

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08805

研究課題名(和文) 気管支上皮内発癌物質代謝酵素の網羅的解析による新規肺癌感受性診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel evaluation method to investigate lung carcinogenicity by a comprehensive analysis of drug-metabolizing enzyme expressions in human bronchial epithelium.

研究代表者

小山 倫浩 (Oyama, Tsunehiro)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00309965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：臓器別癌死の原因として、肺癌は日本では最多である。長期による発がん性物質の暴露によって肺癌は発癌するため、予防する可能性を有する。このため、肺腺癌48例から気管支上皮の薬物代謝酵素であるチトクロームP450(CYP1A1, CYP2A6, CYP2E1)の発現検出を行い解析した。更に、肺腺癌183例の癌幹細胞マーカー(aldehyde dehydrogenase-1: ALDH1)と癌抑制遺伝子p53の発現の検出を行い解析した。気管支上皮に発現する薬物代謝酵素と肺癌細胞に発現している癌幹細胞マーカーを検討することは、癌予防法や発癌メカニズムを探求する一助となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肺癌リスクのバイオマーカーである発癌物質代謝酵素(CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1)発現を気管支上皮(BE)で検出することで、BEにどの程度の発がん物質の暴露があったか推定可能になった。このため、各人の「環境要因・生活習慣要因・宿主要因」を考慮した生活環境の整備や、個人に則した肺癌発生を予防効果として、社会的に貢献すると考えられる。

さらに、肺腺癌における癌幹細胞マーカー(aldehyde dehydrogenase-1: ALDH1)と癌抑制遺伝子(p53)の発現を検討することで、肺腺癌の発癌メカニズムの解明や悪性度の精密な評価の一助となることを示した。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in Japan. Lung cancer may be a preventable disease since many forms of this cancer are developed due to a longstanding exposure to inhaled carcinogens. In 48 adenocarcinoma patients, we investigate the drug-metabolizing enzyme (Cytochrome P450: CYP) expressions (CYP1A1, CYP2A6 and CYP2E1) of bronchial epithelium and their relationships to each other and clinical features of the patients. In addition, we investigate the expressions of cancer stem cell marker (aldehyde dehydrogenase-1: ALDH1) and p53 tumor suppressor gene in 183 adenocarcinoma patients. And we evaluate their relationships to clinical features. Thus, studies of the drug-metabolizing enzyme expressions of bronchial epithelium and cancer stem cell marker in tumor tissues will enable us to research the method of cancer prevention and mechanisms of carcinogenesis.

研究分野：分子疫学、分子腫瘍学、労働衛生学、呼吸器外科学、胸部外科学

キーワード：肺癌 喫煙 気管支上皮 発癌物質代謝酵素 チトクロームP450 癌幹細胞 アルデヒド脱水素酵素1 p53

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

2016年には全国の肺癌罹患数は13万人以上となり、肺癌による死亡者数は約8万人に達した。肺癌は診断されるとそのうち半数以上が死に至る生命予後が極めて悪い難治性癌であり、肺癌を予防することが重要な医学的課題となっている。現在、大気汚染などの「環境要因」、タバコなどの「生活習慣要因」、発癌物質代謝酵素などの「宿主要因」の相互作用で肺癌が発症すると考えられている。この肺癌リスクの指標として、微小粒子状物質(PM2.5)の評価、喫煙歴(喫煙量)の評価、発癌物質代謝酵素の遺伝子多型の評価などが行われている。しかし、これらの評価は「環境要因・生活習慣要因・宿主要因」の一つ一つの評価の指標にすぎず、必ずしも個人の肺癌リスクを的確に反映しているとは限らない。このため、各個人に則した肺癌リスクを正確に評価するバイオマーカーが切望されている。

