

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592099

研究課題名(和文) 各種プロテオーム解析を用いた微乳頭構造を呈する肺腺癌特異的マーカーの獲得

研究課題名(英文) Proteomic analysis of lung adenocarcinoma with micropapillary component to achieve valuable biomarker

研究代表者

佐藤 之俊 (Sato, Yukitoshi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90321637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肺腺癌において微乳頭構造(MPC)を有する肺腺癌(AC-MPC)は、通常の肺腺癌に比し予後不良である事が報告されているが、その分子病理学的機構は未だ解明されていない。我々は2次元電気泳動法を用いてAC-MPCにおけるタンパク質発現の網羅的解析を行い、MPCにおけるvimentinの高発現を確認した。またvimentinの発現と種々の臨床病理学的因子との相関を解析し、vimentinがAC-MPCにおける予後規定因子であることを証明した。AC-MPCにおけるvimentinの高発現は低分化な性格や脱分化を示唆する所見と考えられ、今後の研究や治療に応用できる可能性が見いだされる結果となった。

研究成果の概要(英文)：The factors conferring the increased malignancy on lung adenocarcinoma with micropapillary component (AC-MPC) remain to be elucidated. 2-dimensional gel electrophoresis, several proteins differentially expressed between AC-MPC and conventional adenocarcinoma (CAC); in particular, vimentin, one of the proteins, was most up-regulated in AC-MPC. Immunohistochemistry revealed that vimentin was expressed in most of MPC. Within the AC-MPC entity, higher vimentin expression was correlated with more frequent vascular invasion and more advanced node metastasis ( $P<0.05$ ), and multivariate analysis showed that high vimentin expression and worse node statuses were independent indicators of adverse prognosis ( $P<0.05$ ). In conclusion, vimentin expression is prevalent and markedly up-regulated in MPC, which might reflect the biological essence of poorer differentiation or dedifferentiation of MPC, and this might have a role in the increase of invasiveness and consequent more malignant nature of MPC.

研究分野：病理学

キーワード：肺腺癌 微乳頭構造 ビメンチン 免疫組織化学染色 二次元電気泳動 網羅的タンパク発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において肺癌は悪性腫瘍のうち最も多い死亡原因となっており、現在では死亡数も年間7万人を超えている。それに対する治療方法の進歩は日進月歩であり、徐々に5年生存率も改善傾向が見られているが、満足できる状況ではない。また、1990年代前半から癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常を予後因子として臨床応用する研究が数多く行われていたが、TNM分類を超えるような臨床マーカーは存在していないのが現状であり、早期診断や治療効果判定および予後予測因子等に有用なマーカーの獲得が求められている。

肺癌の主な組織型には腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌があるが、我々は肺腺癌における微乳頭構造 (Micropapillary component: 以下 MPC) の出現に注目した。代表者らは、病理学的、細胞学的に本構造を有する肺腺癌は原発巣から容易に遊離して脈管侵襲やリンパ節転移を起こし、予後不良であることを報告している (*Am J Surg Pathol* 27: 101-109, 2003; *Cancer* 102: 81-86, 2004)。

上記のごとく肺腺癌において MPC 構造を有するものは浸潤・転移を来しやすいという臨床背景から、MPC 構造の獲得は高分化腺癌が進展して悪性を増す際の第一段階と推定される。そのため MPC 構造を有する肺腺癌 (Adenocarcinoma with micropapillary component: 以下 AC-MPC) と通常の肺腺癌 (Conventional adenocarcinoma: 以下 CAC) 患者の腫瘍組織や血清中のタンパク質分析を行うことによって癌の高悪性度化に関与する因子あるいは浸潤・転移に関与する因子を同定できる可能性が高い。今回の研究における我々の具体的目的は、予後不良な AC-MPC に特異的なバイオマーカー検出を行う事であり、それらの中で癌の転移や浸潤あるいは高悪性度に関与するタンパク質の同定ができれば、肺癌の早期診断や治療計画を立てる際の判断材料として有用なものとなるのみならず、新規治療開発にも貢献できる可能性が高く、社会への貢献も大きいと思われた。

## 2. 研究の目的

本研究は肺腺癌において予後不良因子として重要な MPC 構造に着目し、AC-MPC および CAC の組織や患者血清において同定されるタンパク質や自己抗体の相違から AC-MPC に特異的なマーカー候補タンパク質の同定を行

い、新たなバイオマーカーを獲得する事を目的とした。得られたマーカーは多数検体を用いて有用性を証明し、それらを用いて早期診断や新たな治療方法の指針を確立する。

## 3. 研究の方法

### 臨床研究

解析の対象は2003年1月から2012年12月までに北里大学病院で外科的に摘出され、病院病理部で収集してきた肺腺癌のうち、病理組織学的に AC-MPC と診断された症例である。対照群としては同時期に切除された通常の構造を示す肺腺癌 (CAC) を用いる。切除肺組織における MPC 発現の評価としては、手術検体肺組織に対し腫瘍最大断面における HE 染色標本を再鏡検し、MPC の定量化を行う。具体的には腫瘍全体における MPC の占める割合を求める。また、AC-MPC および CAC における臨床病理学的因子の解析を行った。具体的には AC-MPC および CAC における年齢・性別・喫煙歴・腫瘍径・胸膜真珠運・脈管浸潤・リンパ節転移・術後病理病期等を調査し、比較検討した。

