

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10262

研究課題名(和文) 原発性非小細胞肺癌における肺癌幹細胞および肺幹細胞遺伝子の意義の検討

研究課題名(英文) Significance of lung cancer stem cell-related gene and lung stem cell-related genes in primary non small cell lung carcinoma

研究代表者

波呂 祥 (HARO, Akira)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90546558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肺癌での遺伝子発現解析。[1] 癌幹細胞関連遺伝子CD133は、全生存率( $p=0.0001$ )および無再発生存率( $p=0.0378$ )と予後不良因子であった。[2] (1) Notch1陽性症例は腫瘍径が小さく、さらに女性、EGFR遺伝子変異と関連を認めた( $p<0.03$ ,  $p=0.031$ ,  $p=0.002$ )。予後に有意さは認めなかった。(2) YAPは、腺癌症例で発現が高い傾向があるも、有意さは認めなかった。5年生存率は、有意さは認められなかった。

【結果】 CD133は予後不良因子で、今後有用なマーカーとなり得る。またNotch1およびYAPは、今後無再発生存率や、化学療法での検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The object of this study is to investigate the significance of lung cancer stem cell-associated gene and lung stem cell-associated genes.[1] The lung cancer stem cell-associated gene CD133 was a significant poor prognostic factor in both all-over survival and disease-free survival, respectively  $p=0.0001$  and  $p=0.0378$ .

[2] Lung Stem cell associated genes. (1) Notch1 Protein was expressed significantly in smaller-sized tumor ( $p<0.003$ ). Furthermore, Notch1 had significant relations with female and EGFR mutation( $p=0.031$   $p=0.002$ , respectively). Notch 1 was not a prognostic factor. (2) Yap protein was slightly more in adenocarcinoma, but it was not significant. Yap was not a prognostic factor.

[Conclusions] CD133 was a poor prognostic factor. Notch1 and YAP was not significant prognostic factor, but it needs to be investigated from the disease-free survival or anticancer drug resistance.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌幹細胞 肺組織幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

1) 原発性肺癌幹細胞およびその微小環境(ニッチェ)に関して

原発性非小細胞肺癌においては、扁平上皮癌および肺腺癌、肺腺扁平上皮癌の癌発生は、肺の中核および末梢など、気管、肺泡などに存在する肺組織幹細胞より発生されていると考えられている(Steele VE et al, J Natl Cancer Inst. 1981)。また CD133 陽性肺癌幹細胞では癌関連遺伝子の発現の上昇すること(V Tirino, Cell Death and Disease. 2013)が報告されている。Oct4/Nanogなどの癌幹細胞遺伝子は、上皮間葉転換機構を引き起こし、予後を悪化することが報告されている(Chih-Hwa Chiou et al., Cancer Research. 2010)。しかしながら、CD133 遺伝子をはじめとする、肺癌幹細胞およびその微小環境(ニッチェ)に関しては、実際の原発性肺癌(in vitro)での報告は、ほとんどなされていないのが現状である。

2) 肺発生における肺幹細胞と、肺癌との関連に関して

近年、肺発生時、また成人肺の肺障害時の1型および2型肺胞上皮細胞の発生に Hippo pathway が重要な役割を果たしていることが明らかにされている(Zao et al., Dev Cell. 2014)。肺再生においては FGF-FGFR-Sprouty, BMP-BPR-Gremlin, Shh-PTtc-Hip, Wnt- $\beta$ -catenin, PDGF, HGF, VEGF signal が知られている。特に Hippo pathway に関与する, Yap 遺伝子の過剰発現においては、扁平上皮化生が引き起こされていること(Zhao et al. Dev Cell. 2014)より、扁平上皮癌への initiation の可能性が考えられる。

現在、原発性非小細胞肺癌における治療、特に化学療法では、組織型を考慮して治療選択がなされることが多く、癌幹細胞の発現に関して考慮されていない。しかしながら、同じ組織型においても、抗癌剤の感受性などの相違により治療効果が異なることが多く、癌幹細胞による薬剤耐性獲得などが関与していることが予想されており、今後、癌幹細胞マーカーあるいは発生に関与する新たなマーカー遺伝子についての検討も必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

原発性肺癌は、現在、癌死の一位であり、集学的治療にも関わらず、再発を来すことが多い。再発や転移のメカニズムには、癌幹細胞の関与が指摘されており、その微小環境(ニッチェ)の解明も望まれている。肺癌幹細胞に、肺発生における肺幹細胞のマーカー、分化マーカーの発現が報告され、その遺伝子群が、肺癌の再発、転移のメカニズムに密接な関連性を持つことが示唆されている。