一般に生体内組織において化学物質は吸収(absorption)から分布(distribution)、代謝(metabolism)を経て排泄(excretion)される。この化学物質の代謝から排泄の過程には、第I相～第III相の発癌物質代謝酵素が関与している。この発癌物質代謝酵素は基質となる多様な化学発癌物質によって誘導されるが、この発癌物質代謝酵素をバイオマーカーとして応用する研究はされていない。現在まで、気管支上皮内においてチトクロームP450(CYP)などの発癌物質代謝酵素が多種類発現しており、我々は、タバコなどの「生活習慣要因」により多種類の発癌物質代謝酵素発現が高度に誘導されることを明らかにした(Oyama *et al.*, 2012)。気管支上皮内に曝露したベンツピレン・ニトロサミンなどの化学発癌物質は、それらの組織中の発癌物質代謝酵素により代謝・排泄されるばかりでなく、代謝活性化されてDNA付加体を形成することにより肺癌が発症することも明らかになっている。個人の肺癌リスクを正確に評価するためには、気管支上皮で発現する発癌物質代謝酵素を網羅的に解析し、その発現の変動が著しい発癌物質代謝酵素をバイオマーカーとして臨床的に応用できるかどうか検討することが必要である。

更に、殆どの臓器で幹細胞システムによる組織構築が判明している。癌組織の中にも幹細胞システムに類似した階層性が存在し、その中に癌幹細胞(cancer stem cells)と呼べる細胞が存在して通常の癌細胞を供給しながら癌組織を構成している可能性が指摘されている。即ち、癌は多分化能や自己複製能を併せ持つ癌幹細胞が、分化した癌細胞を産み出して発癌すると考えられ、この癌幹細胞は化学療法・放射線治療抵抗性を示し、癌転移の一因となることが示されている。このため、癌の予防・悪性度評価や治療には、癌幹細胞の検討が不可欠である。

## 2. 研究の目的

肺癌のうち、最も患者数が多いのは肺腺癌であり、この肺腺癌は非喫煙者においても高頻度に発症して増加傾向にある。本研究では、肺腺癌発生の「宿主要因」として直接的に気管支上皮を用いて検討し、「環境要因・生活習慣要因」の結果変動する第I相～第III相の発癌物質代謝酵素CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1・CYP3A4の発現を解析した。さらに、肺癌発生のメカニズムを検討するために肺腺癌における(aldehyde dehydrogenase-1: ALDH1)と癌抑制遺伝子(p53)の発現を検討した。

### 3. 研究の方法

1) 肺腺癌の切除肺 48 例を対象としてパラフィン包埋切片を作製し、HE(hematoxylin and eosin stain)染色により組織学的診断を施行した。パラフィン包埋切片を CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1・CYP3A4 により免疫化学染色して、気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1・CYP3A4 酵素発現を検出した。気管支上皮の 10%以上の気管支上皮細胞が陽性の場合を気管支上皮酵素発現陽性と判定した。さらに、腫瘍細胞 10%以上の発現例を肺腺癌酵素発現陽性と判定した。

2) 切除肺腺癌 183 例の切除肺からパラフィン包埋切片を作製し、HE(hematoxylin and eosin stain)染色により組織学的診断を施行した。癌幹細胞マーカー(aldehyde dehydrogenase-1: ALDH1)と癌抑制遺伝子(p53)の免疫組織化学染色を検討した。ALDH1 発現は、腫瘍内の染色強度と染色面積より算出する H-score (0-300) (Shenton et al, 1998) を用いて評価した(AS: ALDH1-score)。AS は発現強度を 0-3 に分類して(0;negative, 1;weak, 2;intermediate, 3;strong) 次の式で算出した(ALDH1-score= 1の%面積 + 2の%面積 × 2 + 3の%面積 × 3)。AS が 100 以上の発現例を陽性と判定した。p53 発現は、腫瘍細胞 10%以上の発現例を陽性と判定した。

