

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501347

研究課題名(和文)小細胞肺がんの層別化の試み - 発生起源の再検討と発がん機構に注目して -

研究課題名(英文)Peripheral location, TTF-1 expression and prognosis of SCLC

## 研究代表者

西尾 誠人(Nishio, Makoto)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：00281593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「小細胞肺がん(SCLC)は末梢型肺がんである」という仮説を検証するために、SCLC96例のCT画像と臨床データを用いた詳細な検討を行った。その結果、SCLCの75%は亜区域気管支以降の末梢から発生し、末梢型SCLCはTTF-1の発現と有意な相関を認め、SCLCが末梢から発生する癌であることが明らかとなった。また、末梢型は中枢型よりも有意に予後不良な癌であることから、SCLCの発生部位が予後予測因子となる可能性が示唆された。遺伝子発現解析でも両者は癌の性質が異なる群として層別化できることが示されTTF-1を発現しているSCLCではTTF-1が癌の増殖に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether SCLC is really a central-type tumor and the relationship between tumor location, TTF-1 expression and prognosis of SCLC. Ninety six SCLCs, diagnosed from biopsies or surgical materials, for which detailed computed tomography (CT) images were available, were collected consecutively from Japanese patients between 2004 and 2011. We examined the location of the primary tumor (central or peripheral) using thin-sliced CT, a TTF-1 immunohistochemical expression, and clinicopathology including prognosis. Of the 96 SCLCs, 75% were of the peripheral type and found to have a significantly worse prognosis than central-type tumors. TTF-1 expression was significantly correlated with peripheral location ( $p = 0.030$ ). Multivariate analysis revealed that high TNM stages and the peripheral location were independent markers for poor survival. TTF-1 is a marker for peripheral location and a poor prognosis for SCLC.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：小細胞肺がん TTF-1

## 1. 研究開始当初の背景

これまでは小細胞肺癌 (SCLC) は、喫煙などの吸入性発がん因子と強く関連し、それゆえ肺門部から発生する中枢型肺癌と考えられてきた (Herbest et al. NEJM 359: 1367-, 2008)。しかし我々は、原発巣が肺の亜区域気管支以降に存在するものを末梢型肺癌、それよりも中枢側に存在するものを中枢型肺癌と定義し SCLC の CT 画像を再検討する pilot study を行った結果、約 80% の症例で原発巣は中枢ではなく亜区域気管支以降の末梢に認める末梢型肺癌であることが明らかになった。また、がんの発生部位は TTF-1 の発現とよく相関している事も判明した。

Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) は肺や甲状腺に特異的に発現している転写因子で、肺の末梢に存在する型肺胞上皮細胞や Clara 細胞に発現しており、肺の発達および肺上皮細胞の機能維持において重要な役割を果たしている。TTF-1 は肺腺がんでは 63-84%、小細胞肺癌では 80~97% に発現しており、肺癌が原発性肺癌か転移性肺癌かを決定する免疫染色マーカーとして日常診療で利用されている。TTF-1 の発現は肺腺癌が末梢肺から発生する末梢型肺癌であることを支持する根拠の一つである。それならば、SCLC が末梢型肺癌である根拠となる可能性が考えられ、また、これは SCLC 細胞の増殖に TTF-1 が関与している可能性を示唆するものでもある。

本研究では、これまで中枢型肺癌とされてきた SCLC が真実は末梢型肺癌であり、肺腺癌と同様に TTF-1 が lineage marker として機能しているとの仮説を検証することを目的とした。当院で診断された SCLC について高精細 CT を用いて SCLC を末梢型と中枢型に分類し、各々 TTF-1 の発現状況を解析し事前に 19 例で検討を行った所、中枢型かつ TTF-1 陰性の群はその他の群と比較し、予後

が良好であるという予備的結果を得た。そこで、100 例以上に症例を増やした上で更に解析を行い、臨床情報と病理学的手法を組み合わせた SCLC の層別化を目指すこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、「小細胞肺癌 (SCLC) は末梢型肺癌である」という仮説を検証する。CT 画像や免疫組織化学などの臨床データを利用し、末梢型肺癌と中枢型肺癌に分け、末梢肺の lineage marker である TTF-1 の発現を解析する。またそれらの結果から予後が異なる集団を見出し、臨床検体および細胞株を用いた遺伝子発現解析 (マイクロ RNA、長鎖非コード RNA の発現解析) を行い、SCLC の遺伝子異常の新たなプロフィールを作成し SCLC の層別化を目指す。また、遺伝子発現解析の結果を基に SCLC 細胞株を用いた発がん機構の解明も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) CT 画像による中枢型/末梢型の判定と臨床情報の収集

