

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591816

研究課題名（和文） 非喫煙者に発生する肺癌の新しい疾患概念の確立と分子病態に基づいた革新的治療の開発

研究課題名（英文） Establishment of disease entity for lung cancer in never-smokers

研究代表者

矢野 篤次郎（YANO TOKUJIRO）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80304781

研究成果の概要（和文）：

非喫煙者に発生する肺癌（とくに腺癌）は、検索した限りでは *EGFR* 変異が有意に高頻度であること以外には喫煙者と分子生物学的違いを認めなかった。一方、遺伝子変異の一因となる酸化ストレス・抗酸化力とのバランスにおいて、非喫煙者肺癌例では喫煙者肺癌例に比較して酸化ストレスは差がなかったが、抗酸化力は有意に低かった。それを反映して、喫煙による酸化ストレスもない非喫煙者肺癌例の肺組織の DNA 酸化傷害は非癌患者よりも高度であった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the difference of molecular biology between never-smoked non-small cell lung cancer (NSCLC) and smoked NSCLC. As far as we examined, only high incidence of *EGFR* mutation in never-smoked NSCLC was recognized. On the other hand, the level of AOC (anti-oxidant capacity) was significantly lower in never-smoked NSCLC patients than in ever-smoked ones although there was no significant relationship between serum OS (oxidative stress) level and smoking status. In addition, the oxidative DNA damage rate of never-smoked NSCLC patients was significantly higher than that of patients with benign diseases. In conclusion, the low AOC in never-smoked NSCLC might be attributed to the excessive oxidative DNA damages.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：(1) 非喫煙者肺癌、(2) 非小細胞肺癌、(3) 腺癌、(4) p53 遺伝子変異、(5) 上皮細胞成長因子受容体遺伝子変異、(6) 酸化ストレス、(7) 抗酸化力

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は 1998 年以来、わが国のがん死亡原因の第 1 位であり、年間の肺癌死亡数は現在約 6 万 5 千人である。10～20 年後には 10 万人を超える見込みで、その大きな原因は喫煙

対策の遅れと早期発見・早期治療（切除）以外に確実な治療法が未だ確立されていないことであると考えられる。

一方、喫煙率の低下とは裏腹に非喫煙者の非小細胞肺癌は近年増加し、当科における

2000年代の手術症例の約30%は非喫煙者である。この非喫煙者の非小細胞肺癌は女性に多く、組織型では腺癌が多いなど従来の喫煙関連の肺癌とは臨床病理学的特徴が異なり、手術後の予後も喫煙歴のある症例に比し良好である (Yano et al, Cancer 2008;113:1012-8)。

この非喫煙者における非小細胞肺癌の増加は、これまで肺癌の主因と考えられていた喫煙習慣とは異なる原因による肺癌の存在を示唆するものである。この現象は、わが国だけでなくすでに喫煙率の低下している先進国でも認められており (J Clin Oncol 2007;25:472-8, J Clin Oncol 2006;24:2245-51)、2008年のASCO (米国臨床腫瘍学会) 年次集会において 'non-smoking-related lung cancers' という Clinical Science Symposium が開催された。我々はこのシンポジウムにおいて、この非喫煙者肺癌について外科的立場から自験例を報告した。

分子生物学的にも、非喫煙者肺癌患者では従来から喫煙関連の肺癌でよく知られている代表的な KRAS および p53 の遺伝子変異頻度が少なく、その一方で EGFR (epidermal growth factor receptor gene) の変異頻度が高く、従来の喫煙関連の肺癌患者とは異なる遺伝子変異プロファイルを持つことも示唆されている (J Clin Oncol 2006;24:1700-4, Clin Cancer Res 2006; 12:1647-53, Nature Clin Practice Oncol 2008;5:610-8)。

以上のことより、非喫煙者に発生する肺癌は臨床研究や治療の面で、従来の喫煙に関連した肺癌と異なる疾患群として捉えられるべきであると考えられる。

さらに、今後この非喫煙者における肺癌の増加は新たな医療問題となるのが容易に想像されることより、その疾患概念を明らかにして予防を含めた治療法を確立するための臨床研究は急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