### 4. 研究成果

#### 【結果】

1) 肺腺癌 48 例の平均年齢は 65.1 歳、男性 29 例で女性 19 例であった。病理病期 I 期、II 期、III 期、IV 期はそれぞれ 20 例、4 例、21 例、3 例であった。気管支上皮内 CYP1A1 と CYP2E1 陽性例を示す(図 1)。気管支上皮内に褐色に染まって 10%以上の酵素発現を認める(図 1)。気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 陽性例(陽性頻度)はそれぞれ 5 例(10.4%)、23 例(47.9%)、11 例(22.9%)であった。気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 陽性個数は 0 個、1 個、2 個、3 個はそれぞれ 16 例(33.3%)、26 例(78.8%)、5 例(10.4%)、1 例(2.1%)であった。気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 陽性個数は 0 個、1 個、2 個、3 個の平均 Brinkman Index (BI) は、それぞれ 293、469、1038、920 であり、気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 陽性個数が多いほど BI が高値となる傾向を示した。また、気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 陽性個数 0-1 個の平均 BI  $402 \pm 497$  に比べ、気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 陽性個数 2-3 個の平均 BI  $1018 \pm 451$  は有意に高値を示した( $p < 0.01$ )。気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 発現の有無による生存曲線を示す(図 2)。気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 発現が 0 個の症例( $n=16$ )に比べ気管支上皮内 CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1 発現が 1-3 個の症例( $n=32$ )は予後不良傾向を認めた(図 2)。また、肺腺癌腫瘍細胞の CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1・CYP3A4 陽性例(陽性頻度)はそれぞれ 21 例(43.8%)、22 例(45.8%)、19 例(39.6%)、19 例(39.6%)であった。

2) 肺腺癌 183 例の平均年齢は 68.5 歳、男性 102 例で女性 81 例であった。病理病期 I 期、II 期、III 期はそれぞれ 148 例、17 例、18 例であった。肺腺癌腫瘍細胞の ALDH1 と p53 陽性例を示す(図 3)。肺腺癌腫瘍細胞に褐色に染まって ALDH1 と p53 の陽性細胞を認め、ALDH1 染色では AS=250 と判定し、p53 染色では腫瘍細胞の 10%以上の発現を認め陽性と判定した。(図 3)。183 例の AS・p53 発現陽性例(陽性頻度)はそれぞれ 31 例(16.9%)と 79 例(43.2%)であった。AS 発現陽性群( $n=31$ )は陰性群( $n=152$ )に比べ有意に予後不良であった( $p < 0.01$ ) (図 4)。p53 発現陽性群( $n=79$ )は陰性群( $n=104$ )に比べ

有意に予後不良であった( $p < 0.01$ ) (図4)。多変量解析により、AS・p53発現陽性は独立した予後不良因子であった(表1)。

#### 【考察】

本研究により、肺癌リスクに有用なバイオマーカーである発癌物質代謝酵素(CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1)発現を気管支上皮内で同定することで、各個人に則した肺癌発生の危険度を予想することが可能となると考えられる。また、気管支上皮内の代謝酵素発現を検出することで、①-③のように社会的に貢献すると考えられる。各人の「環境要因・生活習慣要因・宿主要因」を考慮した生活環境の整備、個人に則した肺癌発症や予後の予想、肺癌発生を予防することによる厚生福祉費用の軽減効果。

さらに、肺腺癌における癌幹細胞マーカー(aldehyde dehydrogenase-1: ALDH1)と癌抑制遺伝子(p53)の発現を検討することで、肺腺癌の発癌メカニズムの解明や悪性度の精密な評価の一助となることが示された。

