

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15954

研究課題名（和文）ドレブリン測定による肺癌診断法の開発と肺腺がんにおけるドレブリンの分子機能解明

研究課題名（英文）Development of lung cancer diagnostic method by measuring drebrin and elucidation of molecular function of drebrin in lung carcinoma

研究代表者

猪山 慎治 (Iyama, Shinji)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：70806497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ドレブリン測定における末梢血や癌性胸水の解析は困難であった。肺がんにおけるがん微小環境でのドレブリンの機能解析を行った。34名のStage Aの肺扁平上皮がん切除組織を用いて、蛍光免疫多重染色（CD3、サイトケラチン、ドレブリン、DAPI）を行った。解析ソフトを用いて、腫瘍と腫瘍間質、Tリンパ球を識別、腫瘍内Tリンパ球および腫瘍間質Tリンパ球のドレブリン発現を解析した。腫瘍内においてドレブリン陽性CD3陽性Tリンパ球が多く存在する群は、有意に全生存期間が短く、無再発生存期間も短い傾向であった。肺扁平上皮がんにおいて腫瘍内ドレブリン陽性Tリンパ球が予後不良マーカーとして考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期・術後再発非小細胞肺がんの治療は抗がん剤を中心とした化学療法が行われる。肺がん患者の死亡数を減らすための対策の一部に早期非小細胞肺がん手術後再発を予測し、早期に治療介入を行うこと、進行期非小細胞肺がんに対する治療成績を上げることが考えられる。肺がん手術後の再発を減らすために術後化学療法が実臨床で行われ、再発率が6-15%の向上が得られる。我々の報告により肺扁平上皮がんにおける腫瘍内ドレブリン発現Tリンパ球の割合が高いことが予後不良マーカーであることを示した。術後の検査治療管理にドレブリン発現Tリンパ球が有用である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Peripheral blood and malignant pleural effusions in drebrin assays were difficult to analyze. We analyzed the function of drebrin in the lung cancer microenvironment. We evaluated 34 surgical specimens of pathological stage I-III A lung squamous cell carcinoma. The immune contexture of surgically resected primary tumors was investigated by fluorescent multiplex immunohistochemistry. High-speed scanning of whole slide images was performed on stained tissue sections. Pan-cytokeratin of tumor cells, CD3 and drebrin were simultaneously stained. Tissue localizations of TILs in the tumor cell nest and surrounding tumor stroma were profiled and quantified by an automated quantitative pathology imaging system. A higher density of drebrin-positive CD3+ T-cells in tumor cell nest was significantly associated with a shorter overall survival. This study provides the first evidence of prognostic value of tumor-infiltrating drebrin-positive T-cells in patients with resected lung squamous cell carcinoma.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ドレブリン がん微小環境 術後再発 肺がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんの死亡率は日本において男性1位、女性2位であり、非常に予後が悪いがん種の一つとなっている。この死亡率の高さは、肺がん診断時にすでに進行期になっていることが多い点が挙げられ、早期発見・早期治療が重要である。肺がん診断検査のひとつとして、がんマーカーが利用されている。がんマーカーは、()がん胎児性蛋白、()糖鎖・糖蛋白といった炭水化物、()がん遺伝子、()酵素・骨格蛋白などの4つに分類される。申請者は、がんマーカーの中でもがん胎児性蛋白に注目して研究を行ってきた。がん胎児性蛋白は、胎児期に高発現し、成人期になると消失もしくは減少し、がんの進行とともに再上昇する蛋白と定義される。がん胎児性蛋白は、成人期にはほとんど発現していないため、がんマーカーとしての有用性は高い。しかし、胎児性がんマーカーを探索する上でヒト胎児を研究材料として用いることは倫理的に困難なので、私はヒトと mRNA が 80%以上相同性のあるミニブタ胎仔を研究材料として用いて、胎児性肺腺癌マーカーを網羅的に探索してきた。

結果、ヒト正常肺、ミニブタ成体肺に染色を認めず、ヒト肺腺がん、ミニブタ胎仔肺の細胞質・細胞膜に染色される B246 クローンに注目した。プロテインマイクロアレイによる解析の結果、本単クローン抗体が認識する抗原はドレブリン蛋白であることが分かった。

ヒト肺腺癌に対するドレブリンの発現解析の結果から、ドレブリン高発現群は低発現群と比較して有意に予後が悪いことが、明らかになった。(Iyama S, et al. Lung Cancer, 2016)

また、ドレブリンは浸潤がん(進行がん)になると発現が高くなるのがこれまでの研究成果から分かっており、肺腺がんにおける悪性化に関わっている可能性が強く示唆されている。ドレブリンのがんにおける機能解析は、膀胱がんでは、浸潤や遊走、足場非依存性増殖に関わること(Xu SQ, et al. Oncotarget, 2015)や、神経膠腫では浸潤や遊走に関わるということが報告されている(Terakawa Y, et al. Experimental cell research, 2013)。以上の報告から、ドレブリンは、肺腺がん診断マーカーとしての応用やがん機能やがん免疫機能に関わるということが示唆され、更なる探索が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、実地臨床でがん診断マーカーの測定に主に用いられている気管支洗浄液や血清を用いて、サンドウィッチ ELISA 法にてドレブリンの定量解析を行い、肺がんの診断向上を図ることである。本研究により、肺腺がんの気管支洗浄液や血清を用いた診断精度が有意に向上することが期待される。ドレブリン発現悪性腫瘍は肺腺がん以外にも膀胱がん、大腸がん、前立腺がん等、数種類あることが報告されており、これらの診断にも応用可能である。

