

令和元年6月28日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10252

研究課題名(和文)術後再発制圧のための肺癌特異的蛍光プローブの開発

研究課題名(英文)Development of lung cancer specific fluorescent probe for post operative recurrence control

研究代表者

似鳥 純一 (Jun-ichi, Nitadori)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40424486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌予後因子について研究がなされ、肺腺癌組織亜型が注目されている。その中でも微小乳頭癌(Micropapillary)は特に予後不良因子であることが分かってきているものの、現状では組織亜型までは踏み込んで手術術式が検討されていない。その原因として組織亜型が術中迅速病理学検査にて診断が不可能であることが上げられる。そこで、組織に直接滴下・噴霧することで蛍光として癌細胞を認識することができる癌特異的蛍光プローブを用いてreal timeに肺癌および組織亜型診断の診断・可視化が可能であれば、再発防止、予後良好となると考えた。実用性の高い肺癌特異的蛍光プローブの探索・同定のための実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術中に迅速かつ簡易的に予後不良因子となり得る組織型、遺残癌細胞が同定できる癌特異的蛍光プローブの創製、活用は外科医にとって手術切除範囲決定の補助になりうると考える。これにより、わが国のがん死亡者数第一位の肺癌の予後改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer prognostic factors have been studied and lung adenocarcinoma histologic variants have been noted. Among them, micropapillary adenocarcinoma has been found to be a particularly poor prognostic factor, but at present the operative procedure has not been examined by stepping into tissue subtypes.

As the cause, it is raised that the diagnosis of tissue subtypes can not be made by intraoperative rapid pathological examination. Therefore, if it is possible to diagnose and visualize lung cancer and tissue subtype diagnosis in real time using cancer specific fluorescent probes that can recognize cancer cells as fluorescence by direct dropping and spraying onto tissues, it is possible to prevent recurrence. It was thought that the prognosis would be good. We conducted experiments for searching and identifying highly practical lung cancer-specific fluorescent probes.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 蛍光プローブ 肺腺癌 組織亜型 Micropapillary 癌特異的蛍光プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌はわが国のがん死亡者数第一位の疾患であり、早期肺癌は全体の約3割を占め、肺腺癌は全体の約半分を占める。肺癌に対する標準術式は肺葉切除であるが、CT画像上、すりガラス陰影を呈する小型肺腺癌は病理学的に低悪性度を反映しており、切除成績良好であるため日本を中心に小型肺腺癌に対する縮小手術(部分切除・区域切除)の臨床試験が実施されている。しかし、肺癌の予後を示す分類として腫瘍内部の組織亜型までは踏み込んで検討されず、手術術式に反映されないのが現状である。WHOから肺腺癌組織亜型分類が定義され、その予後因子について研究がなされ、微小乳頭癌(Micropapillary: MIP)は特に予後不良因子であることが分かってきた。しかし、腫瘍内部の組織亜型が術中迅速病理学検査にて診断可能かどうか検討した後ろ向き研究では、術中凍結標本ではMIPを正確に診断することが困難であるという結果となった。また、小型肺腺癌の組織亜型が手術術式(肺葉切除、縮小手術)に与える影響についても検討したところMIPに対して縮小手術を施行した場合、局所再発を来しやすいことが分かった。現在、小型肺腺癌に対して縮小手術が行われつつあるが「組織亜型を考慮して切除範囲を決定した方がいい」と考えられつつある。

癌特異的蛍光プローブとは、癌細胞に発現する酵素と反応する機能的な蛍光色素であり、組織に直接滴下・噴霧することで蛍光として癌細胞を認識することができる。酵素反応を利用するため、反応時間も短く、real timeに可視化が可能な画期的な技術である。迅速かつ簡便に組織亜型を診断可能な、実用性の高い癌特異的蛍光プローブを同定するため基礎研究を進めた。

## 2. 研究の目的

癌特異的蛍光プローブを用いてMIP componentを含めた肺腺癌組織亜型の術中迅速診断および縮小手術時の切離肺断面遺残癌細胞検出のための基礎研究を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

