
DOI:10.14670/HH-11-721.
- 2 Woo T, Okudela K, Mitsui H, Tajiri M, Rino Y, Ohashi K, Masuda M. Up-Regulation of S100A11 in Lung Adenocarcinoma - Its Potential Relationship with Cancer Progression. *PLoS One*. 2015 Nov 6;10(11):e0142642. (査読あり)  
DOI:10.1371/journal.pone.0142642.
- 3 Horita N, Woo T, Miyazawa N, Kaneko T. Pre-operative chemotherapy for non-small cell lung carcinoma. *Transl Lung Cancer Res*. 2015 Feb;4(1):8-14. (査読あり)  
DOI:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.07.03.
- 4 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*. 2014 Jun 30;9(6):e100581. (査読あり)  
DOI:10.1371/journal.pone.0100581.

- 5 Isaka T, Yokose T, Ito H, Imamura N, Watanabe M, Imai K, Nishii T, Woo T, Yamada K, Nakayama H, Masuda M. Comparison between CT tumor size and pathological tumor size in frozen section examinations of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2014 Jul;85(1):40-6. (査読あり)  
DOI:10.1016/j.lungcan.2014.03.023.
  - 6 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*. 2014 Feb 4;9(2):e87193. (査読あり)  
DOI:10.1371/journal.pone.0087193.
  - 7 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*. 2014;7(1):213-20. (査読あり)  
URL:http://www.ijcep.com/files/ijcep1310009.pdf
- [学会発表] (計 6 件)
- 1 禹哲漢 . 悪性胸膜中皮腫診断における p16 FISH の有用性 . 第 33 回日本呼吸器外科学会総会 . 2016 年 5 月 13 日 . 国立京都国際会館 (京都府京都市) .
  - 2 禹哲漢 . Up-Regulation of S100A11 in Lung Adenocarcinoma - Its Potential Relationship with Cancer Progression . 第 116 回日本外科学会定期学術集会 . 2016 年 4 月 16 日 . リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府大阪市) .
  - 3 禹哲漢 . Oligometastasis 肺癌における循環・遊離癌細胞 . International Lung Clinical Research Organization ワークショップ . 2016 年 2 月 27 日 . 愛知がんセンター (愛知県名古屋) .
  - 4 禹哲漢 . Stage 肺腺癌における癌幹細胞マーカーの予後予測指標としての有用性 . 第 31 回日本呼吸器外科学会総会 . 2014 年 5 月 29 日 . ホテル日航東京 (東京都) .

5 禹哲漢 . Stage 肺腺癌における IASLC/ATS/ERS 分類の予後予測指標としての有用性 . 第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会 . 2013 年 10 月 16 日 . 仙台国際センター (宮城県仙台市).

6 禹哲漢 . 非小細胞肺癌術前導入治療の効果判定における FDG-PET/CT の有用性 - CT との比較 - . 第 30 回日本呼吸器外科学会総会 . 2013 年 5 月 9 日 . 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

禹 哲漢 (WOO, Tetsukan)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
客員研究員  
研究者番号 : 90537177

### (2) 研究分担者

奥寺 康司 (OKUDELA, Koji)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 10326027

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

益田 宗孝 (MASUDA, Munetaka)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号 : 10190365

荒井 宏雅 (ARAI, Hiromasa)  
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・  
客員講師  
研究者番号 : 10381493