

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461193

研究課題名(和文)小細胞肺癌におけるネスチンの臨床的意義および治療標的としての研究

研究課題名(英文)Clinical and therapeutic implications of nestin in small cell lung cancer

研究代表者

前野 健 (Maeno, Ken)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10444952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ネスチンは神経幹細胞に発現し中枢神経系発生に関わる型中間径フィラメント蛋白である。本研究では、ネスチンが小細胞肺癌の悪性形質や臨床転帰に及ぼす影響について検討した。ネスチンは *in vivo*における腫瘍増殖、さらに抗癌剤耐性にも関与していた。患者検体を用いてネスチン発現を免疫組織染色により検討したところ、二次治療における病勢制御率はネスチン陽性例でやや低い傾向にあった。さらに無増悪生存期間はネスチン陽性例で有意に短かった。本研究により、ネスチンは小細胞肺癌における抗癌剤耐性や臨床転帰へ影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nestin is a class VI intermediate filament protein expressed in stem/progenitor cells during the development of the central nervous system. In this study, we examined whether the expression of nestin affect malignant feature and clinical outcome in small cell lung cancer (SCLC). In nestin knock-down and overexpression cell lines, nestin expression was related to cell proliferation *in vivo* and resistance to anticancer drugs. In second-line chemotherapy, nestin-positive patients evaluated by immunohistochemistry of tumor specimens tended to have a lower disease control rate than negative. Furthermore, progression free survival was significantly shorter in nestin-positive patients. Our results suggest that nestin expression lead to resistance to chemotherapy and worse outcome in SCLC patients.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：小細胞肺癌 ネスチン

## 1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は肺癌の約 15%を占める予後不良な組織型であるが、ここ約 30 年間に渡り治療成績の進歩が得られていない。治療の主体は抗癌剤であり初回治療には一時的に奏功するものの、間もなく再発し抗癌剤耐性を示す。故に、治療成績向上のためには新たな治療戦略の確立、即ち分子標的治療等の開発が急務である。

小細胞肺癌は神経内分泌癌の性質を有し、発癌には神経発生機構の関与が指摘されている。ネスチンは神経幹細胞に発現し、中枢神経発生過程において重要な役割を担う型中間径フィラメント蛋白である。我々はネスチンに着目し、小細胞肺癌細胞株を用いて検討を行ったところ、高頻度の発現亢進さらに増殖能・浸潤能への関与を世界に先駆け報告した (Lung cancer 81:174-9,2013)。それ故、ネスチンは小細胞肺癌における悪性形質の獲得や維持に重要な役割を担っていると考えた。

## 2. 研究の目的

小細胞肺癌におけるネスチンを標的とした抗腫瘍効果、抗癌剤耐性化へのネスチンの関与、さらに患者組織検体を解析することによりネスチンの臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ネスチンを標的とした in vivo における抗腫瘍効果

最初に、小細胞肺癌細胞株 DMS53 に shRNA 発現ベクターを導入する事によりネスチン発現を抑制した安定細胞株を樹立した。ネスチン発現抑制株とコントロール株をそれぞれ SCID マウスの側腹部に皮下移植し、その後の腫瘍径を経時的に測定することにより、腫瘍形成能を比較検討した。

