

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462190

研究課題名(和文) 胸部悪性腫瘍のEMT進行を実行するシグナル経路の同定と臨床標本での評価

研究課題名(英文) An evaluation for identification of signaling pathway to make progress EMT of thoracic malignant tumor and evaluation of clinical specimens.

研究代表者

下川 秀彦 (SHIMOKAWA, Hidehiko)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：00566135

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)：肺癌の治療抵抗性を克服するためには、癌の悪性度進展の要因を明らかにすることが必要である。本研究では細胞の接着と運動の制御に関するシグナル(EGFR-GEP100-Arf6 Signaling)の有益性を詳細に解明し、臨床応用を目指すことを目的とする。まず肺腺癌症例182例においてこれらの分子の発現を確認したところ、全ての因子が陽性の群で予後不良であり、これらの相互作用が浸潤・転移と関連し予後に影響を及ぼす可能性がある。また悪性胸膜中皮腫において一部のEMT関連マーカー発現の有無がその予後に関連していることが示され、この知見は今後の悪性胸膜中皮腫の診療に多大に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To overcome resistance to treatment in lung cancer, it is necessary to reveal biological factors contributing to its progression. The aim of the current study is to reveal the roles of the EGFR-GEP100-Arf6 axis in controlling migration and adhesion of tumor cells and to assess its clinical applications. First, we immunohistochemically examined expression of these molecules in resected lung adenocarcinoma cases (n=182), and showed that expression of these molecules was significantly associated with poor prognosis, suggesting that the EGFR-GEP100-Arf6 axis plays important roles in invasion and metastasis that are responsible to poor prognosis. Next, we examined biological factors contributing to development and progression of malignant mesothelioma, and revealed that some EMT-related factors were significant prognostic factors that can be potentially useful clinical marker in malignant mesothelioma.

研究分野：胸部外科学

キーワード：胸部悪性腫瘍 p-EGFR GEP100 Arf6 予後

1. 研究開始当初の背景

胸部悪性腫瘍(特に肺癌、悪性胸膜中皮腫)の予後は極めて不良であり(下川、(2003年度:日本呼吸器外科学会 Young investigator award 受賞)で、我々は、1) 悪性胸膜中皮腫の手術症例から、細胞接着因子と p53 の蛋白発現、また EGFR 遺伝子変異、K-ras 遺伝子変異について解析し(浦本ら、H19-20 科研費基盤研究 C)、2) EGFR 遺伝子変異を基軸として heterogeneity の成因に関わる因子を総合的に検討してきた(浦本ら、H21-23 科研費基盤研究 C)。この結果、例えば臨床の効果に直帰し、感受性バイオマーカーによる選別が直接、肺癌患者の個別化医療に繋がった。具体的には EGFR 研究へと繋げ、EGFR 変異が奏功のみならず、予後延長にも寄与することを報告した(ASCO Clinical Practice Guideline. J Clin Oncol. 2009 引用掲載)。しかし、胸部悪性腫瘍全体で俯瞰するとその恩恵を被る集団は決して多くはない。

2. 研究の目的

EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 Signaling は、がん細胞、特に乳癌における詳細な基礎実験にて癌の発展、とりわけ上皮間葉転換(EMT)に深く関与することが分かっている。しかし、乳腺管腔構造と近似する肺腺癌に関する知見は乏しい。我々は共同研究として北海道大学の佐邊壽孝教授より GEP100、AMAP1 の抗体の供与を国内外で初めて得て、すでに preliminary な実験を開始した。肺癌(腺癌)において p-EGFR、GEP100、HER2、Arf6 の発現を癌組織(外科切片)で確認した。またリンパ管侵襲(ly factor)、血管侵襲(v factor)はその予後を鋭敏に予測する病理学的指標であるが、リンパ管侵襲、血管侵襲に p-EGFR、GEP100 が統計学的に有意に関与することをすでに見出している。しかし、その臨床応用には時期尚早であり、後に記すように肺癌、胸膜中皮腫に特異的な分子群の変化の確証や予後に対する指標、薬剤に対する抵抗性など丁寧に検証する必要がある。

3. 研究の方法

研究計画

(1) 肺癌細胞株を用いて EGFR-GEP100-Arf6 Signaling 分子の検証を in vitro で行う。特に EGFR 変異、K-ras 変異、EML4-ALK 転座における Signaling が薬剤感受性、耐性や上皮間葉転換(EMT)に対する影響を検討する。

