

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590495

研究課題名(和文) 微小乳頭状および簇出型浸潤様式の機序に関する包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive study on the mechanisms involved in micropapillary or budding type tumor invasion

研究代表者

鍋島 一樹 (Nabeshima, Kazuki)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40189189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌における微小乳頭状構造(micropapillary pattern, MPP)はリンパ節転移と関連する有意な予後不良因子である。我々はMPP陽性肺腺癌では、大腸癌浸潤先端部におけるtumor buddingと類似した簇出型浸潤様式small cluster invasionを高率に呈し、リンパ管侵襲を伴うことを報告した。この簇出型浸潤様式の機序の解明が本研究の目的である。肺癌組織のmicrodissectionとmiRNA arrayによって、MPP陽性腺癌において有意に発現増強したhsa-miR-663bを見出し、in situ hybridizationにて局在を確認した。

研究成果の概要(英文)：The micropapillary pattern (MPP) observed in lung adenocarcinoma is a poor prognostic factor. We previously reported that MPP-positive adenocarcinoma were significantly associated with presence of small cluster invasion, which is similar to tumor budding at the invasion front of colon adenocarcinoma. To elucidate the mechanisms in such tumor budding type tumor cell invasion is the purpose of this study. By microdissection, extraction of RNA, and miRNA array performed in human lung adenocarcinoma tissue sections with or without MPP, we identified hsa-miR-663b, which was significantly upregulated in MPP-positive carcinomas. Localization of the miRNA signals was shown by in situ hybridization using Locked RNA.

研究分野：病理学

キーワード：簇出型浸潤 miRNA 肺癌 micropapillary pattern tumor budding sprouting 大腸癌 頭頸部癌

## 1. 研究開始当初の背景

肺腺癌において、微小乳頭状パターン [micropapillary pattern, MPP; 癌細胞の微小な乳頭状構造で線維血管性芯を持たず、その外

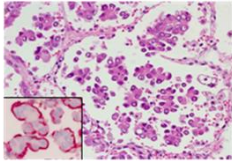


図1. 微小乳頭状構造(MPP)  
(inset: MPP表面におけるMUC-1発現)

表面には糖蛋白の1つである MUC-1 が発現する(図1)]を呈するものは有意にリンパ節転移が多く、予後が悪い(Am

J Surg Pathol 27:101, 2003)。我々は、癌の癒痕部における癌細胞の微小な集簇での浸潤様式に着目して、これを small cluster invasion (SCI)

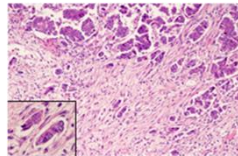


図2. MPP陽性腺癌の癒痕部におけるSCI (inset: SCIを示す癌細胞の拡大)

と呼び (これはかつて今井環博士によって提唱された簇外型浸潤に相当する)、MPP 陽性腺癌との関連をみた。SCI

は MPP 陽性腺癌に有意に多く認められ (図2)、MPP 陽性/SCI 陽性の腺癌では高率にリンパ管侵襲、リンパ節転移をきたして予後不良であるが、同じく MPP 陽性群であっても、SCI 陰性ではリンパ節転移が少なかった (Virchows Arch 454:61, 2009)。つまり MPP-SCI-リンパ管侵襲-リンパ節転移という一連の流れが推定される。従って SCI は MPP からリンパ節転移へ至る missing link をつなぐ重要なプロセスであり、その機序の解明はリンパ節転移抑制のために重要である。

一方我々はこれまで、大腸癌をモデルとして、癌細胞浸潤の基礎的メカニズムの解明にも取り組み、癌細胞の浸潤・移動様式には単一細胞移動のみならず、細胞間接着を部分的に解除しながら細胞集団として動くメカニズムもあることを cohort migration (Frankl 等による collective cell migration に相当, Nature Rev Cancer 3:362, 2003) として報告し、そのメカニ

ズムを *in vitro* cohort migration model を用いて明らかにしてきた (Cancer Res 60:3364, 2000)。

このタイプの浸潤・移動様式には、hepatocyte growth factor (HGF)-c-MET 系が motogenic factor として関与する。また、大腸癌浸潤先端

