

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3月6日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791315

研究課題名（和文） ヒト肺線維症の進展における上皮間様転換機構と肺癌発生への関与

研究課題名（英文） Association between Epithelial-Mesenchymal transition of pulmonary idiopathic fibrosis and oncogenesis of primary lung carcinoma in human

研究代表者

波呂 祥 (HARO AKIRA)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90546558

研究成果の概要（和文）：

1、次に我々は肺線維症合併肺癌症例のヒト肺標本を用いて同一肺葉内の3箇所(正常部、線維化部、癌部)の EMT 関連遺伝子(TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Snail, Sip1, Twist, E-cadherin, N-cadherin, vimentin 遺伝子)の発現を調べた。線維化部および正常部、癌部における発現を比較したが、肺線維症合併肺癌において上皮間様転換機構の関与を積極的に示唆する結果は得られなかった。

2、原発性非小細胞肺癌症例 104 症例において肺線維症合併症例 4 症例は非合併症例 100 症例と比較し、全生存率が予後不良であった。EMT 関連遺伝子 Brachyury 遺伝子の mRNA の発現を調べ、高発現症例では全生存率および無再発生存率が有意に低く、IL-8、Slug の発現促進、E-cadherin の発現抑制を介した EMT 機構を介した予後不良因子であった。しかしながら肺線維症の予後不良の原因として関連づけることは、できなかった。

研究成果の概要（英文）：

1. We investigated EMT-related genes expression (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Snail, Sip1, Twist, E-cadherin, N-cadherin and vimentin) in three parts (normal tissue, fibrosis tissue and carcinoma tissue) of the same lobe with idiopathic pulmonary fibrosis. There is no significance in expression level of any genes among three parts. The result did not show a deep association between pulmonary fibrosis and EMT.

2. Next, in our study, prognosis of 4 cases of primary lung carcinoma with idiopathic pulmonary fibrosis was poor than that of 100 cases without idiopathic pulmonary fibrosis. We investigated mRNA expression of EMT-related gene Brachyury and its prognosis. According to five-year disease-free survivals and overall survival rates, Brachyury mRNA expression was a significant prognostic factor for poor patient outcome. Brachyury mRNA was significantly associated to EMT mechanism of up-regulation of IL-8 and Slug and down-regulation of E-Cadherin. However, poor prognosis of primary lung carcinoma with pulmonary idiopathic fibrosis was not due to EMT mechanism by Brachyury gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

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

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症は、いまだ原因不明の、肺線維化に伴う低酸素血症により、**QOL(quality of life)**が著しく障害される慢性肺疾患である。日本での罹患率は人口10万人あたり3~5人程度であり、さらに肺線維症においては肺癌の発生が効率であると報告されている。特発性肺線維症は、それ自体の予後だけでなく、肺線維症を合併した肺癌の肺切除後に、特発性間質性肺炎の急性増悪を急激に発症する頻度が高く、また、その場合の予後はきわめて不良である(胸部外科, 2002)。現在肺線維症は、肺癌の増加とともに、臨床の現場において非常に大きな問題となっている。

(2) 肺の線維化は、喫煙などの種々の刺激による肺胞上皮細胞の障害後に引き続き起こる修復機構により悪化・進行する。その機構には **TGF- β** を中心とした上皮間葉転換機構 (**EMT; epithelialmesenchymal transition**) が重要な役割を果たすと考えられている。

(3) 現在、好中球エラスターゼ、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン、caveolin などの遺伝子欠損マウスの解析、あるいは **EGF 受容体 Tyrosine kinase inhibitor** である **gefitinib** による肺線維化の抑制実験により、**EMT** 機構にさまざまな因子が関与していることが指摘されている。また研究に関しては、**A549 細胞(in vitro)**および**プレオマイシン経気道投与肺線維症モデルマウス(in vivo)**の研究により、肺線維症の **EMT** 機構に **TGF- β 1** を中心とした情報伝達系が重要な役割を担っていることが徐々に示されている。現在肺癌の増加とともに、特発性肺線維症における **EMT** 機構および肺線維症の進展メカニズム、肺癌の発生およびその進展の解明が治療および予防の点からも、大変望まれている。

2. 研究の目的

ヒト肺線維症において **EMT** 関連遺伝子の発現を調べ、線維化の進行度と、**EMT** 関連遺伝子の発現パターンを解析し、肺線維症における肺癌の発生および進展に果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺標本の採取