本研究では、原発性肺癌において1)肺癌幹細胞遺伝子およびその微小環境(ニッチェ)、2)肺発生に関与する肺幹細胞遺伝子との関連性を調べる。原発性肺癌での組織型別の発現の有無およびその相関性、またその予後な

どを含めて、解析を行い、肺癌のカテゴリーの構築を目的とする。

我々は、肺発生に関与する遺伝子と肺癌幹細胞およびその微小環境(ニッチェ)との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本実験は、以下の解析を行うことにより、肺癌における肺癌幹細胞、その微小環境との関わり、また肺幹細胞遺伝子の発現に関して検討を行う。さらに癌全体の調節機構を明らかにする。以下の項目を行う。

[1] 原発性肺癌切除標本を用いての遺伝子発現解析: ヒト原発性肺癌切除標本を用いて(1)肺癌幹細胞遺伝子およびニッチェに関連する遺伝子群、(2)肺幹細胞に関連する遺伝子群の発現の有無およびその臨床的意義を検討する。

[2] 肺癌細胞株を用いての遺伝子発現解析: 肺癌細胞株を用いて、各遺伝子群の意義および詳細なメカニズムの検討を行う。

[1] 原発性肺癌切除標本を用いて遺伝子発現解析

目的: ヒト切除肺標本を用いて、遺伝子の発現の有無およびその局在を検討する。また発現の有無による予後の解析を行う。

方法: 2008年1月より2009年12月までに外科的切除された115症例の原発性肺癌切除標本を用いて、以下の遺伝子群の発現の有無を調べる。

評価方法 肺切除標本において、(a)肺癌幹細胞および微小環境(ニッチェ)に関連する遺伝子群、(b)肺発生および再生に関連する遺伝子群の発現の有無を調べる。

(a) 肺癌幹細胞および微小環境(ニッチェ)に関連する遺伝子群

1. 肺癌関連遺伝子マーカー: CD133,  
2. 遺伝子カスケード: PDGF, FGF, IGF-1, HGF, Wnt, LIF

(b) 肺発生および再生に関連する遺伝子群  
肺幹細胞遺伝子マーカー: Yap, Id2, Sox9  
さらに我々は肺発生において distal tip に発現する、Id2 および Sox9 遺伝子が検討を行い、それぞれの mRNA の発現は正常肺組織より高いことを確認した。また Id2 遺伝子に関して原発性肺癌においては、Id2 遺伝子の発現と予後との相関を症例数を増やして検討する。

## 4. 研究成果

[1] 原発性肺癌切除標本を用いて遺伝子発現解析

(1) 我々は、2008年1月より2009年12月までに外科的切除された115症例の原発性肺癌切除標本を用いて、ヒト切除肺標本を用いて、遺伝子の発現の有無およびその局在を検討した。

(A)肺癌幹細胞および微小環境(ニッチ)に関連する遺伝子 CD133

(a)まず、正常肺および肺癌組織におけるCD133のmRNA発現量の比較を行った。内在性コントロールとしては、 $\beta$ -actinを用いた。正常肺および肺癌組織でのCD133のmRNAの発現量は、有意に肺癌組織でCD133の発現量が高いこと( $p=0.018$ )が示された。

(b)次に我々は、CD133のタンパク発現に関して、調べた。

(b-1)肺癌組織での発現

上記のように、CD133陽性症例では、肺癌細胞の核を中心に染色され、細胞質にも一部染色された結果であった。

(b-2)CD133の陽性および陰性に関しては、過去の報告をもとに、染色強度(0; none, 1: weak, 2; middle, 3; strong)に分類、陽性細胞率(陽性腫瘍細胞/腫瘍細胞 10%)に分類した。強度2-3かつ、陽性細胞率10%以上をCD133陽性症例と判定した。

(b-3)肺癌切除症例における臨床因子との相関を調べた。年齢、性別、組織型、分化度、いずれの臨床病理学的因子との相関との関連性を認めなかった。

(b-4)CD133陽性症例の予後に関して、全生存率および無再発生存率を検討した。CD133陽性症例は、CD133陰性症例と比較して、全生存率( $p=0.0001$ )および無再発生存率( $p=0.378$ )ともに予後が不良であり、原発性非小細胞肺癌において予後不良因子であることが判明した。

(B)肺発生および再生に関連する遺伝子群肺発生マーカーとして、Notch1およびYAPの発現を検討した。

(a-1)まず条件検討として、原発性肺癌24症例(腺癌10症例、大細胞癌1症例、小細胞肺癌2症例)、抗Notch1抗体(Santa Cruz)を用いて、条件検討を行った。

