

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790411

研究課題名（和文）KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性の追求

研究課題名（英文）Characteristic of the molecular pathology of the lung adenocarcinomas with mutated KRAS and high-proliferating activity.

研究代表者

馬 哲漢 (WOO TETSUKAN)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：90537177

研究成果の概要（和文）：本研究では、複数のKRAS下流分子の発現プロファイルをみることで、肺腺癌の悪性度を規定する分子基盤の一端を明らかにすることを目標とした。先行研究でのマイクロアレイ解析で既に同定されているKRAS下流分子群の発現レベルを、KRAS導入細胞を用いて検証した結果、ほとんどの対象分子群で発現変動が確認され、マイクロアレイの結果の正当性が支持された。特に、ケモカイン3分子(CXCL7(PPBP)、CCL3、CXCL2)、S100分子群の発現解析を原発性肺癌病変で行い、KRAS変異肺癌で高発現している病変があることを確認した。また、蛋白質発現解析では、特にS100蛋白質群が、KRAS変異・高増殖活性型肺癌で高発現している傾向があった。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies identified important molecules involved in carcinogenesis of the lung through a comprehensive search for the downstream targets of oncogenic KRAS. The present study investigated such downstream targets by oncogenic KRAS-transduced airway epithelial cells. Results confirmed the changes of the expression levels in almost all target molecules. The expression levels of the three chemokines (CXCL4(PPBP), CCL3, CXCL2) and S100 families were highly elevated in some KRAS-mutated primary lung adenocarcinoma lesions. Protein expression analyses showed the higher expression levels of S100 families in primary lung adenocarcinoma lesions with mutated KRAS and high-proliferating activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺癌 KRAS 増殖活性

1. 研究開始当初の背景

申請者は、現在まで呼吸器外科医として肺癌の外科的治療に携わる一方、未だ十分とは

言えない肺癌の術後生存率を向上させるべく、その悪性度を規定する分子基盤について研究を行ってきた。その過程において、KRAS 変異

を伴い、且つ高い増殖活性を示す肺腺癌の術後成績が極めて不良であることを報告してきた (Woo T, et al. Lung cancer 2009)。KRAS 遺伝子変異を伴う肺腺癌は、種々の制癌剤、特に分子標的薬への感受性が低く、非切除症例には有効な治療法が無いのが実状である。目下、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性の解明は、それを標的とする新規治療法の開発に繋がる重要、且つ急務の研究案件である。申請者らは、これまでに、遺伝子発現マイクロアレイを用いたKRAS 下流分子の網羅的解析から、変異型KRAS による細胞がん化シグナルが複数の下流分子 (候補がん抑制遺伝子DUSP6、IGFBP 他) を介して負のフィードバック制御を受けていること、また、それらの段階的な破綻が肺腺癌の悪性を漸増させることを明らかにしてきた (Okudela K, Woo T, et al. Am J Pathol 2009, Pathol Int 2010)。しかしながら、一方で、これまでに同定してきたフィードバック機構の破綻のみでは、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の生物学的特性 (高悪性度) を十分に説明するには至らなかった。事実、変異型KRAS の下流には、多様な、また相反する生物活性を示す多くの分子群が包括されており、それらの不活性化あるいは過活性化の結果として起こる全体の均衡状態こそが、がん細胞の悪性を規定しているものと推察される。従って、変異型KRAS 下流分子群の包括的発現解析とその結果に基づくプロファイリング分析が、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の悪性を規定する分子基盤を解明するうえで、必然且つ合理的な戦略であると考えられ、本研究の着想・計画に至った。

2. 研究の目的

研究期間内に、肺腺癌切除材料 (KRAS 変異・高増殖活性型; KRAS 変異・低増殖活性型; 非変異・高増殖活性型; 非変異・低増殖活性型) を対象に、先行研究から既に同定しているKRAS 下流分子群の発現解析・プロファイリング分析を行い、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌の分子病理学的特性の一端を明確にする。

3. 研究の方法

先行研究でのマイクロアレイ解析で既に同定されている KRAS 下流分子群の発現レベルを、KRAS 導入細胞で検証し、マイクロアレイ解析の結果との整合性を求める。

肺腺癌の切除材料 (KRAS 変異・高増殖活性型; KRAS 変異・低増殖活性型; 非変異・高増殖活性型; 非変異・低増殖活性型) からマイクロダイセクション (PALM MCB, Zeiss) によって腫瘍細胞 (および非腫瘍細胞) を取り分け、total RNA を抽出する。逆転写反応を行って相補DNA を得、それを鋳型として対象分子群のリアルタイムPCR 解析によりmRNAの発

現レベルを定量する。

次に、上記症例のパラフィン切片 (必要に応じて凍結切片) を用いて、対象分子の免疫染色を行う。適切なインターナルコントロールを決め、これに対する腫瘍細胞の発現レベルを半定量的に解析し (無発現 (0)、対照と比較して明らかに低い発現レベル (1)、対照と同程度の発現レベル (2)、対照と比較して明らかに高い発現レベル (3) としてスコア化)、最終的な蛋白質発現値を求める。

上記解析から得られた各分子の発現レベルを、KRAS 変異・高増殖活性型、KRAS 変異・低増殖活性型、非変異・高増殖活性型、非変異・低増殖活性型肺腺癌の4群間、あるいはKRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌とそれ以外の2群間で比較解析し、KRAS 変異・高増殖活性型肺腺癌において、有意に高いあるいは低いレベルを示すものをKRAS 変異型・高増殖活性型肺腺癌の特性の規定する候補責任分子として抽出する。