肺線維症合併肺癌症例において肺葉切除術が行われた外科的切除症例を用いる。コントロールとして、肺線維症非合併肺癌症例を用

いる。肺線維症合併肺癌症例においては、摘出前の胸部 CT 画像上の肺線維化の程度を参考にして、1. 線維化を認めない正常部位、2. 線維化を認める部位、3. 肺癌部位(3箇所)より肺標本を採取する。

(2) 肺癌合併肺線維症における以下の **EMT** 関連遺伝子の発現を調べ、解析を行う。

TGF- β 1, **TGF- β 2**, **TGF- β 3**, **Snail**, **Sipl**, **Twist**, **E-Cadherin**, **N-Cadherin**, **Vimentin**, **Brachyury** 遺伝子の発現を調べる。これらの肺癌の発生・進展に関与する、肺線維症の **EMT** 関連遺伝子を肺線維症合併肺癌症例において比較を行う。

また **EMT** 関連遺伝子として報告された **Brachyury** に関しては、まず、**real time RT-PCR** 法にて発現量の定量を行う。さらにその発現量に応じて、全体を3群(高発現群、中発現群、低発現群)にて予後を調べた後、その下流因子である **E-Cadherin**, **Slug**, **IL-8** との関連を免疫組織化学染色法にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 我々は、当院当科にて肺葉切除術が施行された14症例を対象とした。14症例は、それぞれ肺線維症合併肺癌症例3症例および肺線維症非合併肺癌症例11症例であった。肺線維症非合併肺癌11症例においては、正常肺および癌部より肺標本を採取し、また肺線維症合併肺癌症例3症例においては非線維化部、線維化部、癌部より肺標本を採取した。

まず肺線維症合併肺癌症例において、非線維化部において各遺伝子の発現を調べたが、発現レベルに有意差を認めたものはなかった。さらに非線維化部あるいは線維化部と、癌部との比較においては、肺線維症非合併肺癌症例と同様に **E-Cadherin** の発現は上昇している他、**TGF- β 2**, **Vimentin**, **Snail**, **Sipl** などの遺伝子は減少していたが、肺線維症合併肺癌症例に特異的であると断言するには至らなかった(下図)。

次に肺線維症合併肺癌症例の癌部と、肺線維症非合併肺癌症例の癌部との比較においては、**E-Cadherin** の減少 ($p=0.0201$) を認めたが、その他の遺伝子 (**Sipl**, **vimentin**, **Snail**, **TGF- β 2**) も減少しており、今回の解析結果からしては、更なる症例数を増やしての検討が必要であると考えられた。