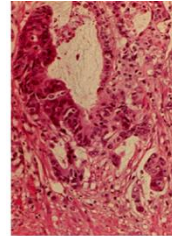


図3. 大腸癌浸潤先端部における tumor budding

部においては、簇外型浸潤様式 tumor budding (TB) が認められ (図3)、これを示す癌では有意にリンパ節転移が多い。

肺腺癌における SCI もこの TB も小集簇による移動という cohort migration の1型であり、共通の機序が働いているものと考えている。この機序を解明は、両癌におけるリンパ節転移の抑制と予後の改善に直結している。

## 2. 研究の目的

本研究では、簇外型浸潤様式のメカニズムの解明を目的とした。その為、肺癌、大腸癌、頭頸部癌における SCI/TB 型浸潤様式の臨床病理学的解析と、外科病理材料における microdissection と miRNA array を用いた病理組織学および分子生物学的アプローチによって、このタイプの浸潤に不可欠な役割を果たす分子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

この研究計画は、人体病理学的観察に基づいた実験病理学的研究を基本としており、(1) 一方で肺癌、大腸癌、頭頸部癌における SCI/TB 型浸潤様式の意義について臨床病理学的に解析し、(2) 他方で外科病理標本を用いた microdissection と miRNA array によるスクリーニングから簇外型浸潤関連分子を拾い上げる。

(2) に関しては、肺腺癌組織のパラフィン切片(FFPE)より、laser capture microdissection (PixCell Iie LCM System, Arcturus) を用いて、SCI を伴う MPP 陽性腺癌 (簇出型浸潤部を有する癌) とその対照としての非浸潤性(上皮内)腺癌および MPP 陰性腺癌 (簇出型浸潤部を有しない癌) から total RNA を抽出し、miRNA array を施行した。Array は高価であるため、多数例での array pattern の解析を目的とするのではなく、典型的 6 例から得られた解析に基づいて候補 miRNA を拾い上げ、その実際の発現を real time RT-PCR 法によって、数十例の症例組織で確認し、さらに特異性の確認されたものに関しては locked RNA probe を用いた FISH 法にて局在も確認して、簇出型浸潤関連 miRNA を決定していくこととした。

miRNA array には、FlashTag Biotin HSR RNA labeling kit (Affymetrix) と GeneChip miRNA 3.0 Array (Affymetrix) を、real time RT-PCR 法には Mir-X™ miRNA qRT-PCR SYBR® Kit を使用した。FISH 法は miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (Exiqon) に従った (Methods 52: 375-381, 2010)。得られたシグナルは画像解析ソフトウェア Tissue Studio® (Definiens) を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 簇出型浸潤様式に関する臨床病理学的解析

①: 肺腺癌の 2011 年に IASLC 新分類 (現在の WHO 2015 分類) が提唱され、微小乳頭型が新たに腺癌分類に加わったが、MPP に関しては本当にその亜型のための指摘でよいのか、従来のごとく腫瘍全体の 10% 以上を占める場合には診断に付記すべきか、肺腺癌 435 例を用いて MPP の有無と予後の関係について再

確認を行った。その結果、MPP 陰性例と比較して、微小乳頭型症例および腫瘍全体の  $\geq 10\%$  に MPP が認められる MPP 陽性症例では、5 生率は OS、DFS 共に有意に低下していたが、後二者間での有意差はなかった。従って MPP は優位型のみならず、 $\geq 10\%$  に認められるものは指摘すべきだと考えられた。

②: 大腸癌 139 例の浸潤先端部における TB の評価に関して、ケラチン免疫染色の応用によって、HE 染色のみの評価では low-grade

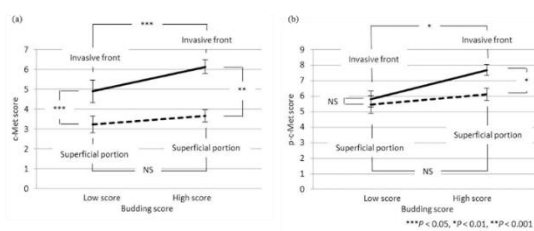


図4. Budding low-/high-score の腫瘍部位による c-Met (a) および p-c-Met score (b) の比較。Satoh et al., Cancer Sci 2014, 105:1487-1495 より一部改変

