

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861130

研究課題名(和文)肺線維症合併肺癌の癌化機構におけるムチン蛋白質過剰発現の関与

研究課題名(英文) Carcinogenesis in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis related to MUC expression

研究代表者

嶋田 善久(Shimada, Yoshihisa)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00459497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症(IPF)は予後不良であり、また線維化肺より肺癌が高率に発生する。この肺の不可逆的線維化を母地とする発癌機序を解明することが本研究の目的である。現在まで、肺の線維化機序に関しては炎症、免疫異常による組織障害等の観点からの研究が大部分であった。しかし近年MUC5BなどのMUC蛋白質遺伝子の影響による粘液過剰産生機構の関与が明らかとなった。本研究では、肺癌診療上様々な制約をもたらすIPF合併肺癌の病態解明と治療を確立すべく、MUC遺伝子によって調節される粘液過剰産生機構が癌化イニシエーターとなるのかどうかについて検証した。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and ultimately fatal disease characterized by a progressive decline in lung function. IPF was also reported to be associated with increased risk of lung cancer as a result of the occurrence of atypical or dysplastic epithelial changes in fibrosis which progressed to invasive malignancy. Clinical and physiological parameters to predict how rapidly patients with IPF might progress, genetic and molecular features are also associated with IPF mortality. It has been shown that IPF patients who have a specific genotype in the mucin MUC5B gene polymorphism experience significantly improved survival. The purpose of this study is to assess the impact of mucin overproduction mechanism potentially involved in carcinogenesis in lung cancer.

研究分野：肺癌外科

キーワード：肺癌 肺線維症 癌化機構 粘液過剰産生

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症(IPF)は加齢、重喫煙を背景に発症する進行性の予後不良な肺疾患であり、また線維化肺からの肺癌発生率は10-30%と高率である。IPF 合併肺癌において肺癌治療が致死的な急性増悪の誘因となるため、IPF の存在は事実上肺癌の治療制限因子である。IPF 合併肺癌の増加は平均余命の延長と、その結果としての加齢肺における慢性炎症性病態の顕在化という側面もある。IPF 合併肺癌に対する有効な治療法の確率は高齢化の進む現代において重要な課題であり、治療法の開発へ向けて線維化・発癌機構の解明が急がれている。

現在まで、肺の線維化機序に関しては炎症、免疫異常による組織障害等の観点からの研究が大部分であった。しかし近年 MUC5B などの MUC 蛋白質遺伝子の影響による粘液過剰産生機構の関与が明らかとなった。本研究では、肺癌診療上様々な制約をもたらす IPF 合併肺癌の病態解明と治療を確立すべく、MUC 遺伝子によって調節される粘液過剰産生機構が癌化イニシエーターとなるのかどうかについて検証した。

2. 研究の目的

IPF の発症・進展機序への関与が明らかとなった MUC5B をはじめとする、気道上皮内の MUC 遺伝子発現と粘液過剰産生メカニズムが、線維化巣での発癌機構に関与するののかどうかについて検討する。

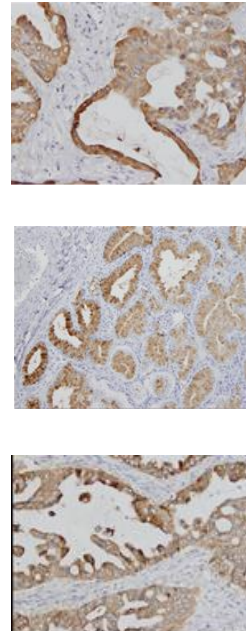
3. 研究の方法

①患者検体の収集とプロファイルの作成、間質性肺炎合併肺癌患者に対する家族性肺線維症(FIP)についての病歴聴取を行った。②軌道上皮内に存在するムチンコア蛋白発現が悪性度、病勢を反映するマーカーとして有用であるかを判断するため、肺癌切除標本を用いて免疫組織学的染色(IHC)による MUC1/4/5A/5B と臨床病理学的因子の関連性についての検討を行った。③IPF 及び FIP 発症との関与が示された MUC5B SNP(re35705950)発現解析を患者切除標本を用いて行った。④ヒト肺癌細胞株及び線維芽細胞を用いた抗がん剤を含む各種蛋白ムチン阻害剤の感受性解析を行った。⑤ヒト肺癌細胞株による MUC5B 蛋白 Western Blotting、線維芽細胞株と in vitro 薬剤投与による形質変化についての検討を行った。