新規癌特異的蛍光プローブが肺癌特異的蛍光プローブとなり得るか肺癌細胞株および手術検体を用いて検討を行った。実験方法は以下の通りである。

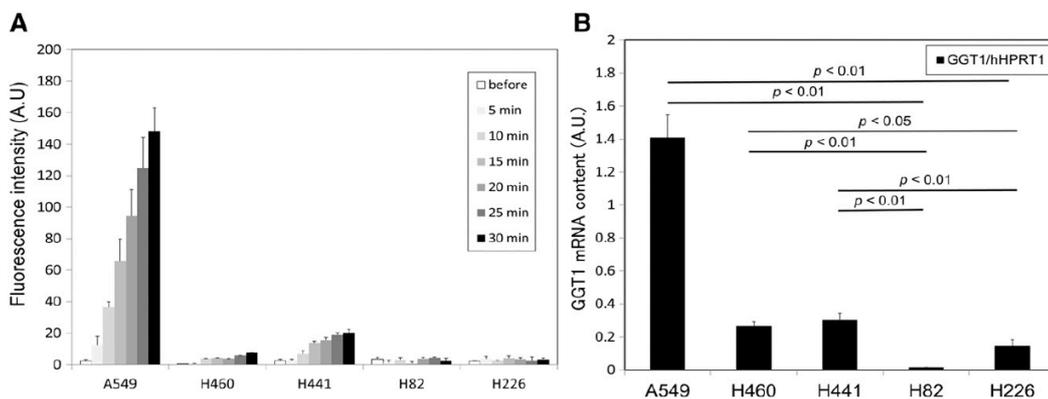
- ① 癌細胞に高発現しているとされる酵素 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT)に対する蛍光プローブ $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG)を用いて、肺癌細胞株および手術検体を用いて検討を行った。
- ② 新規特異的蛍光プローブを用いて、肺癌組織型による蛍光強度の違い、標的酵素の同定・解析を行った。さらに肺腺癌細胞(特にMIP component)の酵素・蛍光局在を同定し、迅速診断に適した蛍光プローブを探索した。

## 4. 研究成果

### ① 肺癌細胞株に対する蛍光プローブ gGlu-HMRG の有効性について検討を行った。

Cell lysate の状態に細胞を加工して gGlu-HMRG との反応性を確認した。Cell lysate の状態であっても腺癌細胞株(A549, H441)、大細胞癌(H460)においては、経時的な蛍光強度の上昇を認めたが、小細胞癌(H82)、扁平上皮癌(H226)においては変化を認めなかった。(図 A) この結果は生細胞イメージングにおける蛍光強度の変化とほぼ同様な結果となった。すなわち、肺癌細胞株においては gGlu-HMRG に反応する GGT 活性をもつ肺癌細胞株 (A549, H441, H460)ともたない肺癌細胞株(H82, H226)があることが示された。

gGlu-HMRG と反応する酵素が GGT であるか確認するため、GGT の subtype のうち GGT1 の mRNA 発現レベルを qRT-PCR にて解析を行った。qRT-PCR の結果から生細胞イメージングやライセートアッセイにて gGlu-HMRG と反応が確認出来た肺癌細胞株(A549, H441, H460)においては、GGT1 の相対的遺伝子発現の値が高いが、反応の確認ができなかった肺癌細胞株(H82, H226)では、その発現が低いことが確認された。(図 B) 背景には腫瘍に発現する酵素活性に違いがあると考えられた。すなわち、癌特異的蛍光プローブは、肺癌の組織型によって異なる酵素活性を高感度に検出できる可能性があることが示唆され、蛍光画像から癌細胞を認識可能であることを証明できた。



### ② 新規癌特異的蛍光イメージングに応用できるよう他のアミノ酸を結合させた蛍光プローブを創製した。また、病理学的診断により組織型を同定した手術検体 (73 症例) を用いて、gGlu-HMRG をはじめ、新規創製した peptide-HMRG、peptide-2Me-SiR など多数の蛍光プローブを用いて正常肺と腫瘍との蛍光上昇値の違いを検討した。

肺癌手術検体全体では gGlu-HMRG を用いた場合、診断率は 43.8%、特異度 84.9%であった。臨床病理学的には腺癌、女性、非喫煙者に反応しやすい傾向を認めたが、扁平上皮癌、男性、喫煙者では反応しにくい傾向にあった。組織型では蛍光強度の比較的強い肺腺癌 (25 症例) に着目した。ライセートスクリーニング結果をもとに選定したプローブ (30 種類) の中で 3 種類の蛍光プローブが平均 AUC : 0.83 (0.815-0.84) であり、識別能力が良好であることが証明された。これらの癌特異的蛍光プローブは先行研究で用いた gGlu-HMRG よりも有用であることがわかった。しかし、組織型による各種蛍光プローブの蛍光上昇の違いに関して検討可能であったが、MIP などの組織型別の蛍光局在の解明および術中検出法を確立するまでには至らなかった。今後、症例集積を含めてさらに研究を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Kadota K, **Nitadori J**, Sima CS, Ujii H, Rizk NP, Jones DR, Adusumilli PS, Travis WD. Tumor Spread through Air Spaces is an Important Pattern of Invasion and Impacts the Frequency and Location of Recurrences after Limited Resection for Small Stage I Lung Adenocarcinomas. Journal of Thoracic Oncology 2015 May;10(5):806-14
- ② Yeh YC, Kadota K, **Nitadori J**, Sima CS, Rizk NP, Jones DR, Travis WD, Adusumilli PS. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification predicts occult lymph node metastasis in clinically mediastinal node-negative lung adenocarcinoma., European Journal Cardio-Thoracic Surgery 2016 Jan;49(1):e9-e15
- ③ Hino H, Kamiya M, Kitano K, Mizuno K, Tanaka S, Nishiyama N, Kataoka K, Urano Y, **Nakajima J**, Rapid Cancer Fluorescence Imaging Using A  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Specific Probe For Primary Lung Cancer. Translational Oncology 2016 Jun;9(3):203-10.
- ④ Yoshida Y, **Nitadori J**, Shinozaki-Ushiku A, Sato J, Miyaji T, Yamaguchi T, Fukayama M, Nakajima J. Micropapillary histological subtype in lung adenocarcinoma of 2 cm or less: impact on recurrence and clinical predictors. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2017 May;65(5):273-279.
- ⑤ Bains S, Eguchi T, Warth A, Yeh YC, **Nitadori J**, Woo KM, Chou TY, Dienemann H, Muley T, Nakajima J, Shinozaki-Ushiku A, Wu YC, Lu S, Kadota K, Jones DR, Travis WD, Tan KS, Adusumilli PS. , Procedure-Specific Risk Prediction for Recurrence in Patients Undergoing Lobectomy or Sublobar Resection for Small (2 cm) Lung Adenocarcinoma: An International Cohort Analysis. J Thorac Oncol. 2019 Jan;14(1):72-86

