

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462129

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌における抗炎症及び抗線維化による腫瘍制御とその分子機序の解明

研究課題名(英文) Tumor suppression mechanism through anti-inflammation and anti-fibrosis in non-small cell lung cancer

研究代表者

庄司 文裕 (SHOJI, Fumihiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90444851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：(1)炎症性サイトカイン発現と肺癌悪性度との関連性を検討(結果) VEGF (p=0.047)、Fibronectin (p=0.011)、HGF (p=0.02) のmRNA発現と脈管浸潤に相関が認められた。(2)非小細胞肺癌(IP合併肺癌、非合併肺癌)癌部及び非癌部における多項目サイトカイン同時定量解析(結果) IP非合併例ではIL-6は非癌部での発現量が高く、VEGFは腫瘍部での発現が高かった。IP合併例ではIL-6は非癌部での発現量が高く、IL-1, VEGF, FGFは腫瘍部での発現が高かった。非癌部、癌部いずれにおいてもFGFはIP合併例で高値であった。

研究成果の概要(英文)：(1) Analysis of inflammatory cytokines and malignant grade of lung cancer was done. (Results) VEGF (p=0.047), Fibronectin (p=0.011) and HGF (p=0.02) mRNA expression were significantly associated with intratumoral vessel invasion. (2) Multicytokines analysis of IP or non-IP NSCLC was performed. (Results) In NSCLC without IP, IL-6 mRNA expression in non-cancerous lesion was significantly higher than that in cancerous lesion. In addition, VEGF mRNA expression in cancerous lesion was significantly higher. In NSCLC with IP, IL-6 mRNA expression in non-cancerous lesion was also significantly higher. On the other hand, IL-1, VEGF and FGF mRNA expression in cancerous lesion were significantly higher, respectively. FGF mRNA expression both in cancerous and non-cancerous lesion with IP, was significantly higher than that with non-IP.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：非小細胞肺癌 抗炎症 抗線維化 肺癌悪性度

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

肺癌の予後と治療法

原発性肺癌は世界の癌死亡原因の1位であり、本邦においても最も多い癌死の原因疾患(男性49,035人、女性18,548人:2009年)である。また、今後もその比率は上昇し、10年後においては約2倍(10万人/年)になると考えられている。なかでも80-85%を占める非小細胞肺癌に対する治療成績の向上は急務と考えられる。治癒切除の対象となるI-III A期非小細胞肺癌に対する第一選択は手術であるが、手術療法にて完全切除が期待できるのは約30%、完全切除された症例でも5年生存率は50%程度と決して満足できるものではない。また、肺癌患者の3/4は診断時に進行癌として発見され、化学療法や放射線療法にて治療されるものの、その平均生存期間は約7-11ヶ月と不良であり、新しい治療法や予防法の開発が急務である。

肺線維化と肺癌

難治性疾患に指定されている特発性肺線維症(Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF)症例は、しばしば肺癌を合併することが知られている。IPFあるいは特発性間質性肺炎と肺癌の合併は5-30%と高頻度であるとされており、IPFそのものが肺癌発症の独立した因子であるとする報告もある[Am J Respir Crit Care Med 2000]。また、肺に重複癌のみられる頻度が他の肺気腫などの肺基礎疾患より優位に高いとする報告もある。しかしながらIPF合併肺癌の治療は、外科療法においては術後のIPFの急性増悪の可能性、がん化学療法における薬剤性急性肺障害の危険性、さらには放射線療法における放射性肺臓炎の危険性を孕んでおり、その治療には多くの制限がある。また近年、喫煙関連肺疾患としてCombined Pulmonary Fibrosis and Emphysema (CPFE)

が知られており、慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD)よりも高頻度に肺癌を合併することが報告されている[Radiographics 2008, Respirology 2010]。今後もこのような肺線維症合併肺癌は増加することが予想される。従って、こうした肺線維症合併肺癌に対する新規治療法の開発が急務であることは言うまでもない。

肺線維症と肺癌関連遺伝子異常

肺線維症では慢性的な肺上皮障害により、肺癌関連遺伝子損傷が蓄積し発癌に至ると考えられているが、肺線維症における病変部位では種々の肺癌関連遺伝子異常の関与が示唆されている[J Cell Mol Med 2002]。