(2) 抗癌剤耐性細胞株におけるネスチン発現  
当研究室で所持している肺癌細胞株 PC6, PC9, PC14 およびそれぞれのシスプラチン耐性株

を用いて、ネスチンの蛋白発現の差異を親株と耐性株の間で比較検討した。

(3) 抗癌剤耐性化におけるネスチンの関与  
MTS アッセイを用いて、下記のそれぞれの細胞株間で抗癌剤感受性に差異があるかどうかを比較検討した。

A) 小細胞肺癌細胞株 SLKC17 に発現ベクターを導入しネスチンを過剰発現させた安定細胞株、およびコントロール株

B) 上記(1)で使用したネスチン発現抑制株、およびコントロール株

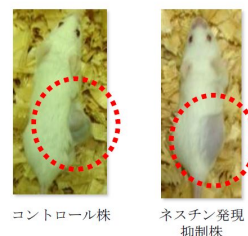
### (4) 小細胞肺癌の臨床検体におけるネスチン発現

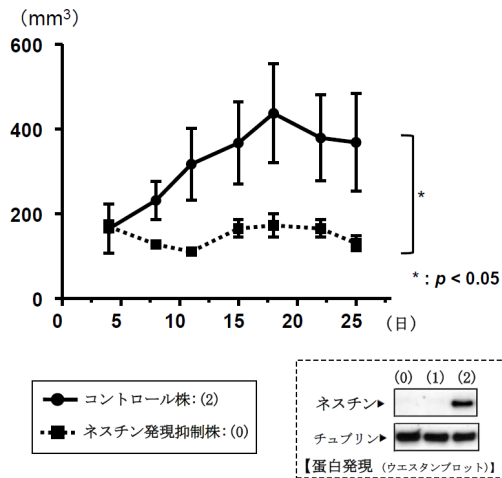
気管支鏡、CT ガイド下生検もしくは手術により得られた患者検体を用いて、小細胞肺癌組織におけるネスチン発現を免疫組織化学法により解析した。抗ネスチン抗体(10C2, ab22035 : abcam)を用いて、名古屋市立大学大学院臨床病態病理学教室との共同研究として行った。5%以上の腫瘍細胞が染色されれば発現陽性と判定した。名古屋市立大学病院にて2004年4月~2017年3月の間に小細胞肺癌の治療を行い本解析が可能であった66症例を対象とした。同施設の倫理審査委員会での承認を得た上で研究を行った。

## 4. 研究成果

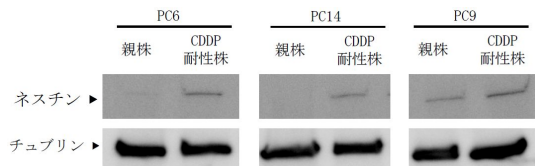
### (1) ネスチンを標的とした in vivo における抗腫瘍効果

ネスチン発現抑制株を接種したマウスでは、コントロール株を接種したマウスと比べ、腫瘍径は有意に小型であった。故に、ネスチン発現を抑制することにより、in vivo における細胞増殖を阻害することが示された。



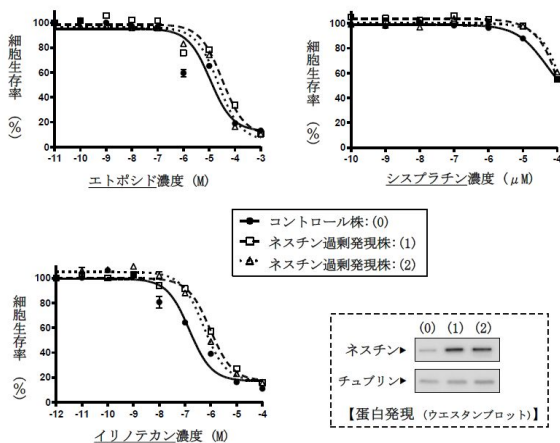


(2) 抗癌剤耐性細胞株におけるネスチン発現  
シスプラチン (CDDP) 耐性株では親株と比べ、ネスチン蛋白の発現が3種すべての細胞株で亢進していた。故に、耐性化にはネスチン発現上昇が関与することが示唆された。



(3) 抗癌剤耐性化におけるネスチンの関与

A) 抗癌剤は、シスプラチン、エトポシド、イリノテカンの3薬剤を用いた。細胞株へ各薬剤を暴露しMTSアッセイを用いて細胞生存率を計測したところ、コントロール株と比較してネスチン過剰発現株2株はいずれも薬剤感受性が低下した。

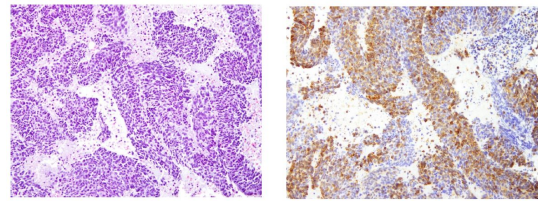


B) ネスチン発現抑制株では、コントロール株と比較してイリノテカン感受性の改善を認めた (データ掲載省略)。

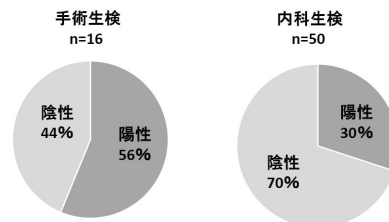
上記 (2)と(3)により、小細胞肺癌細胞の抗癌剤耐性にはネスチンの関与が示された。