- 1) 外科切除された非喫煙者 (never-smoker) 肺癌組織と喫煙者 (current smoker) 肺癌組織を用いて、両者の分子生物学的違い、とくに細胞増殖や転移に関連した分子の差異を蛋白発現レベルおよび遺伝子変異の点から明らかにする。
- 2) 非喫煙者肺癌の発癌に関与する原因を明らかにするために、非喫煙者 never-smoker と喫煙者 current smoker の術前の酸化ストレスおよび抗酸化力のバランスを評価し、腫瘍組織内の DNA 酸化障害との関連を明らかにする。
- 3) 2) および 3) の結果をもとに、明らか

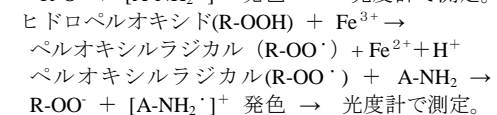
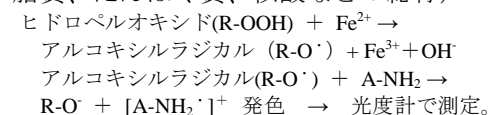
となった非喫煙者肺癌の病態に適した革新的な分子標的治療法の開発を図る。

## 3. 研究の方法

- 1) 肺癌手術患者より詳細な喫煙歴を問診にて聴取し、「非喫煙者」(生涯の喫煙本数が100本未満)および「喫煙者」(禁煙期間1年未満)を正確に抽出する。
- 2) 上記非喫煙者および喫煙者の切除標本を用いて、細胞増殖・転移の調節に関わる核タンパク (Ki67, p16, p21/waf1, p27, etc) や細胞内シグナル伝達分子 (MET, AKT, MAPK, etc) および転移に関わる分子 (E-cadherin,  $\beta$ -catenin, VEGF, etc) の発現解析を免疫組織化学染色および real-time PCR による mRNA 解析にて行う。
- 3) 切除標本より抽出した DNA を用いて、肺癌で既知の KRAS, p53, EGFR mutation を解析する。
- 4) 肺癌手術症例を対象に術前採血を行う。採取した血液を用いて、血漿/血清中の酸化ストレス度および抗酸化力を以下に示す方法で測定し、喫煙歴による違い、とくに「非喫煙者」および「喫煙者」との差異を評価する。

(酸化ストレス度測定法: d-Roms テスト)

\*ヒドロペルオキシド (R-OOH: 活性酸素やフリーラジカルにより酸化された脂質、たんぱく質、核酸などの総称)



(抗酸化力測定法: BAP テスト)

三価鉄塩  $\text{FeCl}_3$  + チオシアン酸塩誘導物 (無色)  $\rightarrow \text{FeCl}_3$ -チオシアン酸塩誘導物 (着色)

+ 抗酸化能を持つ血漿分子  $\rightarrow \text{FeCl}_2$  + チオシアン酸塩誘導物 (無色)  
以上の光度計のデータは Free Radical Analytical System のプログラムにより定量数値化される。

- 5) 上記同一の肺癌症例の切除標本を用いて癌組織内の DNA 酸化傷害の程度を調査する。癌部および非癌部の組織よりそれぞれパラフィン包埋切片を作製し、DNA 塩基の酸化損傷生成物をマーカーとして単クローン抗体により免疫組織染色を行う。マーカーとする DNA 塩基の酸化損傷生成物の候補として thymidine

glycol を選択する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 非喫煙者肺癌と喫煙者肺癌の分子生物学的因子の差異 (表 1)

非喫煙者肺腺癌ではEGFR変異が有意に高頻度であり、女性に有意に多かった。しかし、従来予後因子として知られているKRAS・p53の変異や細胞周期調節因子p27・p16、細胞増殖因子受容体ERβ・pEGFRの発現に関しては、非喫煙者症例と喫煙者症例とで有意差はなかった。さらに、細胞内シグナル伝達因子の発現の違いに関する検討も必要であると考えられた。

表 1. 非喫煙者肺癌と喫煙者肺癌の分子生物学的因子の比較

因子	非喫煙者 (n=39)	喫煙者 (n=27)	p 値
KRAS 変異 +/-	1/38	3/24	0.15
p53 変異 +/-	8/31	4/23	0.55
EGFR 変異 +/-	26/13	9/18	0.004
p27 発現 +/-	18/21	17/10	0.17
p16 発現 +/-	21/18	16/11	0.66
ERβ 発現 +/-	24/15	21/6	0.15
pEGFR 発現 +/-	10/29	7/20	0.97