の TB 群とされた中から、無再発生存期間のより短い一群を抽出できた (Cancer Sci 105:1487-1495, 2014)。浸潤先端部における c-Met およびリン酸化 c-Met の発現の程度は TB の程度と相関し (図 4)、さらにリン酸化 c-Met の高発現は無再発生存期間の短縮と相関することを初めて明らかにした。

このリン酸化 c-Met に関しては、肺腺癌の MPP 陽性群でも同様に、陰性群に比較してその発現が有意に高く、MPP 陽性群およびリン酸化 c-Met 高発現群は有意に予後不良である (Lung Cancer 82: 413-419, 2013)。簇出型浸潤様式を示す MPP 陽性肺腺癌と大腸癌高 TB 群では、共通して HGF-c-MET 系を介した機構が作用していることが推定された。

③: 頭頸部癌では外耳道癌 46 例を用いて、浸潤先端部における簇出型浸潤様式 TB とそれに関連する分子 laminin 5 $\gamma$ 2 (Ln5- $\gamma$ 2) の発現について免疫組織化学的に検討し、臨床事項との相関に関して解析を行った。病期分類は

ピッツバーグ分類を用いた。TB の程度が高いほど、また Ln5-γ2 の発現がびまん型で、その程度が高いほど、患者の生存率は低く、高度の TB は単変量および多変量解析にて有意な独立した予後不良因子であることがわかった。さらに、III-IV 期の進行癌において、TB の程度が低く、Ln5-γ2 発現が低いものでは、有意に予後が良好であった (SpringerPlus 4: 814, 2015)。TNM 分類に基づくピッツバーグ分類のみでは正確な予後をつかめないことが現在の問題点の1つであったので、この予後を細分化できる因子の発見は臨床的に重要な意味を持っている。

## (2) 簇型浸潤関連 miRNA の解析

### ① : miRNA array とデータ解析

MPP を示す浸潤癌 vs MPP の無い非浸潤癌 (Array①)、MPP を示す浸潤癌 vs MPP の無い浸潤癌 (Array②)、MPP の無い浸潤癌 vs MPP の無い非浸潤癌 (Array③) の組み合わせで、それぞれ 2 症例の FFPE より micro-dissection を用いて total RNA を抽出し、micro-array 解析を行った。Microarray data の標準化および解析には Agilent Technologies 社の GeneSpring を使用。3 回のマイクロアレイ全てで確認された成熟型 microRNA は 261 個だった。Venn Diagram 解析のすべての組み合わせで 3 倍以上の up-regulate、2.5 倍以上の down-regulate したもの、および Volcano Plot 解析にて有意に up/down-regulate したものを抽出。得られた解析結果から Heat Map 図を作成し、クラスターに分類。MPP 関連 miRNA を解析する目的で、Array①で有意な変動があり、Array③で変動のない microRNA 10 個を抽出。一方、Array②で増減いずれかの変動があり、かつ Array③で変動のない microRNA 6 個も抽出し、それぞれ real time RT-PCR にて確認した。内在性コントロー

ルは RNU6B を使用した。

まず、クラスター化により MPP 関連および浸潤 (Inv) 関連 miRNA を 10 個に絞り込んだ。この 10 個の MPP 関連 miRNA について、Real-time PCR を用いて発現確認を行い、最も明瞭に再現性をもって発現増加あるいは低下の認められた 2 つを選択した。浸潤性肺癌の中で MPP の有無で有意に発現が異なる miRNA が hsa-miR-663b、浸潤性の有無で有意に発現が異なる miRNA が hsa-miR-1273f であった。