#### (4) 小細胞肺癌の臨床検体におけるネスチン発現

ネスチン発現が陽性であった症例の代表的な病理画像を下記に示す。



次に、小細胞肺癌患者におけるネスチン陽性率を検討した。手術検体でのネスチン陽性率は56%で、これは内科検体 (気管支鏡、CTガイド下生検) の30%より高値であった。なお、同一腫瘍組織内のネスチン発現は部位による不均一性を認める傾向にあった。内科検体は小型組織のため発現陽性部位を採取できる確率が低くなることから、発現率の差を生じる原因と推測された。



次に、ネスチン陽性群と陰性群における患者背景を検討した。両群間において明らかな差異を認めなかった。

#### 手術症例

	Nestin (-) N=7	Nestin (+) N=9	p value
年齢	70 (58-75)	76 (65-83)	0.023
性別 (F / M)	1 / 6	1 / 8	1.000
喫煙歴 (pack-year)	80 (25-104)	45 (23-104)	0.222
LD / ED*	7 / 0	9 / 0	1.000
血清ProGRP	25.5 (9.3-76.4)	39.4 (14.0-120)	0.211

\*LD: 限局型  
ED: 進展型

#### 内科症例

	Nestin (-) N=35	Nestin (+) N=15	p value
年齢	70 (44-83)	67 (47-85)	0.443
性別 (F / M)	4 / 31	4 / 11	0.220
喫煙歴 (pack-year)	50 (10-160)	50 (10-110)	0.865
LD / ED*	14 / 21	6 / 9	1.000
血清ProGRP	710 (29.8-18900)	967 (39.6-11200)	0.441

次いで、ネスチン陽性群と陰性群における抗癌剤治療の反応性を検討した。1次治療では奏効率も病勢制御率も同等であったが、2次治療では病勢制御率がネスチン陽性群でやや低下する傾向にあった。

#### 奏効率(RR)

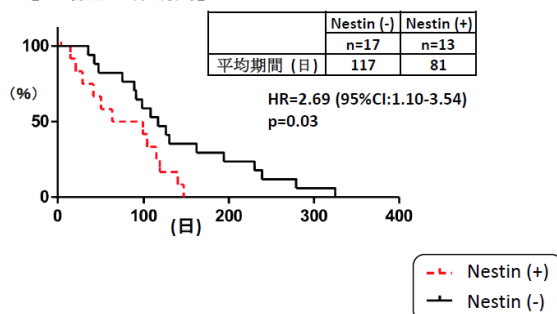
	Nestin (-)	Nestin (+)	p value
1次治療 (進展型)	18/21 (85.7%)	7/8 (87.5%)	1.00
2次治療 (全症例)	6/17 (35.3%)	4/12 (33.3%)	1.00

#### 病勢制御率(DCR)

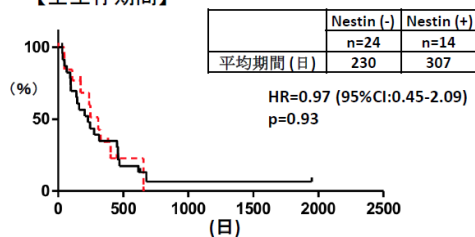
	Nestin (-)	Nestin (+)	p value
1次治療 (進展型)	19/21 (90.5%)	7/8 (87.5%)	1.00
2次治療 (全症例)	13/17 (76.5%)	7/12 (58.3%)	0.42

次に、無増悪生存期間 (PFS) を検討したところ 1次治療では両群間に差はなかったが (データ掲載省略) 2次治療ではネスチン陽性群は陰性群と比べ、有意に短縮していた。しかし全生存期間には差異を認めなかった。

#### 【無増悪生存期間】



#### 【全生存期間】



本研究により、ネスチンは小細胞肺癌における悪性形質の獲得や維持を介して臨床転帰へも影響を与える可能性が示唆された。

#### 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5件)

1. Maeno K, Fukuda S, Oguri T, Niimi A.

Nivolumab-induced asthma in a patient with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 28:2891,2017