##### 2) 肺癌患者における血中酸化ストレス・抗酸化力と非癌部肺組織DNA酸化傷害

肺癌手術症例 52 症例 (喫煙者 31 例/非喫煙者 21 例) の術前血清を用い、血中酸化ストレスおよび抗酸化力を、それぞれ d-ROMs (derivatives of reactive oxygen metabolites) test および BAP (biological antioxidant power) test にて測定した。血中酸化ストレス値は非喫煙者肺癌と喫煙者肺癌で有意な差を認めなかったが、血中抗酸化力は喫煙者肺癌症例と比較して非喫煙者肺癌症例で有意に低かった (表 2)。

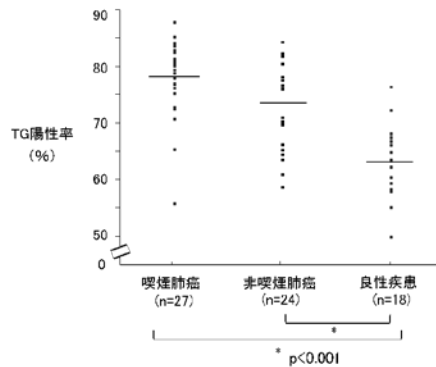
表 2. 血中抗酸化力と臨床病理学的因子との関連

因子	カテゴリ	症例数	抗酸化力*	p値
年齢	70才未満 / 70才以上	30 / 19	2414 / 2195	0.019
性別	男性 / 女性	27 / 22	2353 / 2257	NS.
BMI	25未満 / 25以上	38 / 11	2342 / 2224	NS.
喫煙の有無	非喫煙 / 喫煙	21 / 28	2208 / 2397	0.045
病理病期	I期 / II-III期	38 / 11	2311 / 2334	NS.

\* 平均値 (μ mol/l)

次に、切除肺非癌部における DNA 酸化傷害の程度を Thymidine Glycol (TG)の肺胞上皮細胞核の陽性率にて計測した。また非癌患者対照として良性肺疾患手術症例 18 症例 (年齢 10-78 才/平均 38 才、男性 11 例/女性 7 例、喫煙者 9 例/非喫煙者 9 例) の切除肺非病変部を用いた。TG 陽性率について、非喫煙喫煙者肺癌症例は喫煙者肺癌症例に比べ低値であったが、良性肺疾患症例と比べると有意に高かった (図 1)。

図 1. 非喫煙者肺癌と良性肺疾患の非病変部肺組織におけるTG陽性率



以上の結果より、喫煙による酸化ストレスを受けていない非喫煙者肺癌症例において、血中抗酸化力が低いことと非癌部肺組織における DNA 酸化傷害が良性肺疾患症例と比べ高度であることとの間の因果関係が示唆された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Yano T, Haro A, Shikada Y, Okamoto T, Maruyama R, Maehara Y. A unique method for repairing intraoperative pulmonary air leakage with both polyglycolic acid sheets and fibrin glue. World J Surg (査読有り) 36, 463-467, 2012
2. Ito K, Yano T, Morodomi Y, Yoshida T, Kohno M, Shikada Y, Okamoto T, Maruyama R, Maehara Y. Serum antioxidant capacity and oxidative injury to pulmonary DNA in never-smokers with primary lung cancer. Anticancer Res (査読有り) 32, 1063-1068, 2012
3. Haro A, Yano T, Kouhno M, Yoshida T, Okamoto T, Maehara Y. Ground-glass opacity lesions on computed tomography during postoperative surveillance for primary non-small cell lung cancer. Lung Cancer (査読有り) 76, 56-60, 2012
4. Kawano D, Yano T, Shoji F, Ito K, Morodomi Y, Haro A, Miura N, Takenaka T, Yoshino I, Maehara Y. The Influence of