### 〔学会発表〕（計 7 件）

- ① Haruaki Hino, Mitsuaki Kawashima, Tomoki Murayama, Junji Ichinose, Kentaro Kitano, Kazuhiro Nagayama, **Jun-ichi Nitadori**, Masaki Anraku, Tomohiro Murakawa, Kazue Mizuno, Sayaka Tanaka, Mako Kamiya, Nobuhiro Nishiyama, Kazunori Kataoka, Kouhei Miyazono, Yasuteru Urano, Jun Nakajima Rapid Cancer Imaging By GGT-targeted Fluorescence Probe For Primary Lung Cancer, 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2015 年
- ② 日野春秋、神谷真子、檜山紀子、唐崎隆弘、川島光明、村山智紀、桑野秀規、長山和弘、**似鳥純一**、安樂真樹、佐藤雅昭、浦野泰照、中島 淳、肺悪性腫瘍に対する蛍光プローブの開発と適応、第 12 回東京呼吸器リサーチフォーラム、2015 年
- ③ Jun-ichi Nitadori, Yukihiro Yoshida, Aya Shinozaki-Ushiku, Hideki Kuwano, Kazuhiro Nagayama, Masaki Anraku, Masaaki Sato, Masashi, Fukayama, Jun Nakajima, 16th World Conference on Lung Cancer（国際学会）2015 年
- ④ Keita Nakao, Jun-ichi Nitadori, Shigeki Morita, Hideki Kuwano, Kazuhiro Nagayama, Masaki Anraku, Aya Shinozaki-Ushiku, Masaaki Sato, Masashi Fukayama, Jun Nakajima, A Retrospective Analysis of Patients with Small Lung Adenocarcinoma(<2cm) by New World Health Organization Classification, 17th World Conference on Lung Cancer（国際学会）2016 年
- ⑤ Yutaka Sawai, **Jun-ichi Nitadori**, Tsuyoshi Takahashi, Kentaro Kitano, Kazuhiro Nagayama, Masaki Anraku, Masaaki Sato, Jun Nakajima, New Clinical T Classification Is Associated with

Small Invasive Adenocarcinoma with Solid Histologic Component., IASLC 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会) 2017 年

- ⑥ Tsuyoshi Takahashi, **Jun-ichi Nitadori**, Shigeki Morita, Mitsuaki Kawashima, Hideki Kuwano, Kazuhiro Nagayama, Masaki Anraku, Aya Shinozaki-Ushiku, Masaaki Sato, Masashi Fukayama, Jun Nakajima, Is sublobar resection for stage I invasive adenocarcinoma with solid histological subtype enough for cure? 25 th European Conference on General Thoracic Surgery (国際学会) 2017 年
- ⑦ 中尾啓太、似鳥 純一、唐崎 隆弘、北野 健太郎、長山 和弘、佐藤 雅昭、中島 淳  
TNM 分類 第 8 版 における 病理病期 StageIA1 肺腺癌 の 予後 因子の 検討  
第 36 回日本呼吸器外科学会学術集会 2019 年
- 〔図書〕 (計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
- ホームページ等:なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者 (3 名)

- ① 研究分担者氏名: 中島 淳  
ローマ字氏名: Nakajima Jun  
所属研究機関名: 東京大学  
部局名: 医学部附属病院  
職名: 教授  
研究者番号 (8 桁): 90188954
- ② 研究分担者氏名: 安楽真樹  
ローマ字氏名: Anraku Masaki  
所属研究機関名: 東京大学  
部局名: 医学部附属病院  
職名: 特定研究員  
研究者番号 (8 桁): 70598557
- ③ 研究分担者氏名: 長山和弘  
ローマ字氏名: Nagayama Kazuhiro  
所属研究機関名: 東京大学  
部局名: 医学部附属病院  
職名: 助教  
研究者番号 (8 桁): 00647935

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。