4. 研究成果

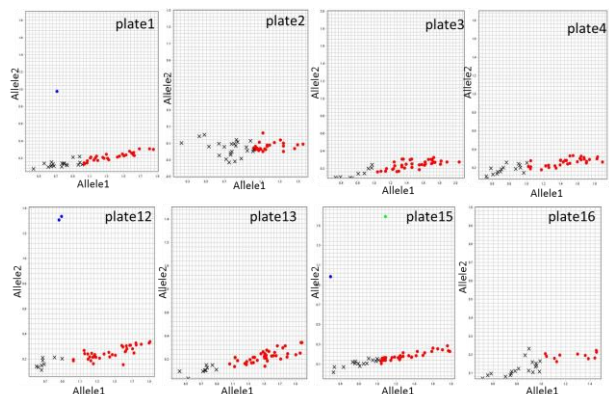
IPF を併存する肺癌切除後患者 7 名に FIP の病歴聴取を行ったが、いずれも家族歴はなかった。2009 年 1 月から 2010 年 3 月までの期間における非小細胞肺癌完全切除例 176 例のうち IPF 合併例は 19 例(10.2%)であった。IHC では切片上、腫瘍細胞の 5%以上の染色を陽性と判断した。MUC1/4/5A/5B の陽性

率は 85%/47%/28%/57%であり、MUC1 陰性例及び MUC5B 陽性例で有意に予後不良であった($p=0.007$, $p=0.033$)。IPF 合併と各種 MUC 蛋白発現の間に有意な相関は認めなかったが、MUC5B を除きいずれも腺癌での発現が有意に高頻度であった。

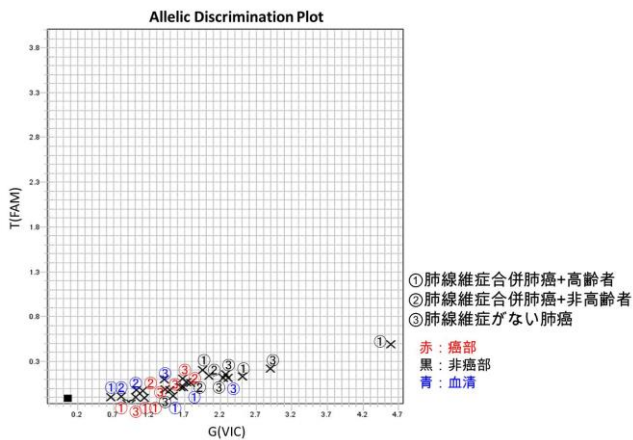


(図 1) MUC5AC(上段)、MUC5B(中段)、MUC1(下段) 免疫染色陽性例。

肺癌切除標本 376 例の癌部、非癌部を採取し、上記 SNP タイピングで危険対立遺伝子(ヘテロ)を示したものはなく、全例 G/G ホモであった(図 2)。また高齢・非高齢、IPF 合併有無により、3 症例を抽出し、それぞれ肺癌部/非癌部/血清について上記 SNP 解析を行ったところ部位によらず発現は一定であった(図 3)。肺組織を用いた同 SNP 解析は、現在まで本研究を除き行われたことはなく、結果の解釈が困難であるが、アジア人において他の人種と比較し同 SNP 発現は著しく少数との報告もある。今後対象集団を大きくすることで、MUC5B 発現の頻度がどの程度のものなのか、本解析を続けるべきかどうか検討の余地があると考えられた。