下記に、抗Notch1抗体による免疫化学染色法による、陽性症例を示すが、特に細胞膜にNotch1の発現を確認することができた。条件検討では、染色範囲(score: 0点(0-4%), 1点(5-25%), 2点(26-50%), 4点(76%以上)および染色強度(score: 0点(no stain), 1点(low), 2点(moderate), 3点(strong))で評価を行った。Score 3点未満をNotch1陰性症例、Score 3点以上をNotch1陽性症例とした。

原発性小細胞肺癌24症例で、Notch1のタンパク発現に関して、検討を行ったところ、50%(12症例/24症例)で、Notch1を発現しているという結果になった。

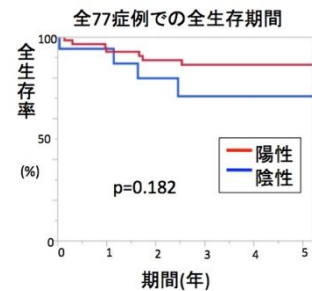
(a-2)臨床病理学的因子との検討

臨床病理学的因子での検討では、腫瘍径に関して、Notch1陽性症例では26( $\pm 18$ )mm、Notch1陰性症例では、43( $\pm 27$ )mmと、Notch1陰性症例では有意に腫瘍径が小さい結果であった( $p<0.03$ )。さらにNotch1と性別

(女性)との間に有意な相関( $p=0.031$ )を認めた。さらにEGFR遺伝子変異との間に相関を認めた( $p=0.002$ )。

(a-3)Notch1と予後との比較

これまで、Notch1に関しては、予後不良の報告があるが、本研究においては、Notch1陽性がやや予後が良い傾向にあるものの、有意さは認めなかった( $p=0.182$ )。また肺腺癌症例(葉切除以上)に関して検討を行ったが、有意さは認められなかった( $p=0.14$ )。



今後、無再発生存率や、化学療法での治療の検討が必要と考えられた。

(b-1)原発性肺癌においてYAPの発現を検討した。抗YAP抗体(Cell Signaling)を用いた免疫組織化学染色法で検討を行った。

判定は、過去の報告(Angela A. Steinhardt, 2015)を参考に、細胞質および核での評価を行った。細胞質での発現の判定は50%未満を弱陽性、50%以上を強陽性とし、核での発現の判定は10%未満を弱陽性、10%以上を強陽性とした。低発現および高発現を、陽性症例とした。

YAPの発現は、細胞核および細胞質に認められたが、症例により異なっていた。

各組織型毎の細胞核および細胞質での染色を示す。

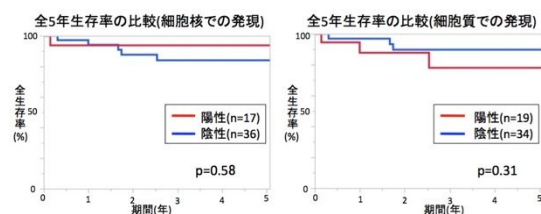
(b-2)原発性肺癌における発現の解析

下記の53症例で検討を行った。

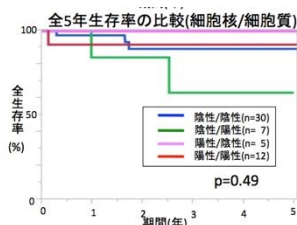
特に肺腺癌症例および非肺腺癌症例での検討を行ったが、肺腺癌症例で、細胞核および細胞質での発現がやや高い傾向にあるものの、有意さは認めなかった( $p=0.11$ および $p=0.06$ )。肺癌の分化度と、YAPとの相関性に関しても検討を行ったが、YAPの細胞核および細胞質での相関性は認めなかった( $p=0.71$ および $p=0.41$ )

(b-3)YAPの発現と予後との相関

YAPタンパクの発現別の5年生存率の比較を行った。核での発現、および細胞質での発現を、全5年生存率で、それぞれ比較したが、有意さは認められなかった( $P=0.58$ および $p=0.31$ )。



細胞核内および細胞質での YAP の発現の評価に関しては、細胞核および細胞質での検討がなされておらず、本研究では、細胞核および細胞質での検討を行った。核および細胞質での発現を検討すると、細胞核陰性/細胞質陽性の症例では有意さのないものの、全 5 年生存率では低い傾向であった。