- intracellular epidermal growth factor receptor (EGFR) signal activation on the outcome of EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment for pulmonary adenocarcinoma *Surg Today* (査読有り) 41, 818-823, 2011
5. Shoji F, Yano T, Miura N, Morodomi Y, Yoshida T, Onimaru M, Maehara Y. Pericardial fat pad tissue produces angiogenic factors for healing the bronchial stump. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* (査読有り) 13, 271-275, 2011
  6. Koga T, Takeshita M, Yano T, Maehara Y, Sueishi K. CHFR hypermethylation and EGFR mutation are mutually exclusive and exhibit clinical backgrounds and outcomes in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* (査読有り) 128, 1009-1017, 2011
  7. Harada T, Yatabe Y, Takeshita M, Koga T, Yano T, Wang Y, Giaccone G. Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* (査読有り) 17, 2638-2645, 2011
  8. Yano T, Haro A, Yoshida T, Morodomi Y, Ito K, Shikada Y, Shoji F, Maruyama R, Maehara Y: Prognostic impact of local treatment against postoperative oligometastases in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* (査読有り) 102, 852-855, 2010
  9. Yano T, Morodomi Y, Ito K, Yoshida T, Haro A, Shoji F, Koga T, Maehara Y: Verification of the newly proposed T category (7<sup>th</sup> edition of the TNM classification) from a clinico-pathological viewpoint in non-small cell lung cancer- Special reference to tumor size-. *J Thorac Oncol* (査読有り) 5, 45-48, 2010
  10. Yano T, Yamazaki K, Maruyama R, Tokunaga S, Shoji F, Higashi H, Takeo S, Ichinose Y, Maehara Y: Feasibility study of postoperative adjuvant chemotherapy with S-1 (tegafur, gimeracil, oteracil potassium) for non-small cell lung cancer-LOGIK 0601 study. *Lung Cancer* (査読有り) 67, 184-187, 2010
  11. Takenaka T, Yano T, Kiyohara C, Miura N, Kouso H, Ohba T, Kometani T, Shoji F, Yoshino I, Maehara Y. Effects of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC-1) single nucleotide polymorphisms on the prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* (査読有り) 67, 101- 107, 2010
  12. Shoji F, Haro A, Yoshida T, Ito K, Morodomi Y, Yoshida T, Yano T, Maehara Y. Prognostic significance of intratumoral blood vessel invasion in pathologic stage IA non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* (査読有り) 89, 864-869, 2010
  13. Yano T, Shoji F, Baba H, Koga T, Shiraish T, Orita H, Kohno H: Significance of the urinary 8-OHdG level as an oxidative stress marker in lung cancer patients. *Lung Cancer* (査読有り) 63, 111-114, 2009
  14. Miura N, Yano T, Shoji F, Kawano D, Takenaka T, Ito K, Morodomi Y, Yoshino I, Maehara Y: Clinicopathological significances of Sip1-associated epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer progression. *Anticancer Res* (査読有り) 29, 4099-4106, 2009
  15. Kometani T, Yoshino I, Miura N, Okazaki H, Ohba T, Takenaka T, Shoji F, Yano T, Maehara Y. Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Letters* (査読有り) 278, 27-33, 2009
  16. Shoji F, Yano T, Yoshino I, Kawano D, Takenaka T, Miura N, Ito K, Morodomi Y, Maehara Y: The dynamics and clinical significance of alpha 2 plasmin inhibitor-plasmin complex and thrombin-antithrombin complex in postoperative pleural effusion following a pulmonary lobectomy. *Surg Today* (査読有り) 39, 320-325, 2009
  17. Takenaka T, Yano T, Ito K, Morodomi Y, Miura N, Kawano D, Shoji F, Abe K, Honda H, Maehara Y: Biological significance of the maximum standardized uptake values on position emission tomography in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* (査読有り) 100, 688-692, 2009
  18. Ohba T, Kometani T, Shoji F, Yano T, Yoshino I, Taguchi K, Kuraoka I, Oda S, Maehara Y: Expression of an X-family DNA polymerase, *pol lambda*, in the respiratory epithelium of non-small cell lung cancer patients with habitual smoking. *Mutation Res* (査読有り) 677, 66-71, 2009
- [学会発表] (計 12 件)
1. 河野幹寛、伊藤謙作、吉田月久、波呂祥、岡本龍郎、矢野篤次郎、前原喜彦：非喫煙者原発性肺腺癌切除例の分子生物学的特性に関する検討。第 112 回日本外科学会定期学術集会，2012 年，千葉。
  2. Yano T, Yoshida T, Morodomi Y, Ito K, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Takenoyama M, Maehara Y. Postoperative oligometastases in patients with non-small cell lung cancer – Clinical manifestations and the prognosis after local treatment. 14th World Conference on Lung Cancer, 2011, Amsterdam, Netherland.
  3. Ito K, Yano T, Yoshida T, Morodomi Y, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Takenoyama M, Maehara Y. Relationship between the WHO