当院で施行された高精細 CT 画像で SCLC の原発巣が、肺の亜区域気管支以降に存在する末梢型かそれよりも中枢側に存在する中枢型かを判定する。また、患者背景や治療経過、予後などについての情報も収集する。末梢型および中枢型の定義についてはこれまで見解は定まっていなかったため、本研究で注目している転写因子 TTF-1 の発現部位を考慮し上記のように定義した。その末梢型、中枢型の定義の妥当性についても検証を行う。

### (2) TTF-1 染色による TTF-1 の発現解析

全ての症例にホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫組織化学的に TTF-1 の発現状況を評価し、さらに dual color in-situ hybridization (DISH) により *TTF1* 遺伝子の増幅を検索して、発現状況を基に患者背景および予後について解析を行う。

### (3) SCLC 手術例における核酸の抽出

-80 で冷凍保存された SCLC 手術症例の腫瘍組織から型のとおり核酸を抽出する。

(4) 肺がんの発生部位および TTF-1 の発現状況により層別化された SCLC における遺伝子発現解析

上記の過程から治療効果や予後などの異なる集団を見出し、SCLC の層別化を行う。次に、上記の過程で得られた核酸を用いて、遺伝子発現・非コード RNA の発現などのデータを取得し層別化された群毎に有意な変化がみられるか解析を行う。

(5) SCLC 細胞株を用いた TTF-1 の発がん機構への関与の検討

TTF-1 が SCLC の増殖に関与する転写因子であるかどうかを検討するため、SCLC 細胞株を用いた検討を行う。

#### 4. 研究成果

始めに、当院で組織学的に SCLC と診断され、かつ原発巣の特定が可能な症例 96 例によるがんの発生部位と TTF-1 の発現の有無を確認し、両者の相関や予後への影響について検討を行った。その結果、96 例中、69 例 (75%) は CT 画像上、末梢型と判定され 79 例 (82%) に TTF-1 の発現を認めた。原発巣と TTF-1 の発現の関連性の検討を行った結果、末梢型の症例の大部分 (69/72=96%) は TTF-1 陽性であり、中枢型の症例の大部分は TTF-1 陰性であった (14/24=58%) ( $P < 0.001$ )。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、3 つの因子 (末梢型、TTF-1 陽性、進行病期) が有意な予後因子であった。

これらの結果をもとに、予後に差がみられた末梢型と中枢型で遺伝子発現の違いがみられるかどうかを検証するために、本研究の対象症例で外科的に切除され新鮮凍結材料が保存されている 14 症例について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、末梢型で高発現している遺伝子群には、Synaptophysin や Chromogranin A といった神経内分泌癌に関わる遺伝子が含まれており、本研究で着目した TTF-1 も高発

現していた。この結果は Gene Ontology (GO) 解析でも確認され、末梢型で有意に高発現している遺伝子群には nervous system development、Neurogenesis などの神経内分泌に関わる GO term が多く含まれていた。一方で、中枢型で高発現している遺伝子群における GO 解析では system development、anatomical development などの発生に関わる遺伝子が多く含まれており、両者は癌としての性質が異なる集団であることが明らかとなった。

次に、癌の増殖に TTF-1 が関与しているかどうかを検証するために、TTF-1 発現 SCLC 細胞株を用いた TTF-1 遺伝子のノックダウン実験を行った。TTF-1 の発現を免疫組織化学的に確認できた SCLC 細胞株 7 種を用いて、Opti-MEN-1、Lipofectamine RNAi Max、Stealth RNAi siRNA、Stealth RNAi siRNA による TTF-1 のノックダウンにより、多くの SCLC 細胞株で細胞増殖能および浸潤能が抑制されることが明らかとなった。これらのことから TTF-1 を発現している多くの SCLC 細胞株において TTF-1 は腫瘍の増殖に関わっている可能性が示唆された。

以上の結果から、SCLC の 75% は亜区域気管支以降の末梢から発生し、末梢型 SCLC は TTF-1 の発現と有意な相関を認め、SCLC が末梢から発生する癌である仮説を支持する結果が得られた。また、末梢型と中枢型では予後に明らかな違いを認めたことから、日常診療において SCLC の発生部位が予後予測因子となる可能性があり、両者は癌の性質が異なる群として層別化できる可能性が示唆された。また、TTF-1 を発現している SCLC では TTF-1 が癌の増殖や浸潤に関わっている可能性が示唆された。