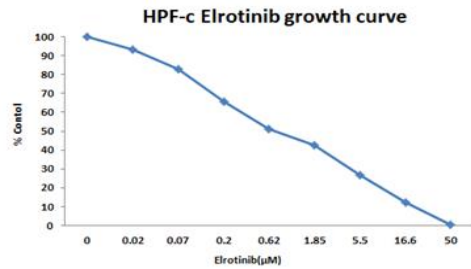


(図 2) MUC5BSNP(re35705950) ; 全て Allele1 (G/G homo) であり、Allele1/2 (G/T hetero)は認めなかった。



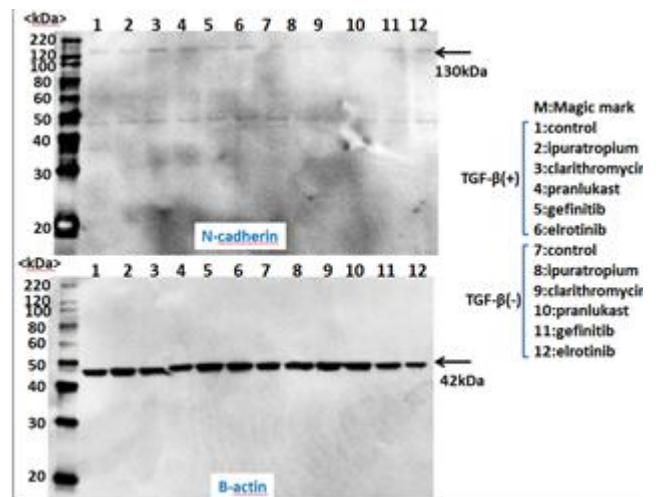
(図 3) MUC5BSNP(re35705950)と患者背景による分類。いずれもホモ(G/G)であるが、癌部、非癌部、血清とサンプルの種類や採取部位によって発現は同様である。

薬剤感受性試験では、抗がん剤 Cisplatin、Gemcitabine、Paclitaxel、粘液産生抑制薬として Clarithromycin、Planlulkast、Ipratropium、腫瘍抑制及び粘液産生抑制の両作用をもつ Erlotinib、Gefitinib を使用した。細胞株としては腺癌株(A549,HCC827)、扁平上皮癌株(H520)、小細胞癌株(SBC-3)、非小細胞癌株(PC9)及び線維芽細胞株(HPF-c)の計6種を用いた。Clarithromycin、Planlulkast、Ipratropium などの粘液産生抑制薬は腫瘍抑制及び線維芽細胞増殖抑制効果のいずれも認めなかった。一方 Erlotinib は腫瘍抑制効果に加え、線維芽細胞抑制効果も顕著であった(図4)。Erlotinib や Gefitinib という上皮成長受容体因子チロシンキナーゼ阻害剤は、肺の線維化を促進する作用を持つとされ、間質性肺炎やIPFの患者への投与の際は細心の注意が必要とされ、現時点では用いられることが少ない。しかし本研究における線維芽細胞に対しての増殖抑制効果を考慮すると、薬剤性間質性肺炎の発症機序として、既存の肺を構成する線維芽細胞の活性化とは異なる機序が推測される。



(図 4) 線維芽細胞株 HPF-c における Erlotinib の細胞増殖抑制抑制曲線

一方、8種の肺癌細胞株及び線維芽細胞(PC9、PC14、A549、A431、H1299、H838、HPF-c)を用いた MUC5B の Western Blotting 解析ではいずれも発現を認めなかった。また線維芽細胞が各種治療により、どのようにその性質に変化がみられるか、特に細胞分化への影響をみるための最初の段階として、N-Cadherin と E-Cadherin の蛋白発現を細胞分化に参与する TGF- β の有無により比較検討した。TGF- β の関与の有無によらず、E-Cadherin の発現は認めなかった。N-Cadherin の発現も全体的に不明瞭であり、薬剤毎の違いも顕著ではなかった(図5)。