- Histological Classification and the Masaoka Staging System or Microvessel Density in Thymomas. International Thymic Malignancy Interest Group, 2011, Amsterdam, Netherland.
4. 矢野篤次郎、伊藤謙作、吉田 月久、諸富洋介、波呂祥、鹿田康紀、丸山理一郎、竹之山光広、前原喜彦：肺癌患者における血中酸化ストレス・抗酸化力と非癌部肺組織 DNA 酸化傷害。第 11 回日本抗加齢医学会総会、2011 年、京都。
  5. 矢野篤次郎、吉田月久、伊藤謙作、諸富洋介、鹿田康紀、丸山理一郎、竹之山光広、前原喜彦：共通シンポジウム - 1「高齢者手術の現状と問題」肺切除周術期管理の標準化—高齢者への適応をめざして。第 36 回日本外科系連合学会学術集会、2011 年、千葉。
  6. 矢野篤次郎、吉田月久、伊藤謙作、諸富洋介、波呂祥、亀山敏文、鹿田康紀、丸山理一郎、前原喜彦：パネルディスカッション「肺がん新 TNM 分類 (UICCVer. 7) の有用性と問題点」新 stage IB (T2aN0M0) における p 因子の予後的意義。第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年、東京。
  7. Yano T, Haro A, Yoshida T, Morodomi Y, Ito K, Shoji F, Maehara Y. Prognostic impact of local treatment against postoperative oligometastases in non-small cell lung cancer. 46th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, 2010, Chicago, USA
  8. 矢野篤次郎、丸山理一郎、鹿田康紀、吉田 月久、伊藤謙作、諸富洋介、前原喜彦：肺癌術後再発治療における oligometastasis という疾病概念。第 48 回日本癌治療学会学術集会、2010 年、京都。
  9. 矢野篤次郎、庄司文裕、波呂祥、諸富洋介、伊藤謙作、吉田月久、前原喜彦：非小細胞肺癌切除例の臨床像の時代的変遷を考慮した手術術式決定と術後補助化学療法の適応。第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年、名古屋。
  10. Yano T, Morodomi Y, Ito K, Miura N, Takenaka T, Kawano D, Shoji F, Maehara Y. Verification of the newly proposed T category (7<sup>th</sup> edition of the TNM classification) from a clinico-pathologic viewpoint in non-small cell lung cancer. 45th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, 2009, Orland, USA
  11. 矢野篤次郎、庄司文裕、川野大悟、伊藤謙作、諸富洋介、三浦奈央子、竹中朋祐、前原喜彦：ビデオシンポジウム「術後合併症ゼロへの挑戦」 1) 胸部外科領域
  - 肺切除周術期管理の標準化をめざして—術後合併症ゼロへの挑戦—。第 109 回日本外科学会、2009 年、福岡。
  12. 矢野篤次郎、庄司文裕、波呂祥、吉田 月久、伊藤謙作、諸富洋介、前原喜彦：ワークショップ「ガイドライン治療・臨床試験に該当しない症例に対する治療」肺癌術後再発例に対する治療戦略。47 回日本癌治療学会学術集会、2009 年、横浜。
- [図書] (計 2 件)
1. 矢野篤次郎：急性期看護実習ガイド 1. 肺癌 1) 基礎知識 (分担) 医学出版、東京、初版、230-235, 2011 年
  2. 矢野篤次郎：ナースに知ってほしい 100 の病気 第 2 章 呼吸器 7. 肺がん (分担) メディカルレビュー社、東京、第 1 版、80-95, 2009 年
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
矢野 篤次郎 (YANO TOKUJIRO)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80304781
- (2) 研究分担者  
庄司 文裕 (SHOJI FUMIHIRO)  
九州大学・医学研究院・特任助教  
研究者番号：90444851