肺線維症と炎症性サイトカイン

肺の線維化が生じている部位では、腫瘍壊死因子:tumor necrosis factor (TNF)、Interleukin-1 beta (IL-1)、血小板由来増殖因子:platelet derived growth factor (PDGF)などの炎症性サイトカインの産生が持続していることが知られている。一方、肺組織の線維化は、正常な組織修復過程の病的な過剰状態であり、肺損傷刺激の繰り返しにより、トランスフォーミング増殖因子:transforming growth factor-beta1 (TGF-1)やfibronectinといった線維化促進サイトカインの持続産生あるいは過剰産生といった悪循環に陥っているとされている(N Eng J Med 1994)。

肺線維化及び肺癌と炎症との関連性

肺の線維化が生じている部位では、炎症性サイトカインあるいは線維化促進サイトカインの産生が持続していることが知られている。しかし、これらの炎症性サイトカインが肺発癌や肺癌の進展にどのような作用を有しているかは明らかでなかった。そこで、我々はこれまでに手術標本を用いた研究で、肺癌組織における炎症性サイトカイン並びに線維化促進サイトカインの

mRNA レベルの発現状態を検証した。方法として、癌部、非癌部（腫瘍隣接部及び腫瘍から 3cm 以上離れた腫瘍遠隔部）の 3 か所の凍結標本を採取し、total RNA を抽出、real-time RT-PCR 法にて種々の炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカイン（TGF- β 、vascular epithelial growth factor: VEGF、fibroblast growth factor-2: FGF-2、Fibronectin、hepatocyte growth factor: HGF、TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、insulin growth factor-1: IGF-1）の mRNA レベルでの発現を解析した。その結果、VEGF、Fibronectin、HGF、IL-1 β の 4 種類の炎症性サイトカインならびに線維化促進サイトカインの腫瘍部における高発現が認められたのみならず、腫瘍隣接部においてもこうしたサイトカインの高発現を認めた。よって、炎症性サイトカインならびに線維化促進サイトカインは癌細胞自身によってのみならず、近隣細胞（間質細胞）からも過剰産生されていることが示唆された。肺における慢性炎症それに伴う肺線維化は、正常肺組織からの線維化、線維化肺からの発癌、悪性度獲得に重要な関連性を有する可能性がある。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌における炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカインの発現・機能を網羅的に解析することによりその転移・浸潤のメカニズムを解明し、Key となるサイトカインを同定し、新規治療のターゲットとなりうるかについて検討する。

- (1) 非小細胞肺癌において炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカインの発現を網羅的に検討し、臨床病理学的因子との関連性を検討する。
- (2) Key となるサイトカインを同定、非小細胞肺癌株にて同定し

たサイトカイン導入による腫瘍細胞の悪性度（増殖、転移能）の誘導実験を行う。

- (3) 抗炎症薬あるいは抗線維薬を用いて同定したサイトカイン発現を抑制し、腫瘍細胞の悪性度（増殖、転移能）の抑制実験を行う。
- (4) 抗炎症薬あるいは抗線維薬を用いて動物実験モデルにおける抗腫瘍効果の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌における**炎症性サイトカイン、線維化促進サイトカインの mRNA 発現解析**：

外科切除検体を用いた real-time PCR を行う。各種炎症性サイトカインのプライマーを設定し mRNA レベルでの発現解析を行う。また、炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカイン発現と臨床病理学的因子との相関関係を解析する。

(2) 非小細胞肺癌における**炎症性サイトカイン、線維化促進サイトカインの蛋白発現解析**：

外科切除検体を用いた免疫組織化学染色を行う。炎症性サイトカイン及び線維化マーカーの各種抗体を使用する。また、炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカイン発現と臨床病理学的因子との相関関係を解析する。

(3) 非小細胞肺癌株を用いた**炎症性サイトカイン、線維化促進サイトカインによる悪性度誘導実験**：

Key となる炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカインを同定後、非小細胞肺癌株による in vitro 下にて炎症性サイトカイン導入による悪性度（増殖能、転移能）誘導実験を行い、その至適濃度、至適投与時期を決定し、更に癌細胞増殖誘導効果を解析する。

(4) **非小細胞肺癌株を用いた抗炎症薬あるいは抗線維薬による炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカイン抑制実験:**