(図 5) TGF- β の有無による各種粘液産生阻害薬投与の影響下の線維芽細胞の N-Cadherin 発現。

以上の結果をまとめると、①IPF患者で有意に高発現を認められた MUC5BSNP(re35705950)発現は本対象患者

では認められず、これは人種差によるものか、対象数を大きくすることで感度が上がるのか、今後検討の余地があると考えられた。② IHC における MUC 発現は MUC1 及び 5B で予後と相関を認めた。予後を予測するためのバイオマーカーとなりうるか、また他の臨床病理学的因子との関連について、さらに検討をすすめるべきと考えられた。③ *in vitro* 薬剤感受性試験では、Erlotinib は腫瘍細胞並びに線維芽細胞抑制効果を認めた。線維芽細胞の増殖抑制が、肺癌の進展とどのように関与するかについての報告は多々あるが、粘液産生抑制の視点からみてどのような関連があるか今後の検討課題である。

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 5 件)

- (1) The frequency and prognostic impact of pathological microscopic vascular invasion according to tumor size in non-small cell lung cancer. Shimada Y, Saji H, Kato Y, Kudo Y, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Matsubayashi J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Chest. 2016 Mar;149(3):775-85 (査読あり)
- (2) Prognostic Factors for Survival After Recurrence in Patients With Completely Resected Lung Adenocarcinoma: Important Roles of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status and the Current Staging System. Kudo Y, Shimada Y, Saji H, Kato Y, Yoshida K, Matsubayashi J, Nagase S, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Nagao T, Ikeda N. Clin Lung Cancer. 2015 Nov;16(6):e213-21. (査読あり)
- (3) Association between high-resolution computed tomography findings and the IASLC/ATS/ERS classification of small lung adenocarcinomas in Japanese patients. Kudo Y, Matsubayashi J, Saji H, Akata S, Shimada Y, Kato Y, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Nagao T, Ikeda N. Lung Cancer. 2015 Oct;90(1):47-54. (査読あり)
- (4) Survival outcomes for oligometastasis in resected non-small cell lung cancer. Shimada Y, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2015 Oct;23(8):937-44. (査読あり)
- (5) Survival of a surgical series of lung cancer patients with synchronous multiple ground-glass opacities, and the management of their residual lesions. Shimada Y, Saji H, Otani K, Maehara S, Maeda J, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Akata S, Ikeda N. Lung Cancer. 2015 May;88(2):174-80 (査読あり)
- (6) Saji H, Matsubayashi J, Akata S, Shimada Y, et al. Correlation between whole tumor size and solid component size on high-resolution computed tomography in the prediction of the degree of pathologic malignancy and the prognostic outcome in primary lung adenocarcinoma. Acta Radiol. 2014 Oct 24. (査読あり)
- (7) Hagiwara M, Shimada Y, Kato Y, et al. High-quality 3-dimensional image simulation for pulmonary lobectomy and segmentectomy: results of preoperative assessment of pulmonary vessels and short-term surgical outcomes in consecutive patients undergoing video-assisted thoracic surgery. Eur J Cardiothorac Surg. 2014 Oct 23 (査読あり)

- (8) Fukuta K, Shimada Y, Hagiwara M,
High-quality 3-dimensional imaging
for patients with anomalous
pulmonary veins. Asian Cardiovasc
Thorac Ann. 2014 Aug 13 (査読あり)
- (9) Matsumura Y, Hishida T, Shimada Y,
et al. Impact of extratumoral lymphatic
permeation on postoperative survival
of non-small-cell lung cancer patients.
J Thorac Oncol. 2014 Mar;9(3):337-44
(査読あり)

[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

嶋田 善久 (Shimada
Yoshihisa)

東京医科大学医学部・助教

研究者番号： 00459497

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：