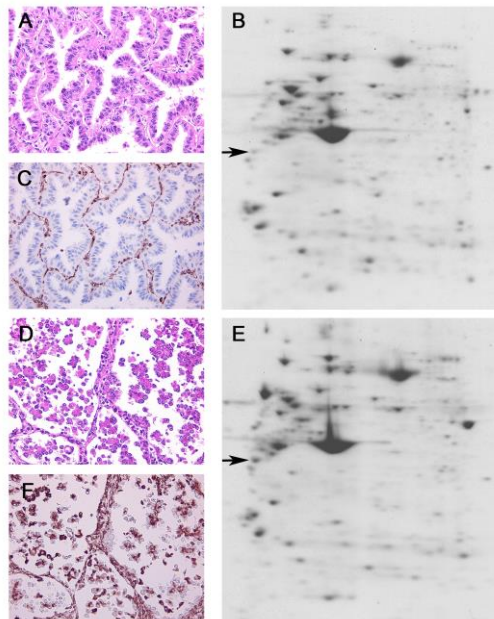
### 基礎研究

基礎研究においては、AC-MPC および CAC 患者の手術検体を対象に二次元電気泳動法を用いてタンパク質分析を行い、AC-MPC に特異的な抗原タンパク質の検索を行った。同定された抗原タンパクと AC-MPC および CAC におけるタンパク発現及び臨床病理学的因子との相関を調査した。

## 4. 研究成果

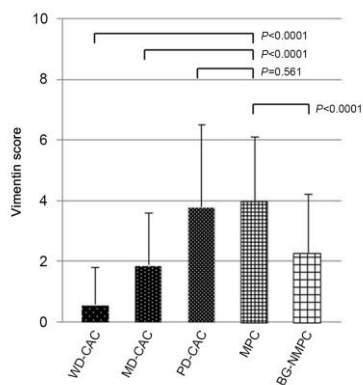
臨床研究においては、2003年1月から2012年12月までに外科的切除を施行された原発性肺癌の review を行った。根治切除された肺腺癌症例は629例であった。その中で AC-MPC は、101例 (16.1%) であり、CAC は528例 (83.9%) であった。AC-MPC 群と CAC 群で臨床病理学的因子の解析を行ったところ、年齢、腫瘍径、胸膜浸潤、脈管浸潤、リンパ節転移、術後病理病期で有意差を認めた。

基礎研究においては、外科的に摘出された AC-MPC もしくは CAC 症例の凍結組織標本からタンパクを抽出し、両者のタンパク発現プロファイリングを二次元電気泳動にて比較した。発現に差のあるタンパクとして、複数のタンパクが同定された。それらのタンパクのうち、上皮間葉転換や腫瘍の分化度と関連の深い vimentin に着目した。

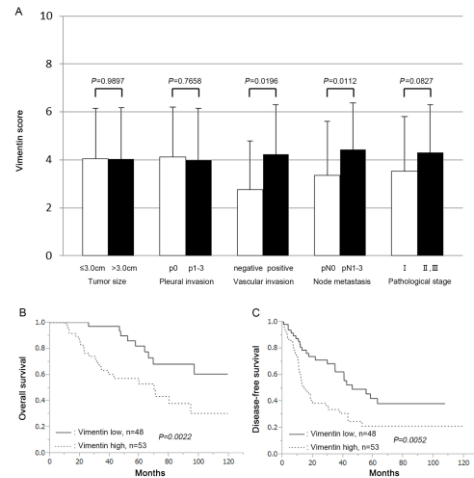


Rank	Protein name	Molecular function	AC-MPC/CAC
1	Vimentin	Cytoskeletal structural protein	3.5
2	Anterior gradient protein 2 homolog	Cell migration	3.4
3	Ferritin light chain	Storage protein	2.8
4	Keratin, cytoskeletal 8	Structural molecule activity	2.4
5	Alpha-actinin-1	Cytoskeletal protein binding	2.3
6	Protein disulfide isomerase	Enzyme	2.3
7	Keratin, cytoskeletal 19	Cytoskeletal structural protein	2.1
8	Endoplasmic HSP90B1	Heat shock protein activity	2.1
9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Ribonucleoprotein	1.9
10	Heat shock protein 90-beta	Chaperone activity	1.8
11	Isoform 1 of Gelsolin	Cytoskeletal structural protein	1.7
12	Alpha-soluble NSF attachment protein	Transport	1.6
13	Cathepsin D	Protein metabolism	1.6
14	ATP synthase subunit alpha	Transporter activity	1.5
15	Pyruvate kinase isozyme M1/M2	Enzyme	1.5
16	Moesin	Cytoskeletal structural protein	1.5
17	Heat shock cognate 71 kDa protein	Heat shock protein activity	0.6
18	Superoxide dismutase	Enzyme	0.6
19	Calreticulin	Chaperone activity	0.5