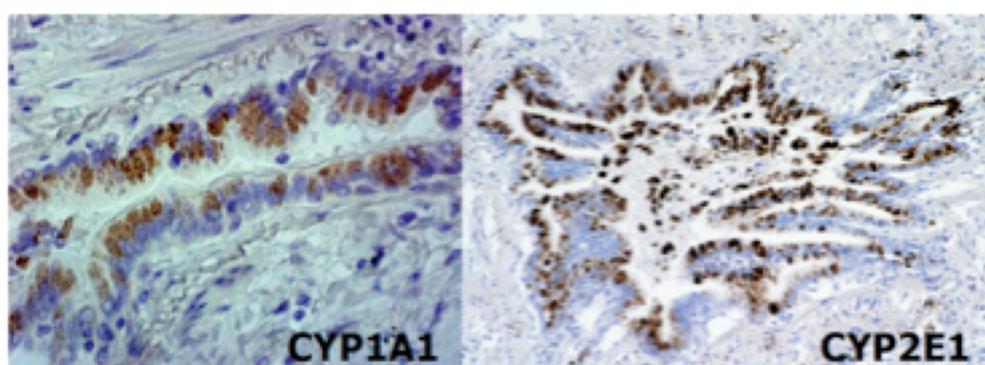


図1 気管支上皮内CYP1A1とCYP2E1の発現

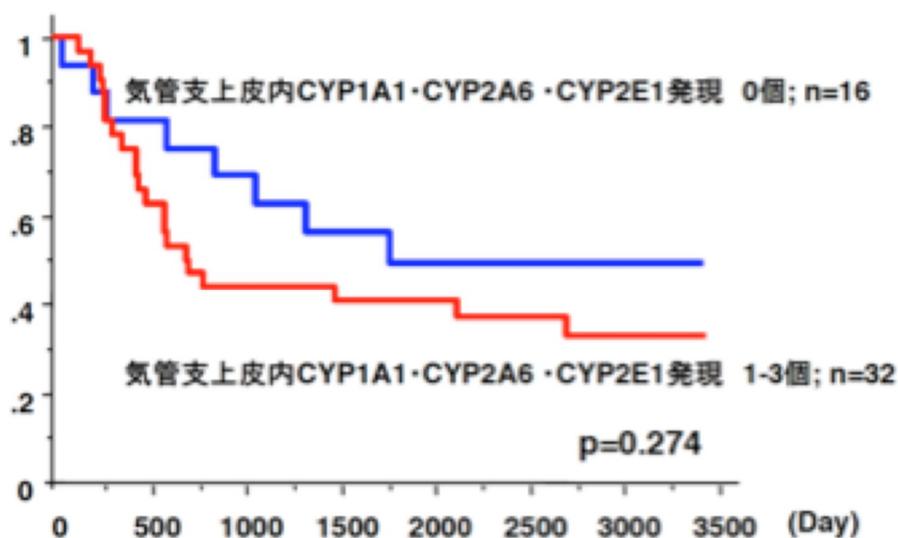


図2 気管支上皮内CYP1A1・CYP2A6・CYP2E1の発現の有無による生存曲線

ALDH1-score=250 (2×50+3×50)

