

非小細胞性肺癌における
endocan の有用性について (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系呼吸器外科専攻

日暮 亮太

修了年 2016 年

指導教員 村松 高

1. 緒言

肺癌治療は組織型 (小細胞または非小細胞)と病期進行度分類 (TNM 分類)を基に、外科切除、化学療法および放射線照射を様々な組み合わせで治療されている。しかしその予後は不良で、全体の5年生存率は30%にも満たない¹⁾。病期がI期の早期肺癌症例において、唯一根治が期待でき得る手術を施行し得たとしても、術後早期に再発する症例を経験することがある。このことは、TNM分類は治療前の進行度を反映するものであり、治療経過における症例の予後、特に再発のしやすさについては十分に把握できないことを意味している。

最近、腫瘍の増殖や転移の機序が明らかになり²⁻¹⁰⁾、腫瘍の悪性度や活動性を測るマーカーの研究がなされており、様々な因子が報告¹¹⁻²¹⁾されている。これらの血管新生を評価するマーカーとして、Endothelial cell-specific molecule 1 (endocan)という物質が注目されている²²⁻²³⁾。そこで、本研究では肺癌患者における endocan の有用性について検討した。

2. 対象

本研究は、2014年4月から2015年9月に日本大学医学部附属板橋病院で肺癌に対して治療を行った症例の内、本研究に同意を得られた非小細胞性肺癌23症例を対象とした。全ての症例で採血時に活動性の有る悪性腫瘍の併存を認めず、感染や炎症性疾患がないことを確認した。本研究の実施に際し、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の新規申請手続きを行い、審議を経て承認を受けた。全例で患者本人の自由意思による同意を得、同意の撤回があった場合や担当医師が研究の継続が困難と判断した場合は本研究を中止とした。

対象は非小細胞性肺癌症例23症例、年齢は57~84歳 (平均70.3歳)であった。男性17例、女性6例で、組織型は腺癌16例、扁平上皮癌7例であった。病期はIA期:7例、IB期:6例、IIA期:1例、IIB期:2例、IIIA期:1例、IV期:6例であった。遠隔転移を認めないI期からIIIA期の17例で手術療法を行い、IIA期からIIIA期の4例は術後補助化学療法(Carboplatin + paclitaxel 併用療法)を行った。手術症例の内、4例(IA期:2例、IIB期:1例、IIIA期:1例)が観察期間中に遠隔転移が出現し、術後再発と診断した。初診時、既に遠隔転移を認めたIV期の6例は化学療法を行った。IV期の化学療法は主治医の判断でレジメンを選択し、そのレジメンの中で血管内皮細胞増殖因子(VEGF)モノクローナル抗体

Bevacizumab は使用されなかった(Table 1)。

3. 方法

1) 血液検体の採取の方法と測定

手術症例は、術前、術後 3 ヶ月、術後 6 ヶ月および術後 12 ヶ月の計 4 回、化学療法症例は、治療前、1 コース後、4 コース後の計 3 回、本研究用の血液を 5ml/回採取した。採血検体は速やかに遠心により血漿に分離し、測定まで-80 °Cで凍結保存した。その後、血中 endocan 濃度と血中 Vascular endothelial growth factor (VEGF)濃度を測定し、測定後の残存血液は破棄した。測定方法は ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法で分析し、全てのサンプルは 2 回測定し、平均値を測定値とした。

2) 免疫組織化学染色

術後病理検体のパラフィン包埋切片から未染色スライドを作成し、抗 endocan 抗体(Lunginnov, Lille, France)、抗 VEGF 抗体(R&D systems, Minnesota, USA)で染色した。染色法は酵素抗体 LSAB (Labeled Strept Avidin-Biotin)法を用いた。染色の陽性の判定は弱拡大(×100)で観察し、画像解析ソフトを用いて行った。抗体により染色された血管内皮細胞が全ての腫瘍内血管内皮細胞に対して占める割合を評価し、10 視野での平均を発現率 (%)と定義した。

4. 統計処理

統計学的有意差を求めるにあたり、Statistical Package for Social Sciences version 21.0 (SPSS 21.0)を用いた。統計処理はいずれも危険率 5%で両側検定を行った。2 群間比較は Mann whitney の *U* 検定を用いた。多群間比較は Kruskal-Wallis 検定を用いた。相関関係は Spearman の順位相関係数の検定を用いた。無再発生存率は Kaplan-Meier 分析で算出し、Long-rank 検定で 2 群間を比較した。

5. 結果

血中 endocan 濃度と TNM 分類を比較すると、胸膜浸潤がない群(11 例)の方が、胸膜浸潤のあった群(6 例)よりも Mann-Whitney の *U* 検定で $p = 0.048$ と有意に血中 endocan 濃度が高値であった。手術例(17 例)では血中 endocan 濃度と腫瘍径に相関関係を認めなかったが、胸膜浸潤のない p10 群(11 例)に限定して血中 endocan

濃度と腫瘍径を比較したところ、Spearman の順位相関係数で $rs = 0.733, \rho = 0.010$ と有意な相関関係を認めた(Table 2)。M 因子の比較では遠隔転移がある IV 期(6 例)の方が遠隔転移のない I~III 期(17 例)よりも、Mann-Whitney の U 検定で $p = 0.044$ と有意に血中 endocan 濃度が高値であった(Figure 1)。

遠隔転移の有無で分けた 2 群間の差を用いて得られた血中 endocan 濃度 2.5 ng/ml を cut off 値として、初診時に遠隔転移のない I~III 期の経時的経過を評価すると、無増悪生存率は 2.5 ng/ml 未満の群で 100%、2.5ng/ml 以上の群で 21.9% であり、Log-rank 検定で $p = 0.018$ と有意に endocan 濃度 2.5ng/ml 以上の群で再発が多かった(Figure 2)。