抗炎症薬あるいは抗線維薬を用いて同定したサイトカイン及び線維化促進サイトカイン発現を抑制し、腫瘍細胞の悪性度(増殖、転移能)の抑制実験を行う。その至適濃度、至適投与時期を決定し、更に癌細胞増殖

抑制効果を解析する。

(5) **動物実験モデルによる腫瘍制御実験:**

マウスあるいはラット肺癌モデルによる in vivo 下での抗炎症薬あるいは抗線維薬を用いた腫瘍制御実験を行い至適投与濃度、経路、時期を決定し、その腫瘍抑制効果(腫瘍局所増大抑制、腫瘍浸潤・転移能抑制、生存率等)を解析する。

4. 研究成果

(1) **非小細胞肺癌における炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカインの mRNA 発現解析**

当教室にて切除された非小細胞肺癌 22 症例の癌組織を用いて、炎症性サイトカインの mRNA レベルでの発現を解析し、肺癌の悪性度との関連を検討した。方法として、癌部、非癌部(腫瘍から 3cm 以上離れた腫瘍遠隔部)の凍結標本を採取し、total RNA を抽出、real time RT-PCR 法を用いて種々の炎症性サイトカインおよび線維化促進サイトカイン(TGF- β 、VEGF、FGF-2、Fibronectin、HGF、TNF- α 、IL-1 β 、PDGF、IGF-1、HGF)の mRNA レベルでの発現を解析し、以下の項目につき検討した。

(評価項目)各症例の癌部、非癌部(腫瘍から 3cm 以上離れた腫瘍遠隔部)の mRNA 発現が肺癌の悪性度と関連性がある臨床病理学的因子(分化度、脈管浸潤、胸膜浸潤など)によって差があるかについて検討し

た。

(結果)分化度及び胸膜浸潤との間には相関を認めなかったものの、VEGF(p=0.047)、Fibronectin(p=0.011)、HGF(p=0.02)の mRNA 発現と脈管浸潤に相関が認められた。

(2) **肺癌手術標本の癌部、癌隣接部、非癌部における炎症性サイトカイン及び線維化促進サイトカインの発現・機能を網羅的解析**

【方法】非小細胞肺癌の手術標本より癌部、非癌部から検体を採取し、上清を回収する。
・ストックした上清を Cytometric Bead Array Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD 社)を用いて多項目サイトカイン同時定量解析を行う。

【検討項目】IP, non IP におけるサイトカイン発現の比較を行う。

【対象】2006 年 1 月から 2015 年 12 月までの肺癌切除症例(non IP: 926 例、IP: 49 例) non IP: 65 例を抽出、IP: 33 例計 98 例

【蛋白抽出】凍結標本から組織を採取(15-25mg 程度)、RIPA buffer を加えて、Tissue Lyser で組織を homogenize。遠心(4℃, 10⁴G, 10min)、上清を回収。-80℃で保存。

【蛋白定量】Bradford 法: Quick Start Protein Assay を使用 Standard: BSA (Bovine serum albumin)

【測定】BD Cytometric Bead Array Human Soluble Protein Master Kit, Beads: APC(FL4), APC-Cy7(FL3), Concentration: PE(FL2)

【測定項目】IL-6, IL-1 β , IL-17A, IL-10, VEGF, FGF, TNF, IL-12p, IFN- γ

【結果】

non IP 症例におけるサイトカイン発現: non IP では IL-6 は非癌部での発現量が高く、VEGF は腫瘍部での発現が高かった。

・IL-10, TNF, IL-12p, IFN- γ は検出でき

なかった。

IP 症例におけるサイトカイン発現

・ IL-6 は非癌部での発現量が高く、
IL-1 , VEGF, FGF は腫瘍部での
発現が高かった。

・ IL-10, TNF, IL-12p, IFN- は検出でき
なかった。

non IP, IP のサイトカイン発現量の比較

・ 非癌部, 癌部いずれにおいても FGF は IP
症例で高値であった。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

庄司文裕 (SHOJI FUMIHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号 : 90444851

(2) 研究分担者

前原喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)

九州大学・医学 (系) 研究科 (研究院) ・教
授

研究者番号 : 80165662

岡本龍郎 (OKAMOTO TATSURO)

九州大学・医学 (系) 研究科 (研究院) ・准
教授

研究者番号 : 80568626

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()