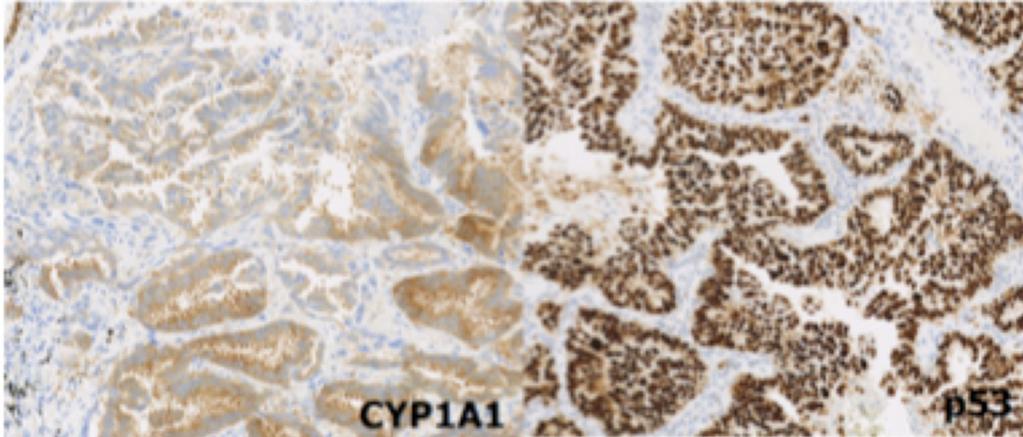


図3 肺腺癌腫瘍細胞内ALDH1とp53の発現

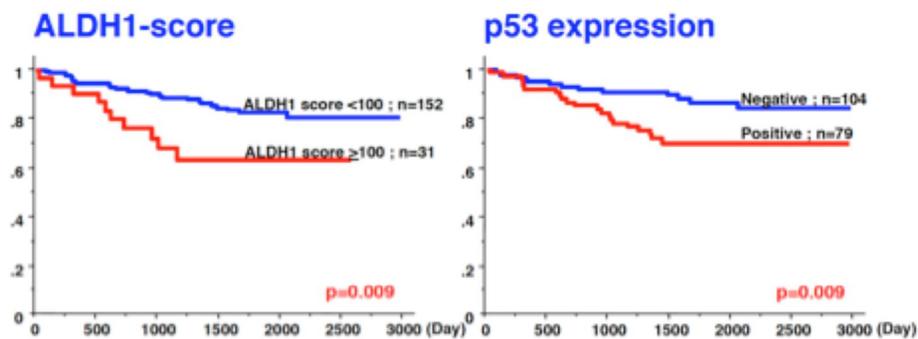


図4 肺腺癌183例におけるALDH1-score陽性・p53発現陽性患者の生存曲線

表1 肺腺癌183例における病理病期・ALDH1-score陽性・p53発現陽性患者の単変量・多変量解析

Parameter	N (183)	Univariate analysis			Multivariate analysis		
		Hazard ratio	95% CI	p	Hazard ratio	95% CI	p
Pathological stage							
1	148	1			1		
2-3	35	4.630	2.353-9.091	<0.0001	4.049	2.041-8.065	<0.0001
p53 expression							
Negative	104	1			1		
Positive	79	2.457	1.225-4.926	0.0113	2.304	1.143-4.630	0.0196
ALDH-score							
< 100	152	1			1		
> 100	31	2.591	1.235-5.435	0.0119	2.188	1.028-4.651	0.0422