本研究の第二の目的は、肺がんの悪性化の分子機能を明らかにすることである。がんは、周囲の繊維芽細胞やリンパ球やマクロファージなどの免疫細胞に影響をあたえ、増殖している、免疫細胞を含めたがん微小環境においてドレブリンがどのように関わっているかを解析し、治療薬の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

ドレブリン測定による肺がん診断法の開発

肺腺がん切除症例の術前気管支洗浄液や血清を 30 例程度収集する。また陰性コントロールとして健常人や肺がん以外の症例における気管支洗浄液や血清を同数収集する。これらを用いてサンドウィッチ ELISA 法を確立する。申請者はこれまでの研究成果より 4 種類の異なった抗原決定基を認識する抗ドレブリン単クローン抗体を得ており、捕獲抗体として用いる抗ドレブリン単クローン抗体について最も感度の高いものを選択する。検出抗体としては市販のビオチン化抗ドレブリン多クローン抗体を使用する。小検出系としてはテトラメチルベンゼンを用いて発色、吸光度測定する。同時にドレブリンリコンビナント蛋白を用いて標準曲線を描き、サンプル中のドレブリン濃度を測定する。コントロールとして健常人やがん患者以外の気管支洗浄液を用いて、肺腺がんのドレブリン濃度と比較し、感度、特異度の最も高くなるカットオフ値を決め、細胞診や組織診と比較して診断率の向上に関わるか検討する。

がん微小環境における T リンパ球に対するドレブリンの発現解析

リンパ球の評価を行うため、腫瘍間質および腫瘍内の評価が行いやすい肺扁平上皮がんを解析を行う。肺扁平上皮がん切除症例の切除検体を約 40 例の蛍光免疫多重染色(CD3、サイトケラチン、ドレブリン、DAPI)を行い、解析ソフト(Strata Quest)を用いて、腫瘍と腫瘍間質、T リンパ球を識別、腫瘍内 T リンパ球および腫瘍間質 T リンパ球のドレブリン発現を解析する。術後再発および術後生存期間の評価を行い、統計解析を行い、肺扁平上皮癌のドレブリン陽性 T リンパ球のマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

ドレブリン測定による肺がん診断法の開発

ドレブリン抗体を用いて ELISA 測定が可能ではあった。肺癌患者の胸水、血清で検討したが、

測定値が低く、値にばらつきがあり、測定系の確立は困難であった。

がん微小環境におけるTリンパ球に対するドレブリンの発現解析

肺扁平上皮癌患者の組織を蛍光多重免疫染色で評価した。サイトケラチンで癌細胞を水色に染めて、CD3でTリンパ球を緑に、ドレブリンを赤で染色した。(図1)どちらも同じ病期で腫瘍内にリンパ球が認められる症例であるが、b)でドレブリン陽性のTリンパ球が多く認められるのに対して、c)ではドレブリン陽性Tリンパ球は乏しく、同等のステージの患者において、Drebrin ドレブリン陽性リンパ球が多く存在する症例と乏しい症例に分かれることが分かった。

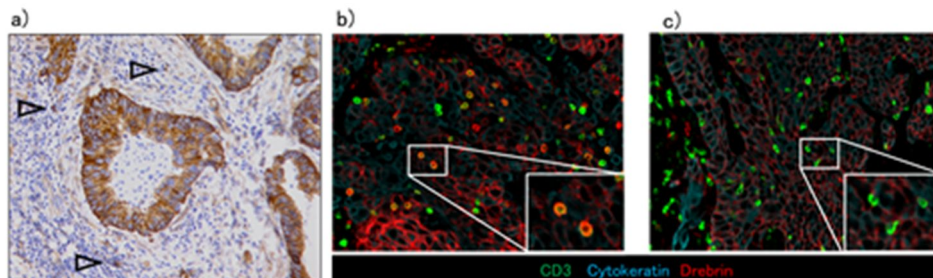


図1. a)肺腺がん組織 ドレブリン免疫組織化学染色▷ドレブリン陽性リンパ球
b).c)Stage II B非小細胞肺癌2症例の蛍光多重免疫染色 (CD3: 緑, Cytokeratin: 水色, ドレブリン: 赤)

肺扁平上皮がん術後検体 34 例を対象にリンパ球の局在を腫瘍実質と間質にわけて、解析を行った。CD3 陽性Tリンパ球の実の腫瘍実質、間質、それらを合わせた全体と分けて術後3年間の無再発生存期間の評価を行ったが、差を認めず、関連性は認めなかった。同様にドレブリン陰性Tリンパ球において、腫瘍実質、腫瘍間質、全体に分けて術後3年間の無再発生存期間の評価を行ったが、差を認めず、関連性は認めなかった。