DOI:10.1093/annonc/mdx455 査読有

2. Tsuji T, Sakamori Y, Ozasa H, Yagi Y, Ajimizu H, Yasuda Y, Funazo T, Nomizo T, Yoshida H, Nagai H, Maeno K, Oguri T, Hirai T, Kim YH. Clinical impact of high serum hepatocyte growth factor in advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 8:71805-71816,2017

DOI:10.18632/oncotarget.17895 査読有

3. Oguri T, Kunii E, Fukuda S, Sone K, Uemura T, Takakuwa O, Kanemitsu Y, Ohkubo H, Takemura M, Maeno K, Ito Y, Niimi A. Organic cation transporter 6 directly confers resistance to anticancer platinum drugs. *Biomed Rep.* 5:639-643, 2016 DOI:10.3892/br.2016.772 査読有

4. Kunii E, Oguri T, Kasai D, Ozasa H, Uemura T, Takakuwa O, Ohkubo H, Takemura M, Maeno K, Niimi A : Organic cation transporter OCT6 mediates cisplatin uptake and resistance to cisplatin in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 75:985-991,2015

DOI:10.1007/s00280-015-2723-x 査読有

5. Ozasa H, Oguri T, Maeno K, Takakuwa O, Kunii E, Yagi Y, Uemura T, Kasai D, Miyazaki M, Niimi A. Significance of c-MET overexpression in cytotoxic anticancer drug-resistant small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 105:1032-1039, 2014 DOI: 10.1111/cas.12447 査読有

[学会発表](計7件)

1. Sone K, Maeno K, Kunii E, Takakuwa O, Takeuchi A, Fukuda S, Asano T, Kanemitsu Y, Ohkubo H, Takemura M, Ito Y, Oguri T, Niimi A. Expression of nestin affect resistance to chemotherapy and clinical

- outcome in small cell lung cancer. 109<sup>th</sup> American Association of Cancer Research Annual Meeting. 2018/4. Chicago, USA
2. 曾根一輝、福田悟史、小栗鉄也、國井英治、上村剛大、高桑修、前野健、新実彰男：プラチナ系抗癌剤シスプラチンとオキサリプラチンの薬剤耐性化と OCT6 発現との関連性。第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 横浜
  3. Oguri T, Kunii E, Fukuda S, Uemura T, Takakuwa O, Maeno K, Kanemitsu Y, Ohkubo H, Takemura M, Ito I, Niimi A. Organic cation transporter 6 directly confers resistance to anticancer platinum drugs. European Society for Medical Oncology Asia 2015 Congress. 2015/12 Singapore.
  4. 八木由生、小笹裕晃、前野健、辻貴宏、阪森優一、味水瞳、野溝岳、永井宏樹、金永学、小栗鉄也、三嶋理晃。小細胞肺癌における HGF/c-MET シグナルの活性化による ABC トランスポーターの発現上昇と抗癌剤耐性：74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 名古屋
  5. 阪森優一、小笹裕晃、國井英治、八木由生、辻貴宏、味水瞳、野溝岳、永井宏樹、金永学、前野健、小栗鉄也、三嶋理晃。肺癌細胞株における ALDH7A1 の発現と抗がん剤耐性および腫瘍形成能との関連性の検討：74 回日本癌学会学術総会 ,2015 年 10 月 名古屋
  6. 小笹裕晃、前野健、小栗鉄也、國井英治、八木由生、阪森優一、金永学、三嶋理晃、新実彰男。細胞障害性抗癌剤耐性化における c-MET 発現上昇の意義：第 55 回日本肺癌学会総会。2014 年 11 月 京都
  7. Kunii E, Ozasa H, Oguri T, Maeno K, Takakuwa O, Uemura T, Niimi A. TAS-115, a novel MET + VEGFRs dual inhibitor, decreases the cytotoxic anticancer drug resistance in lung cancer

105<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association of Cancer Research. 2014/4. San Diego, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前野 健 (MAENO, Ken)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10444952

### (2) 研究分担者

小栗 鉄也 (OGURI, Tetsuya)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60363925

小笹 裕晃 (OZASA, Hiroaki)  
京都大学・医学研究科・特定助教  
研究者番号：80572015