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 So T, Yamashita N, Higa H, Miyata T, Shimokawa H, Kawano D, Yoshimatsu T, Oyama T	4. 巻 1
2. 論文標題 Near lethal hemoptysis caused by the recanalized bronchial recemose hemangioma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pulmonary Medicine and Respiratory Care	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮田剛彰、比嘉花絵、元春洋輔、吉松 隆、山下直樹、小山倫浩	4. 巻 32
2. 論文標題 縦隔型右下葉枝A7+8+9の破格を伴った右肺下葉切除の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日呼外会誌	6. 最初と最後の頁 731-735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山倫浩、浦本秀隆、名部祐介、平良彰浩、篠原伸二、柴田泰治、平井文子、田嶋裕子、今西直子、米田和恵、市来嘉伸、山下直樹、宗哲哉、宮田剛彰、吉松隆、後藤章暢、安田学、大崎敏弘、花桐武志、中西良一、田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(Aldehyde dehydrogenase-1とCD133)の発現と無再発生存期間(DFI)
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉松隆、川野大悟、山下直樹、宗哲哉、下川秀彦、比嘉花絵、宮田剛彰、小山倫浩
2. 発表標題 脳転移合併非小細胞肺癌に対する肺切除の意義
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山倫浩、浦本秀隆、平良彰浩、篠原伸二、 柴田泰治、平井文子、田嶋裕子、今西直子、米田和恵、市来嘉伸、山下直樹、宗哲哉、宮田剛彰、吉松隆、後藤章暢、安田学、大崎敏弘、花桐武志、中西良一、田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(ALDH1・CD133)の無再発生存期間(DFI)・予後予測因子としての有用性
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宗哲哉、山下直樹、比嘉花絵、宮田剛彰、川野大悟、吉松隆、下川秀彦、中野龍治、小山倫浩
2. 発表標題 Trousseau症候群を伴った肺癌の1術後長期生存例
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下直樹、宗哲哉、比嘉花絵、宮田剛彰、下川秀彦、川野大悟、吉松隆、小山倫浩
2. 発表標題 原発性肺髄膜腫の1例
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山倫浩、浦本秀隆、金山雅俊、名部祐介、平良彰浩、篠原伸二、 田泰治、平井文子、田嶋裕子、今西直子、米田和恵、市来嘉伸、山下直樹、宗哲哉、宮田剛彰、吉松隆、後藤章暢、安田学、大崎敏弘、花桐武志、中西良一、田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(ALDH1・CD133)の無再発生存期間(DFI)・予後因子としての意義
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita N, Oyama T, So T, Yoshimatsu T, Matunaga W, Gotoh A
2. 発表標題 Expression of Cancer Stem Cell markers in human lung adenocarcinoma.
3. 学会等名 第25回国際個別化医療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山倫浩、山口優子、山口哲右、辻真弓、竹中賢、黒田耕志、山下直樹、宗哲哉、吉松隆、田中文啓、後藤章暢
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(ALDH1・CD133)発現及びその無再発生存期間と予後
3. 学会等名 第92回日本産業衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口優子、山口哲右、田中里枝、田中政幸、北川恭子、辻真弓、小山倫浩
2. 発表標題 ある企業における長時間労働とストレスチェックとの関係
3. 学会等名 2019年度日本産業衛生学会九州地方会学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyama T, Uramoto H, Yoneda K, Kuroda K, Miyata T, Yamashita N, So T, Yasuda M, Yoshimatsu T, Hanagiri T, Osaki T, Tanaka F, Gotoh A
2. 発表標題 Evaluations of aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1), CD133 and CD44 expressions in human lung adenocarcinoma.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山倫浩、浦本秀隆、篠原伸二、田泰治、今西直子、黒田耕志、宗哲哉、宮田剛彰、山下直樹、吉松隆、花桐武志、後藤章暢、大崎敏弘、中西良一、田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(ALDH1・CD133)発現はその無再発生存期間と予後に影響するか？
3. 学会等名 第71回日本気管食道科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宗哲哉、山下直樹、比嘉花絵、宮田剛彰、山岡賢俊、川野大悟、吉松隆、下川秀彦、山中澄隆、小山倫浩
2. 発表標題 手術を施行した90歳以上超高齢者肺癌の2例
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下直樹、川野大悟、山岡賢俊、宗哲哉、比嘉花絵、宮田剛彰、下川秀彦、山中澄隆、中野龍治、吉松隆、小山倫浩
2. 発表標題 診断および治療方針決定に難渋したリンパ上皮腫様癌の1例
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山倫浩、浦本秀隆、名部裕介、平井文子、篠原伸二、竹中賢、田嶋裕子、米田和恵、市来嘉伸、黒田耕志、今西直子、山下直樹、宗哲哉、宮田剛彰、吉松隆、後藤章暢、安田学、大崎敏弘、花桐武志、中西良一、田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカーALDH1・CD133発現の意義
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山倫浩, 浦本秀隆, 米田和恵, 今西直子, 市来嘉伸, 山下直樹, 宗哲哉, 安田学, 吉松隆, 花桐武志, 大崎敏弘, 田中文啓, 後藤章暢
2. 発表標題 肺腺癌の癌幹細胞マーカー (Aldehyde dehydrogenase-1とCD133)と無再発生存期間(DFI)の関連.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山倫浩, 浦本秀隆, 名部裕介, 平井文子, 篠原伸二, 竹中賢, 田嶋裕子, 米田和恵, 市来嘉伸, 黒田耕志, 今西直子, 山下直樹, 宗哲哉, 宮田剛彰, 吉松隆, 安田学, 大崎敏弘, 花桐武志, 中西良一, 田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカーALDH1・CD133は相関して発現する傾向がある
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉松隆, 川野大悟, 山下直樹, 宗哲哉, 下川秀彦, 比嘉花絵, 宮田剛彰, 小山倫浩
2. 発表標題 肺癌取り扱い規約第7版における大細胞癌の病理学的検討
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宗哲哉, 山下直樹, 比嘉花絵, 宮田剛彰, 川野大悟, 吉松隆, 下川秀彦, 中野龍治, 小山倫浩
2. 発表標題 小型肺癌により傍腫瘍性神経症候群 (辺縁系脳炎) を来した1例
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下直樹、宗哲哉、比嘉花絵、宮田剛彰、川野大悟、吉松隆、下川秀彦、小山倫浩
2. 発表標題 アスペルギローマに部分肺静脈還流異常を合併した一例
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山倫浩、浦本秀隆、田泰治、平井文子、竹中 賢、今西直子、市来嘉伸、山下直樹、宗哲哉、吉松隆、花桐武志、安田学、大崎敏弘、中西良一、田中文啓
2. 発表標題 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(Aldehyde dehydrogenase-1・CD133)の予後因子としての重要性
3. 学会等名 第70回日本気管食道科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宗哲哉、山下直樹、比嘉花絵、宮田剛彰、下川秀彦、川野大悟、吉松隆、小山倫浩
2. 発表標題 肺癌術後再発・上部胸椎浸潤により不全対麻痺と膀胱直腸障害を来した一例
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	後藤 章暢  (Gotoh Akinobu)  (70283885)	兵庫医科大学・医学部・教授    (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------