ドレブリン陽性Tリンパ球の解析では、腫瘍実質においてドレブリン陽性Tリンパ球の割合が多いと無再発生存期間が短い傾向があった。(図2)一方、腫瘍間質や全体では、ドレブリン陽性Tリンパ球の割合と無再発生存期間の関連性は認めなかった。

34 例の患者背景において、年齢や性別、喫煙歴、術後病理病期、EGFR 遺伝子変異の有無、術後化学療法の有無、術後病理における微小浸潤、胸膜浸潤、リンパ管侵襲、脈管侵襲の有無においてドレブリン陽性Tリンパ球の割合が多い群と少ない群で差は認めなかった。

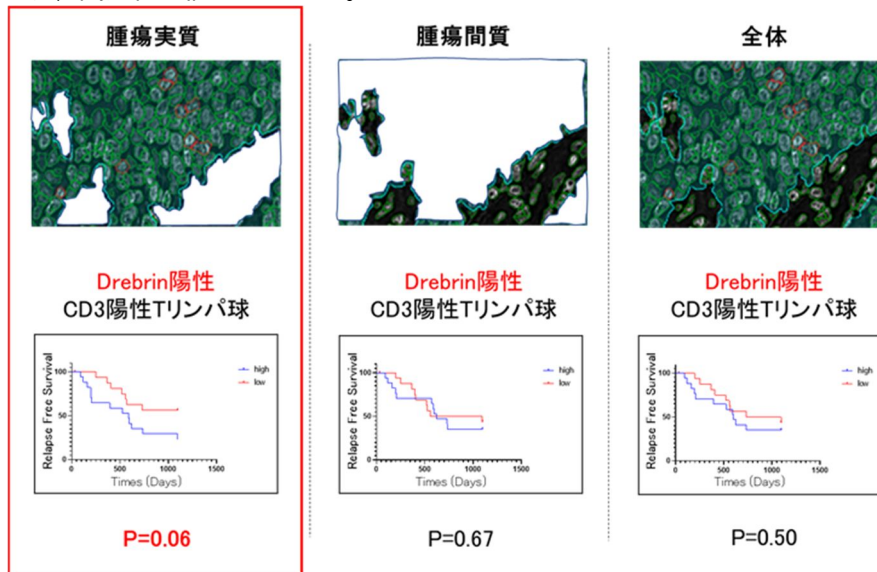
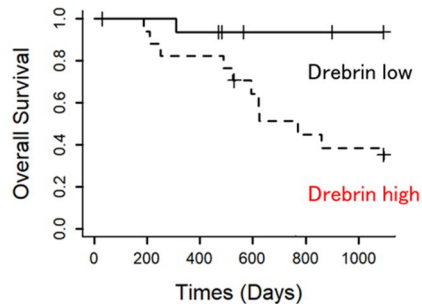


図2 ドレブリン陽性CD3陽性Tリンパ球の解析

無再発生存期間に関して多変量解析(プロベンシティスコア解析)では、手術時年齢、性別、喫煙歴、胸膜浸潤の有無、リンパ管浸潤の有無、静脈・動脈浸潤の有無、術後化学療法の有無、術後病期、ドレブリン陽性がん細胞面積/腫瘍面積×100(がん細胞のドレブリン陽性率)を調整因子とし解析を行った。結果は、ドレブリン陽性Tリンパ球が高い群が術後再発を予測する独立した因子であることが分かった。(ハザード比 3.06、95%信頼区間 1.28-7.31、p=0.012)

術後3年生存率では、ドレブリン陽性Tリンパ球割合が多い群が、有意差をもって術後生存が短いという結果だった。(p=0.001、ハザード比 13.46)(図3)

術後3年生存率に関して多変量解析(プロベンシティスコア解析)では、手術時年齢、性別、喫煙歴、胸膜浸潤の有無、リンパ管浸潤の有無、静脈・動脈浸潤の有無、術後化学療法の有無、術後病期、ドレブリン陽性がん細胞面積/腫瘍面積×100(がん細胞のドレブリン陽性率)を調整因子とし解析を行った。結果は、ドレブリン陽性Tリンパ球が高い群が術後再発を予測する独立した因子であることが分かった。(ハザード比 29.17、95%信頼区間 3.55-239.91、p=0.002)



	Events	Median	95%CI
Drebrin low n = 17	n = 1	NA	NA
Drebrin high n = 17	n = 11	771	488 - NA

図3. 術後3年生存率
Drebrin low= ドレブリン陽性Tリンパ球が少ない群
Drebrin high=ドレブリン陽性Tリンパ球が多い群

(ハザード比 29.17、95%信頼区間 3.55-239.91、p=0.002)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今村光佑
2. 発表標題 腫瘍浸潤drebrin陽性Tリンパ球と肺癌術後再発と生命予後に関する検討
3. 学会等名 第87回日本呼吸器学会・日本結核非結核性抗酸菌症学会・日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 九州支部 秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Imamura
2. 発表標題 Drebrin-positive tumor-infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker for lung squamous cell carcinoma
3. 学会等名 APSR2021 第25回アジア太平洋呼吸器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------