本研究では、肺癌幹細胞関連マーカーCD133 は発現の頻度は低いものの、有意に予後不良因子であることが示され、今後の肺癌の治療を行う上では、有用なマーカーとなり得ると判断された。また肺組織幹細胞マーカーである、Notch1 および YAP の発現に関して免疫組織化学染色法で検討を行ったが、有意な予後因子ではないと考えられた。

#### 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)

Haro A, Komiya K, Taguchi Y, Nishikawa H, Kouda T, Fujishita T, Yokoyama H. A rare case of an intercostal lung herniation with fractures of the fifth and sixth ribs after thoracic surgery. *Int J Surg Case Rep.* 査読有、41、2017、473-476  
<https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2017.11.028>

Haro A, Kuramitsu E, Yamamoto I, Fukuyama Y. A case report of successful diagnosis of a pulmonary nodule by a survey of oncogenic mutations; primary lung carcinoma or pulmonary metastasis? *Int J Surg Case Rep.* 査読有、29、2016、176-179  
<https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2016.10.076>

Shimamatsu S, Okamoto T, Haro A, Kitahara H, Kohno M, Morodomi Y, Tagawa T, Okano S, Oda Y, Maehara Y. Prognostic Significance of Expression of the Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Factor Brachyury in Intrathoracic Lymphatic Spread of Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol.* 査読有、23、2016、1012-1020

Haro A, Kuramitsu E, Fukuyama Y. Complete resection of unicentric

Castleman disease in the superior mediastinum: A case report. *Int J Surg Case Rep.* 査読有、25、2016、44-47  
doi:10.1245/s10434-016-5530-7  
Haro A, Tamiya S, Nagashima A. A rare case of human pulmonary dirofilariasis with a growing pulmonary nodule after migrating infiltration shadows, mimicking primary lung carcinoma. A case report. *Int J Surg Case Rep.* 査読有、22、2016、8-11  
doi:10.1016/j.ijscr.2016.03.023

(雑誌論文) (計5件)

(学会発表) (計6件)

第 39 回日本呼吸器内視鏡学会  
2016 年 6 月 24 日「原発性肺癌および転移性肺腫瘍の鑑別に遺伝子変異検索が有用であった 1 症例」中津市民病院 呼吸器外科、病理診断科 波呂 祥、倉光 絵梨奈、山本 一郎、福山 康朗

第 57 回日本肺癌学会学術集会  
2016 年 12 月 21 日「同一肺葉内に肺定型カルチノイドおよび肺腺癌の病変を認めた同時多発肺癌の一例」松山赤十字病院、呼吸器センター 波呂 祥、藤下 卓才、甲田 拓之、加藤 高英、梶原 浩太郎、濱口 直彦、牧野 英記、兼松 貴則、横山 秀樹

第 117 回日本外科学会  
2017 年 4 月 27 日「びまん性肺疾患に対する胸腔鏡下肺生検術の安全性および有効性の検討」1:松山赤十字病院呼吸器外科、2:松山赤十字病院外科、3:松山赤十字病院乳腺外科 波呂 祥:1、藤下 卓才:1、松井 貴司:2、都甲 さゆり:2、小宮 和音:2、佐野 瑛貴:3、財津 瑛子:2、梶原 勇一郎:2、森崎 浩一:2、戸島 剛男:2、藤中 良彦:2、森田 和豊:2、岩佐 憲臣:2、堤 敏文:2、山岡 輝年:2、川口 英俊:3、内山 秀明:2、野口 伸一:2、高橋 郁雄:2、横山 秀樹:1、西崎 隆:2

第 34 回日本呼吸器外科学会総会  
2017 年 5 月 18 日「気管支鏡生検後に前投薬が原因と考えられる薬剤性顆粒球減少症および重症肺炎を来した 1 例」松山赤十字病院、呼吸器センター 波呂 祥、藤下 卓才、横山 秀樹

第 58 回日本肺癌学会学術集会  
2017 年 10 月 14 日「肺癌術後 1 年後に発症した肋間肺ヘルニアの一例」松山赤十字病院 呼吸器センター 波呂 祥、藤下 卓才、甲田 拓之、加藤 高英、梶原 浩太郎、濱口 直彦、牧野 英記、兼松 貴則、横山 秀樹

第 35 回日本呼吸器外科学会総会・学術集会  
2018 年 5 月 18 日「外科的肺生検にて T790M 変異を検出し、オシメルチニブを投与することにより長期生存が得られている 1 症

例) 松山赤十字病院 呼吸器センター 波呂 祥、藤下 卓才、横山 秀樹

(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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

波呂 祥(HARO, Akira)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号: 90546558

### (2) 研究分担者

田川 哲三(TAGAWA, Tetsuzo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 90419557