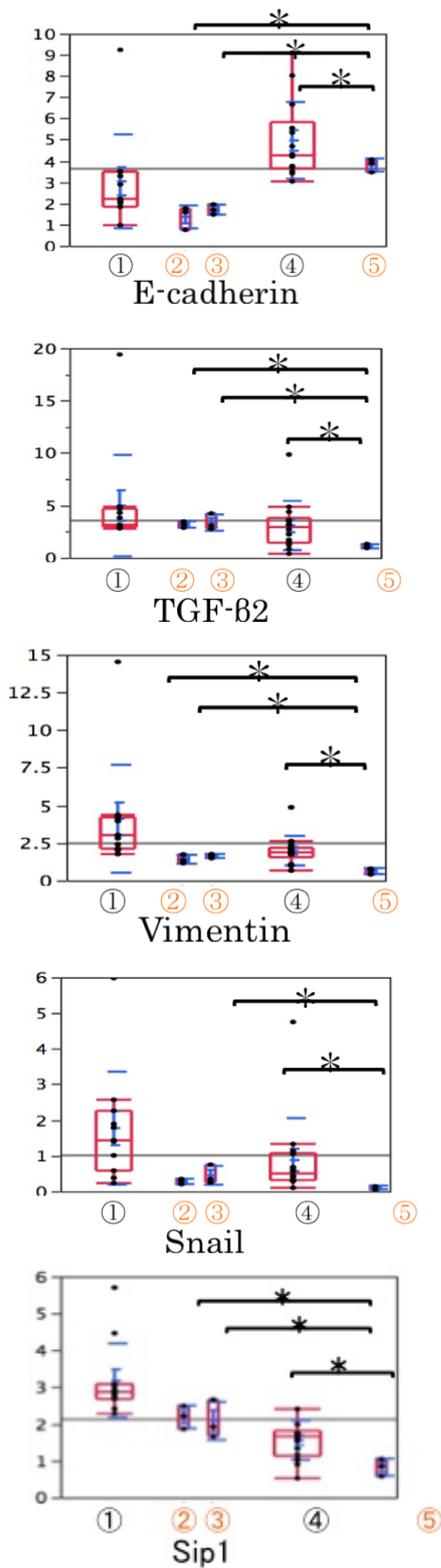


図. 肺線維症合併肺癌症例における EMT 関連遺伝子の発現

- ①正常肺(肺線維症非合併症例)
- ②非線維化部(肺線維症合併症例)
- ③線維化部(肺線維症合併症例)
- ④癌部(肺線維症非合併症例)
- ⑤癌部(肺線維症合併症例)

(2) 次に我々は、原発性非小細胞肺癌症例 104 症例において EMT 関連遺伝子 Brachyury 遺伝子に着目して解析を行った。104 症例においては、肺線維症合併症例が含まれており、その 4 症例は、全生存率は、41 ヶ月であり、全生存率が 93 ヶ月である非合併症例 100 症例と比較し、有意に予後不良 ($p=0.0227$) であった。さらに EMT 関連遺伝子 Brachyury 遺伝子の mRNA の発現を調べた。高発現症例では全生存率および無再発生存率が有意に低いことが示された(それぞれ、 $p=0.0254$ および $p=0.0288$) (下図)。

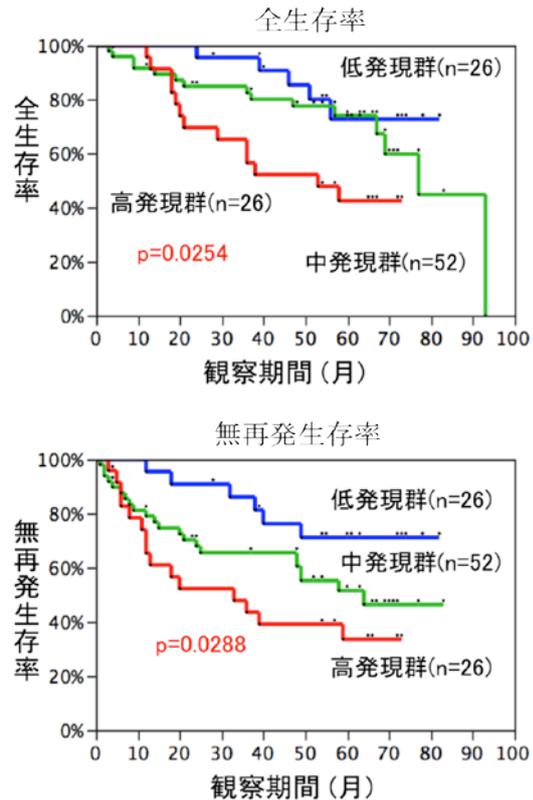


図. Brachyury 遺伝子の発現の有無による予後(全生存率および無再発生存率)

Brachyury 遺伝子は下流遺伝子である IL-8、Slug の発現促進、E-cadherin の発現抑制による EMT 機構を介して、血管およびリンパ管侵襲(それぞれ $p=0.00320$, 0.0462)を引き起こし、予後不良因子となることを解明した。しかしながら、肺線維症合併肺癌における Brachyury 遺伝子の mRNA 発現量は、非合併症例と比較し、むしろ有意に低く ($p=0.0043$)、タンパクの発現の比較でも有意差は認めなかった ($p=0.0532$)。これらの解析結果から EMT 関連遺伝子 Brachyury 遺伝子を肺線維症の予後不良の原因として関連づけることは、できず、肺線維症における肺癌発生の過程には他のメカニズムが存在することが予想された。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

1、7th ANNUAL ACADEMIC SURGICAL CONGRESS

2012年2月14日、米国 ラスベガス

‘EMT-related Brachyury Gene Expression Is A Significant Prognostic Factor For Primary Lung Carcinoma’

発表者：波呂 祥

2、第49回 日本癌治療学会学術集会

2011年10月27日 名古屋国際会議場

「原発性肺癌における EMT 関連遺伝子 Brachyury の役割」

3、第111回 日本外科学会学術集会

2011年5月26-28日 東京国際フォーラム

「原発性肺癌の浸潤および転移における EMT 関連遺伝子 Brachyury の役割」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

該当なし

○取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

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・助教

研究者番号：90546558

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当なし