(2) 上記分子の臨床的有益性を検討する。

(3) 胸膜中皮腫に関しても肺癌と同様に検討する。腫瘍の進展形式が全く異なるので異なる結果が予想される。また当科で従来から精力的に研究している CTC と上記マーカーの組み合わせでバイオマーカーとしての意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1-2) 2003~2007年までに当科で施行した肺腺癌完全切除症例のうち、解析可能であった182例を対象とした。p-EGFR・GEP100・Arf6 発現の有無は免疫組織化学染色法を用いて評価し、臨床背景として性別・年齢・喫煙歴・組織型・病理病期を因子とし、その関連を解析した。p-EGFR・GEP100・Arf6 の陽性発現は、それぞれ65(35.7%)・95(52.2%)・20(11.0%)人の患者で観察された。p-EGFR・GEP100 の発現と病理組織学的血管浸潤の程度は関連が認められ、p-EGFR と GEP100 の間にも関連がみとめられた。生存分析では、各因子の発現の有無で有意差は認められなかったが、5年生存率で、p-EGFR・GEP100・Arf6 の3つの因子がすべて陽性の群は、明らかに予後不良であった($p=0.011$)。また多変量解析においても、p-EGFR・GEP100・Arf6 の3つの因子がすべて陽性の群は、予後と関連していた($p=0.021$)。この研究で、大きく3つの発見があった。1つ目は、肺腺癌において、p-EGFR と GEP100 の発現は比較的頻度が高いこと。2つ目は、p-EGFR・GEP100 の発現と病理組織学的血管浸潤の程度は関連が認められること。3つ目は、p-EGFR・GEP100・Arf6 それぞれ独立した因子と予後について関連は認められなかったが、p-EGFR・GEP100・Arf6 の3つの因子がすべて陽性の群は、予後と関連していた($p=0.021$)ことであり、それぞれの因子の相互作用によって、予後規定因子になる可能性があるという事である。従って、肺腺癌において、p-EGFR・GEP100・Arf6 経路活性は術後予後予測因子の1つとなりえる可能性がある(Oncology. 2014;86:263-70)。

(3-4) 悪性胸膜中皮腫(malignant pleural mesothelioma、以下 MPM)の予後は極めて不良であり、現在その予後の推測に有用なバイオマーカーはない。上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition、以下、EMT)は上皮細胞がより運動性の高い間葉系様細胞に形態変化する現象であり、癌細胞の浸潤や転移との関連が報告されている。MPM は上皮型、二相型、肉腫型の3種類の組織学的な分類がなされており、その細胞形態から EMT との関連性が推測される。1998年から2012年までに産業医科大学第2外科で MPM の診断が得られた38例のうち、解析可能であった33例を対象とした。E-cadherin、-catenin、vimentin、fibronectin、Twist、YB-1 を EMT 関連マーカーとして選択し、免疫組織化学染色法を用いてその発現の有無を評価した。免疫染色の評価は独立した2人によりなされた。また、臨床背景として性別、年齢、喫煙歴、アスベスト曝露歴、組織型、病理病期を因子とし、その関連性も解析した。生存期間の検討に関しては、手術施行日から死亡または最終確認日までの日数とし、統計学的有意性はカイ二乗検定またはフィッシャーの検定を用いて評価した。生存曲線は Kaplan-Meier 法にて算出し、生存の差はログ

ランク検定により分析した。多変量解析はコックスの比例ハザードモデルに従って行った。E-cadherin、 β -catenin、vimentin、fibronectin、Twist、YB-1の陽性発現は、それぞれ25人、14人、21人、1人、19人および18人であった。これらのEMT関連マーカーと各々の臨床背景にはいずれも有意な関連性は認められなかった。また、EMT関連マーカーと組織型に関しては、 β -cateninの発現頻度は上皮型で高い傾向にあり、逆に肉腫型では低い傾向にあった。肉腫型においてはvimentinとTwist、YB-1の発現頻度が高い傾向にあり、特にTwistに関しては上皮型と比較して肉腫型で有意に発現頻度が高かった。Kaplan-Meier法を用いた生存分析では、各EMT関連マーカー発現の有無での有意差は認められなかったが、 β -catenin陰性かつTwist陽性例では他群に比べて予後不良の傾向が認められた。特に上皮型ではこの群において有意に予後不良であり、多変量解析においても β -catenin陰性かつTwist陽性例において死亡リスク増加と関連していた(Oncology. 2014;86:109-116)。

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19件)