今後はこれらの研究成果をもとに治療戦略や予後予測に役立つ SCLC の層別化を目指し更に臨床データを加えた検討を加える予定である。

## 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4件)

1) Hamanaka W, Motoi N, Ishikawa S, Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y. A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy. Hum Pathol 2014;45:1045-56

2) Satouchi M, Kotani Y, Shibata T, Ando M, Nakagawa K, Yamamoto N, Ichinose Y, Ohe Y, Nishio M, Hida T, Takeda K, Kimura T, Minato K, Yokoyama A, Atagi S, Fukuda H, Tamura T, Saijo N. Phase III study comparing amrubicin plus cisplatin with irinotecan plus cisplatin in the treatment of extensive-disease small-cell lung cancer: JCOG 0509. J Clin Oncol 2014; 32:1262-8

3) Misumi Y, Nishio M, Takahashi T, Ohyanagi F, Horiike A, Murakami H, Kenmotsu H, Yamamoto N, Ishii M, Shimokawa T, Hida N, Okamoto H. A feasibility study of carboplatin plus irinotecan treatment for elderly patients with extensive disease small-cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol 2014;44:116-21

4) Kubota K, Hida T, Ishikura S, Mizusawa J, Nishio M, Kawahara M, Yokoyama A, Imamura F, Takeda K, Negoro S, Harada M, Okamoto H, Yamamoto N, Shinkai T, Sakai H, Matsui K, Nakagawa K, Shibata T, Saijo N, Tamura T; Japan Clinical Oncology Group. Etoposide and cisplatin versus irinotecan and cisplatin in patients with limited-stage small-cell lung cancer treated with etoposide and cisplatin plus concurrent accelerated hyperfractionated thoracic radiotherapy (JCOG0202): a randomised phase 3 study. Lancet Oncol. 2014;15:106-13

[学会発表](計7件)

Eisaku Miyachi, Hiroshi Ono, Hironori Ninomiya, Kentaro Inamura, Noriko Motoi, Makoto Nishio, Sakae Okumura, Yuichi Ishikawa. Primary location of SCLC and TTF-1 expression are most SCLCs really of hilar origin? 3<sup>rd</sup> European Lung Cancer Conference.

宮内栄作、齋藤雄一、元井紀子、西尾誠人、奥村栄、石川雄一 小細胞肺がんの試み-発生源の再検討と発がん機構に着目して- 第53回日本肺癌学会総会

岡崎敏昌、上原浩文、後藤英典、森彰平、鮫島譲司、松浦陽介、中尾将之、文敏景、中川健、奥村栄、工藤慶太、柳谷典子、堀池篤、大柳文義、宝来威、西尾誠人、元井紀子、石川雄一 小細胞肺癌切除例の検討 第53回日本肺癌学会総会

宮内栄作、齋藤雄一、元井紀子、西尾誠人、奥村栄、石川雄一 末梢型小細胞肺がんは中枢型に比べ予後不良で、遺伝子プロファイルが異なる 第54回日本肺癌学会総会

村上晴泰、後藤功一、大江裕一郎、瀬戸貴司、高橋利明、中川和彦、山本昇、横山晶、武田晃司、西尾誠人、森清志、里内美弥子、水谷友紀、田村友秀 再発小細胞肺癌に対する二次化学療法ランダム化第III相試験(JCOG0605) 第54回日本肺癌学会総会

三角祐生、下川恒生、堀池篤、大柳文義、西尾誠人、劔持広知、村上晴泰、高橋利明、山本信之、岡本浩明 高齢者の進展型小細胞肺がんに対するカルボプラチン+イリノテカン併用療法のfeasibility study最終報告 第54回日本肺癌学会総会

梅村茂樹、細見幸生、野上尚之、西尾誠人、山本昇、中川和彦、瀬戸貴司、里内美弥子、阿部徹哉、近森研一、野村尚吾、後藤功一、田村友秀、大江裕一郎 進展型小細胞肺がん(ED-SCLC)に対するCPT-11維持療法の忍容性試験 第55回日本肺癌学会総会

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾 誠人(NISHIO Makoto)

公益財団法人がん研究会有明病院・呼吸器

内科部長

研究者番号：00281593

(2)研究分担者

石川 雄一 (ISHIKAWA Yuichi)

公益財団法人がん研究会がん研究所・病理  
部部長

研究者番号：80222975