Vimentin の免疫染色を AC-MPC および CAC に対して行い、発現と臨床病理学的因子との関連を調査したところ、CAC では vimentin の発現と腫瘍の分化度に相関を認めた。一方、AC-MPC においては、脈管浸潤およびリンパ節転移陽性の症例で有意に vimentin の高発現を認めた ( $p < 0.05$ )。



AC-MPC 症例において、vimentin 高発現群と低発現群での群間比較を行うと、両群間の予後に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。



また、多変量解析においても vimentin の高発現が一つの独立した予後因子となり得る結果となった。以上より、AC-MPC における vimentin の発現は、患者予後の予測因子となり、有用な biomarker となり得る可能性が示唆される結果となった。

Variable	Overall Survival		Disease-Free Survival	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
Tumor size ( $\le 3.0$ cm, $>3.0$ cm)	1.69 (0.80-3.66)	0.16	1.81 (1.04-3.17)	0.035*
Pleural invasion (p0, p1-p3)	1.08 (0.72-1.59)	0.68	1.1 (0.83-1.43)	0.5*
Vascular invasion (Negative, Positive)	1.71 (0.44-11.34)	0.47	4.77 (1.38-30.00)	0.01*
Node metastasis (N0, N1-N3)	1.68 (1.03-2.82)	0.039	1.72 (1.22-2.47)	0.0018*
MPC vimentin score (Low, High)	2.72 (1.23-6.32)	0.012	1.72 (1.00-2.99)	0.047*
BG-NMPC vimentin score (Low, High)	1.21 (0.53-2.68)	0.69	0.89 (0.49-1.55)	0.69*

Abbreviations: MPC, micropapillary component; BG-NMPC, background non-micropapillary component\*

## 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 2 件)

① Hiroyasu Nakashima, Shi-Xu Jiang, Yuichi Sato, Keika Hoshi, Toshihide Matsumoto, Ryo Nagashio, Makoto Kobayashi, Yukiko Matsuo, Kazu Shiomi, Kazushige Hayakawa, Makoto Saegusa, Yukitoshi Satoh. Prevalent and Up-regulated Vimentin Expression in Micropapillary Components of Lung Adenocarcinomas and Its Adverse Prognostic Significance. *Pathol Int.* 2015 Apr;65(4):183-92.

DIO:10.1111/pin.12257 査読有

② Hiroyasu Nakashima, Shi-Xu Jiang, Keika Hoshi, Makoto Saegusa, Yukitoshi Satoh. : Higher incidence of postoperative up-staging in lung micropapillary adenocarcinoma. *Kitasato med J.* 2015; 45: 80-85.  
URL:<http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KMJ45-1/KMJ45-1p080-085.pdf> 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Hiroyasu Nakashima, Shi-Xu Jiang, Atsuko Umezawa, Kazu Shiomi, Yuichi Sato, Makoto Saegusa, Yukitoshi Satoh: A clinicopathological and proteomic analysis of pulmonary adenocarcinoma with micropapillary component. 第 73 回日本癌学会総会 2014 年 9 月 25 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

②中島 裕康, 蔣 世旭, 林 祥子, 石井 大, 山崎 宏継, 内藤 雅仁, 三窪 将史, 小川 史洋, 塩見 和, 佐藤 雄一, 三枝 信, 佐藤 之俊. 微乳頭成分を有する肺腺癌におけるタンパク発現の解析および臨床病理学的意義の検討. 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日 広島国際会議場 (広島県広島市)

③Hiroyasu Nakashima, Shi-Xu Jiang, Ryo Nagashio, Toshihide Matsumoto, Dai Ishii, Hirotsugu Yamazaki, Masahito Naitoh, Fumihiko Ogawa, Yoshio Matsui, Yuichi Sato, Kazu Shiomi, Akira Iyoda, Makoto Saegusa, Yukitoshi Satoh. A CLINICOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF PULMONARY ADENOCARCINOMA WITH MICROPAPILLARY COMPONENT, ASCVTS(第 21 回アジア心臓血管胸部外科学会)2013 年 4 月 6 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 之俊 (SATO, Yukitoshi)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号 : 90321637

### (2) 研究分担者

佐藤 雄一 (SATO, Yuichi)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号 : 30178793

蔣 世旭 (JIANG, Shi-Xu)  
北里大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 70276153

### (3) 研究協力者

中島 裕康 (NAKASHIMA, Hiroyasu)  
北里大学・医学部・助教