1. Yoshida T, Song L, Bai Y, Kinose F, Li J, Ohaegbulam KC, Muñoz-Antonia T, Qu X, Eschrich S, Uramoto H, Tanaka F, Nasarre P, Gemmill RM, Roche J, Drabkin HA, Haura EB. ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. PLoS One. 2016;11:e0147344. 査読有
2. Chikaishi Y, Uramoto H, Koyanagi Y, Yamada S, Yano S, Tanaka F. TMRSS4 Expression as a Marker of Recurrence in Patients with Lung Cancer. Anticancer Res. 2016;36:121-7. 査読有
3. Yokouchi H, Ishida T, Yamazaki S, Kikuchi H, Oizumi S, Uramoto H, Tanaka F, Harada M, Akie K, Sugaya F, Fujita Y, Fukuhara T, Takamura K, Kojima T, Harada T, Higuchi M, Matsuura Y, Honjo O, Minami Y, Watanabe N, Nishihara H, Suzuki H, Dosaka-Akita H, Isobe H, Nishimura M, Munakata M. Prognostic impact of clinical variables on surgically resected small-cell lung cancer: Results of a retrospective multicenter analysis (FIGHT002A and HOT1301A). Lung Cancer. 2015; S0169-5002(15)30079-9. 査読有
4. Uramoto H, Okumura M, Endo S, Tanaka F, Yokomise H, Masuda M. The 30-day mortality and hospital mortality after chest surgery described in the annual reports published by the Japanese Association for Thoracic and Cardiovascular Surgery. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2015;63(5):279-83. 査読有
5. Nanjo S, Nakagawa T, Takeuchi S, Kita K, Fukuda K, Nakada M, Uehara H, Nishihara H, Hara E, Uramoto H, Tanaka F, Yano S. In vivo imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line. Cancer Sci. 2015;106(3):244-52. 査読有
6. Kawatsu Y, Kitada S, Uramoto H, Zhi L, Takeda T, Kimura T, Horie S, Tanaka F, Sasaguri Y, Izumi H, Kohno K, Yamada S. The combination of strong expression of ZNF143 and high MIB-1 labelling index independently predicts shorter disease-specific survival in lung adenocarcinoma. Br J Cancer. 2014;110(10):2583-92. 査読有
7. Uramoto H, Tanaka F. What is an appropriate material to use with a covering technique to prevent the recurrence of spontaneous

- pneumothorax? J Cardiothorac Surg. 2014;9(1):74. 査読有
8. Uramoto H, Nakanishi R, Uchiyama A, Inoue M, Sugaya M, Iwata T, Ebi N, Hanagiri T, Tanaka F. A phase II trial of adjuvant chemotherapy with tri-weekly carboplatin plus docetaxel in patients with completely resected non-small cell lung cancer. World Journal of Respiratory. 2014; 4: 1-7. 査読有
 9. Uramoto H, Shimokawa H, Tanaka F. Postoperative bleeding after surgery in patients with lung cancer. Anticancer Res. 2014;34:981-4. 査読有
 10. Uramoto H, Tanaka F. Salvage thoracic surgery in patients with primary lung cancer. Lung cancer. 2014;84(2):151-5 査読有
 11. Uramoto H, Tanaka F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC. Translational Lung Cancer Research. 2014 Aug;3(4):242-9. 査読有
 12. Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Ichiki Y, Tanaka F. Factors predicting the surgical outcome in patients with T3/4 lung cancer. Surg Today. 2014;44(12):2249-54. 査読有
 13. Iwanami T, Uramoto H, Nakagawa M, Shimokawa H, Yamada S, Kohno K, Tanaka F. Clinical Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Markers in Malignant Pleural Mesothelioma. Oncology. 2014;86:109-116. 査読有
 14. Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Yamada S, Tanaka F. An EGFR-GEP100-Arf6 axis affects the prognosis of lung adenocarcinoma. Oncology. 2014;86:263-70. 査読有
 15. Chikaishi Y, Uramoto H, Oka S, Nagata S, Shimokawa H, So T, Yamada S, Hanagiri T, Mukae H, Tanaka F. Discrepancy between the Clinical Image and Pathological Findings of Non-Small Cell Lung Cancer Harboring an Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutation That Was Surgically Resected after Gefitinib Treatment. Case Rep Oncol 2014;7:126-131. 査読有
 16. Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Yasuda M, Chikaishi Y, Oka S, Shimokawa H, Nagata Y, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Yamada S, Tanaka F. Serum Level of Osteopontin as a Prognostic Factor in Patients Who Underwent Surgical Resection for Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2013;14:288-94. 査読有
 17. Takenaka M, Uramoto H, Shimokawa H, So T, Hanagiri T, Aoki T, Tanaka F. Discriminative features of thin-slice CT for peripheral intrapulmonary lymph nodes. Asian J Surg. 2013;36:69-73. 査読有
 18. 下川秀彦, 松本崇秀, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓: 右肺上葉切除後、左残存肺に完全無気肺を呈した異時性多発肺癌に対し残存肺全摘(completion pneumonectomy)を施行した1例. 日呼外会誌 28 (2014: 28; 466-470 査読有
 19. 下川秀彦, 宗知子, 浦本秀隆, 田中文啓. 膠原病合併肺癌手術に関する検討. 日呼外会誌 2015: 29;2-5 査読有
- [学会発表](計14件)
1. 下川秀彦 菅谷将一: 右肺静脈瘤に対し右下葉区域切除を施行した1例. 第32回呼吸器外科学会 香川 2015.5.15
 2. 下川秀彦, 篠原周一, 金山雅俊, 平良彰浩, 竹中賢, 近石泰弘, 岡壮一, 岩浪崇