### ② : ヒト癌組織における抽出 miRNA の発現と局在

ヒト肺癌症例においてこの 2 つの発現を検

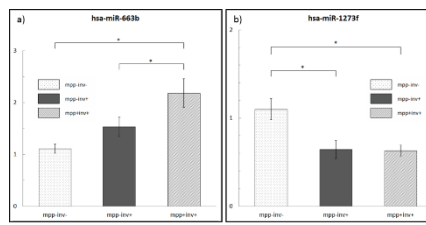


図5. RT-PCRを用いたヒト肺癌組織における hsa-miR-663b (a) および hsa-miR-1273f (b) の発現比較。

討する  
目的で、  
MPP-  
/Inv- 群  
23 症例、  
MPP-

/Inv+ 群 24 症例、MPP+/Inv+ 群 28 症例の FFPE サンプルから microRNA を抽出し、real-time PCR 法を施行した。hsa-miR-663b は浸潤癌において、MPP の存在によって有意な発現亢進を認めた ( $2.19 \pm 0.28$  vs  $1.53 \pm 0.19$ ,  $p < 0.05$ ) (図 5)。一方、hsa-miR-1273f は MPP の有無にかかわらず、浸潤癌において有意な発現低下を認めた ( $0.64 \pm 0.10$  vs  $1.09 \pm 0.12$ ,  $p < 0.01$ )。浸潤癌および MPP の存在によって有意に発現増

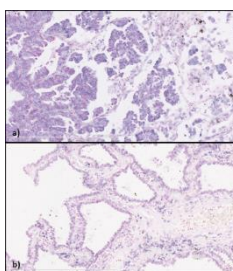


図6. hsa-miR-663b の肺癌における局在。(a) MPP 陽性浸潤性肺癌。(b) 非浸潤性肺癌。

強した hsa-miR-663b に関して、そのシグナルの局在を Locked Nucleic Acid を用いた in situ hybridization にて確認した (シグナルは NBT-BCIP にて青色に染まる)。シグナルは一部の間質細胞や炎症細胞に

も見られるが、主として癌細胞に局在し、非浸潤癌よりも MPP 陽性浸潤癌に強いシグナルを認める傾向を示した(図 6)。現在、引き続きその定量化と解析に取り組んでいる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Okado Y, Aoki M, Hamasaki M, Koga K, Sueta T, Shiratsuchi H, Oda Y, Nakagawa T, Nabeshima K. Tumor budding and laminin5- $\gamma$ 2 in squamous cell carcinoma of the external auditory canal are associated with shorter survival. SpringerPlus 4: 814, 2015 (11 pages) (査読あり)
- ② Satoh K, Nimura S, Aoki M, Hamasaki M, Koga K, Iwasaki H, Yamashita Y, Kataoka H, Nabeshima K. Tumor budding in colorectal carcinoma assessed by cytokeratin immunostaining and budding areas: Possible involvement of c-Met. Cancer Sci 105:1487-1495, 2014 (査読あり)
- ③ Koga K, Hamasaki M, Kato F, Aoki M, Ha-yashi H, Iwasaki A, Kataoka H, Nabeshima K. Association of c-Met phosphorylation with micropapillary pattern and small cluster invasion in pT1-size lung adenocarcinoma. Lung Cancer 82: 413-419, 2013 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 宮崎健, 大門康子, 青木光希子, 濱崎慎, 末田尚之, 中川尚志, 鍋島一樹. 外耳道扁平上皮癌における tumor budding および laminin5- $\gamma$ 2 の発現と予後との関連. 第 47 回日本結合組織学会学術大会, 2015 年 5 月 15-16 日, 東京
- ② Okado Y, Aoki M, Sueta H, Shiratsuchi H, Nakagawa H, Nabeshima K. Tumor budding in squamous cell carcinoma of the external ear canal is associated with shorter survival. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 横浜

- ③ 佐藤啓介, 二村聡, 濱崎慎, 青木光希子, 古賀佳織, 林博之, 山下裕一, 鍋島一樹. 大腸癌 tumor budding 評価におけるサイトケラチン免疫染色の有用性と cMet の関連について. 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6-8 日, 札幌
- ④ 加藤文章, 濱崎慎, 林博之, 岩崎昭憲, 鍋島一樹. pT1 肺腺癌( $\leq 30\text{mm}$ )の腫瘍サイズによる浸潤形態の比較検討 -特に Micropapillary predominant の意義について-. 第 53 回日本肺癌学会総会 2012 年 11 月 8-9 日, 岡山

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋島 一樹 (Nabeshima, Kazuki)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号 40189189

(2) 研究分担者

古賀 佳織 (Koga, Kaori)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号 40572433

青木 光希子 (Aoki, Mikiko)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号 80469379

濱崎 慎 (Hamasaki, Makoto)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号 90412600

(3) 連携研究者

角田 俊之 (Tsunoda, Toshiyuki)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号 70444817