4. 研究成果

先行研究でのマイクロアレイ解析で既に同定されているKRAS下流分子群の発現レベルを、KRAS導入細胞で検証したところ、対象分子群のほとんど全てに発現変動が確認され、マイクロアレイの結果の正当性が支持された。特に、ケモカイン3分子 (CXCL7 (PPBP)、CCL3、CXCL2)、およびS100分子群の発現解析を原発性肺癌病変で行い、これらの発現レベルがKRAS変異肺癌で高度に上昇している病変があることを確認した。また、これら候補分子群の蛋白質発現解析では、特にS100蛋白質群が、KRAS変異・高増殖活性型肺癌で高発現している傾向があることを認めた。以上の研究成果は、現在国際誌への投稿に向けて準備中である。

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8件)

- 1 Watanabe M, Yokose T, Woo T, Imai K, Tsuboi M, Ito H, Ishikawa Y, Yamada K, Nakayama H, Fujino S. Micropapillary components in a lung adenocarcinoma predict stump recurrence 8 years after resection: A case report. Lung Cancer. 2013;80(2):230-3. (査読有り)
DOI:10.1016/j.lungcan.2013.01.011.
- 2 Okudela K, Woo T, Mitsui H, Suzuki T,

- Tajiri M, Sakuma Y, Miyagi Y, Tateishi Y, Umeda S, Masuda M, Ohashi K. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas—its clinicopathologic and biological significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(1):1-12. (査読あり)
(URL:<http://ijcep.com/files/ijcep1210003.pdf>)
- 3 Woo T, Okudela K, Mitsui H, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, Ohashi K, Masuda M. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. *Pathol Int.* 2012;62(12):785-91. DOI:10.1111/pin.12016. (査読あり)
- 4 Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. Expression of the potential cancer stem cell markers, CD133, CD44, ALDH1, and β -catenin, in primary lung adenocarcinoma—their prognostic significance. *Pathol Int.* 2012;62(12):792-801. DOI:10.1111/pin.12019. (査読あり)
- 5 Woo T, Saito H, Yamakawa Y, Komatsu S, Onuma S, Okudela K, Nozawa A, Aihara M, Ikezawa Z, Ishigatsubo Y. Severe obliterative bronchitis associated with Stevens-Johnson syndrome. *Intern Med.* 2011;50(22):2823-7. (査読あり)
DOI:10.2169/internalmedicine.50.5582.
- 6 Ohe M, Yokose T, Sakuma Y, Osanai S, Hasegawa C, Washimi K, Nawa K, Woo T, Hamanaka R, Nakayama H, Kameda Y, Yamada K, Isobe T. Stromal micropapillary pattern predominant lung adenocarcinoma—a report of two cases. *Diagn Pathol.* 2011;6:92. (査読あり)
- Doi:10.1186/1746-1596-6-92.
- 7 Sato H, Sakaeda M, Ishii J, Kashiwagi K, Shimoyamada H, Okudela K, Tajiri M, Ohmori T, Ogura T, Woo T, Masuda M, Hirata K, Kitamura H, Yazawa T. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene silencing in lung adenocarcinomas. *Pathol Int.* 2011 Jan;61(1):19-27. (査読あり)
doi:10.1111/j.1440-1827.2010.02612.
- 8 Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, Kitamura H, Masuda M. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010;4(1):32-42. (査読あり)
(URL:<http://ijcep.com/files/IJCEP1011005.pdf>)
- [学会発表] (計 8 件)
- 1 禹哲漢他. 非小細胞肺癌術前導入治療後の組織学的治療効果および術後再発予測に対するFDG-PET/CTの有用性. 第53回日本肺癌学会総会. 2012. 11. 09. 岡山全日空ホテル(岡山県).
- 2 禹哲漢他. 肺癌術前導入治療の効果判定にFDG-PET/CTは有用か?—CTとの比較—. 第29回日本呼吸器外科学会総会. 2012. 5. 17. 秋田キャッスルホテル(秋田県).
- 3 禹哲漢他. 肺腺癌の腫瘍増大速度とEGFR/KRAS 遺伝子変異の検討. 第52回日本肺癌学会総会. 2011. 11. 3. 大阪国際会議場(大阪府).
- 4 禹哲漢他. ステージI非小細胞肺癌縮小手術時におけるSafety marginの解析. 第64回日本胸部外科学会総会. 2011. 10. 10. 名古屋国際会議場(愛知

県).

- 5 禹哲漢他. 原発性肺癌との鑑別を要した、尾骨 Adamantinoma 術後 17 年目に肺転移した 1 例. 第 169 回日本肺癌学会関東支部会. 2011. 6. 18. 京王プラザホテル(東京都).
- 6 禹哲漢他. 肺門部リンパ節に対する EBUS-TBNA の診断的有用性. 第 34 回日本呼吸器内視鏡学会総会. 2011. 6. 16. アクトシティー浜松(静岡県).
- 7 禹哲漢他. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011. 5. 26. (震災のため紙上発表).
- 8 禹哲漢他. ステージ I 非小細胞肺癌に対する縮小手術の長期予後. 第 28 回日本呼吸器外科学会総会. 2011. 5. 12. 別府ビーコンプラザ(大分県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

禹 哲漢 (WOO TETSUKAN)
横浜市立大学・医学研究科・共同研究員
研究者番号：9 0 5 3 7 1 7 7

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：