- 嗣、永田好香、宗知子、浦本秀隆、田中文啓：右主気管支に発生した pleomorphic adenoma に対し右主気管支管状切除を行った1例。第31回呼吸器外科学会 東京 2014.5.29-30
3. 下川秀彦、篠原周一、金山雅俊、平良彰浩、竹中賢、近石泰弘、岡壮一、岩浪崇嗣、永田好香、宗知子、浦本秀隆、田中文啓：腸型肺腺癌の1手術例。第31回呼吸器外科学会 東京 2014.5.29-30
 4. 下川秀彦、松本崇秀、名部裕介、平良彰浩、門司祥子、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、永田好香、中川誠、岩田輝男、浦本秀隆、宗知子、花桐武志、江藤政尚、西村洋介、田中文啓：PA-elongation 法による左主肺動脈基部の処理。第30回呼吸器外科学会 名古屋 2013.5.9-10
 5. 下川秀彦、松本崇秀、名部裕介、平良彰浩、門司祥子、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、永田好香、中川誠、岩田輝男、浦本秀隆、宗知子、花桐武志、柴尾和徳、日暮愛一郎、山口幸二、江藤政尚、西村洋介、田中文啓：主肺動脈内血栓を伴う有癭性肺膿瘍・荒蕪肺に対する人工心肺下の左胸膜肺全摘除術。第30回呼吸器外科学会 名古屋 2013.5.9-10
 6. 下川秀彦、松本崇秀、名部裕介、平良彰浩、門司祥子、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、永田好香、中川誠、岩田輝男、浦本秀隆、宗知子、花桐武志、田中文啓：当科における膠原病合併肺癌手術に関する検討。第30回呼吸器外科学会 名古屋 2013.5.9-10
 7. 浦本秀隆、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、平井文子、岩浪崇嗣、永田好香、下川秀彦、宗知子、花桐武志、田中文啓：ドライバー癌遺伝子変異耐性に関する分子機構と外科医の役割(シンポジウム：肺癌の個別化医療時代における外科医の役割)。第114回日本外科学会総会 京都。2014.4.3-4
 8. 浦本秀隆、近石泰弘、米田和恵、宗知子、山田壮亮、田中文啓。悪性胸膜中皮腫に対する低侵襲診断技術の確立。第32回産業医科大学学会。北九州 2014.10.4
 9. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Nakagawa M, Shimokawa H, Iwata T, Nagata Y, Uramoto H, Hanagiri T, Ohnaga T, Tanaka F: Development of detecting systems for circulating tumor cells in malignant pleural mesothelioma patients. American Association for Cancer Research. Washington 2013.4.10
 10. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Hirai A, Iwanami T, Yoneda K, Shimokawa H, Nagata Y, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F: Comparison of Cell Search with polymeric microfluidic devices for CTC isolation using EpCAM-negative tumor cell lines of malignant pleural mesothelioma. American Association for Cancer Research. San Diego. 2014.4.8
 11. Yoneda K, Chikaishi Y, Rie Kawashima R, So T, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F: Capture of EpCAM-negative circulating tumor cells (CTCs) with a “Universal CTC-Chip”. American Association for Cancer Research. Philadelphia 2015.4.18-22
6. 研究組織
- (1)研究代表者
下川秀彦 (SHIMOKAWA Hidehiko)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：00566135
 - (2)研究分担者
田中文啓 (TANAKA Fumihiro)

産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283673

和田 洋巳 (WADA Hiromi)
研究者番号：30111975
京都大学・医学研究科・名誉
教授

佐邊 壽孝 (SABE Hisataka)
研究者番号：40187282
北海道大学・医学(系)研究
科(研究院)・教授

浦本 秀隆 (URAMOTO Hidetaka)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90389445