血中 VEGF 濃度でも同様の検討を行ったが、TNM 分類や無増悪生存期間に有意な関連は認めなかった。また全症例 23 例における血中 endocan 濃度と血中 VEGF 濃度を比較したところ、両者に相関関係を認めなかった。

免疫組織化学染色では、抗 endocan 抗体は腫瘍内の血管内皮細胞に発現し、正常組織内の血管内皮細胞では発現していなかったのに対し、抗 VEGF 抗体の染色では腫瘍内と正常組織の両方の血管内皮細胞が染色された。抗 endocan 抗体の発現率と血中 endocan 濃度との間に相関関係は認めず、また発現率と病理所見や術後再発との関連を認めなかった。同様に抗 VEGF 抗体の発現率と血中 VEGF 濃度との間に相関関係は認めず、発現率と病理所見や術後再発との関連を認めなかった。また、抗 endocan 抗体の発現率と抗 VEGF 抗体の発現率との間に相関関係を認めなかった。

手術症例 17 例で、術後 12 ヶ月まで本研究用採血が行えた症例は 3 例であった。その内、再発した症例は 1 例 (IIA 期)で、術後 10 ヶ月の時点で遠隔転移を認めた。術前からの血中 endocan 濃度の推移を観察したが、治療効果や再発を示唆する変化は認められなかった。同様に血中 VEGF 濃度の推移を観察したが、治療効果や再発を示唆する変化は認められなかった。化学療法症 6 例で 4 クールまで本研究用採血が行えた症例は 2 例であった。この 2 例は画像所見での治療効果判定は SD(stable disease)であった。血中 endocan 濃度の治療後の推移を観察すると、特定の傾向は認めなかった。同様に血中 VEGF 濃度の推移を観察したが、特定の傾向は認めなかった。

6. 結語

血中 endocan 濃度は、手術例において胸膜浸潤の無い条件下で腫瘍径と相関関係があり、cut off 値 2.5ng/ml で無増悪生存を反映していた。また免疫染色では、endocan は腫瘍内の血管内皮細胞に発現し、正常組織内の血管内皮細胞には発現していなかった。一方、VEGF の免疫染色では腫瘍部と正常部の両方に発現を認めたことから、endocan は VEGF より腫瘍に特徴的な働きを反映しているのではないかと考えられた。手術前の血中 endocan 濃度は、術後再発を予測するマーカーとしての有用性が示唆された。治療後の血中 endocan 濃度の推移は、手術療法や化学療法の治療効果判定や再発の検出には不向きであったが、症例が少ないため、さらなる検証が必要である。

引用文献

1. 公益財団法人がん研究振興財団. がんの統計 〈2014 年版〉 . 2014.
2. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Current opinion in cell biology* 2005;17:559-64.
3. Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *Journal of cellular physiology* 2006;206:1-8.
4. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology* 2006;18:516-23.
5. Weaver AM. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis* 2006;23:97-105.
6. Buccione R, Caldieri G, Ayala I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer metastasis reviews* 2009;28:137-49.
7. Mogilner A, Keren K. The shape of motile cells. *Current biology : CB* 2009;19:R762-71.
8. Rowe RG, Li XY, Hu Y, et al. Mesenchymal cells reactivate Snail1 expression to drive three-dimensional invasion programs. *The Journal of cell biology* 2009;184:399-408.
9. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52-67.
10. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular cancer research : MCR* 2010;8:629-42.
11. Sato H, Takino T, Okada Y, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994;370:61-5.

12. Ma J, Wang J, Fan W, et al. Upregulated TIMP-1 correlates with poor prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014;7:246-54.
13. Chang YH, Chiu YJ, Cheng HC, et al. Down-regulation of TIMP-1 inhibits cell migration, invasion, and metastatic colonization in lung adenocarcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2015;36:3957-67.
14. Chen X, Ding J, Gao W, Yi X, Wang H, Li H. [Expression of E-cadherin in non-small cell lung cancer: correlation with lymphatic metastasis and prognosis]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer* 2002;5:260-2.
15. Pontes-Junior J, Reis ST, Bernardes FS, et al. Correlation between beta1 integrin expression and prognosis in clinically localized prostate cancer. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 2013;39:335-42; discussion 43.
16. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer research* 1986;46:467-73.
17. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1997;3:861-5.
18. Gately S, Twardowski P, Stack MS, et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:10868-72.
19. Volm M, Mattern J, Koomagi R. Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6:3236-40.

20. Hu Y, Hu MM, Shi GL, Han Y, Li BL. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2014;40:1136-42.
21. Zhang CL, Ge SL, Yang N, Zhang JR, Tian DD. Elevated Serum Level of Angiopoietin-2 as a Potential Marker for Poor Prognosis in Small Cell Lung Cancer. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2015;236:305-9.
22. Ji NY, Kim YH, Jang YJ, et al. Identification of endothelial cell-specific molecule-1 as a potential serum marker for colorectal cancer. *Cancer science* 2010;101:2248-53.
23. Guethbrandsdottir G, Hjelle KM, Frugard J, Bostad L, Aarstad HJ, Beisland C. Preoperative high levels of serum vascular endothelial growth factor are a prognostic marker for poor outcome after surgical treatment of renal cell carcinoma. *Scandinavian journal of urology* 2015:1-7.

图表

(Table 1)

臨床的特性

Characteristic		(n=23)	Serum endocan (ng/ml)		Serum VEGF (pg/ml)	
			Median(range)		Median(range)	
Sex	Male(%)	17 (73.9)	2.8 (1.4-3.6)	$p = 0.708$	50.0 (20.0-128.0)	$p = 0.177$
	Female(%)	6 (26)	2.7 (1.4-3.3)		87.5 (20.0-280.0)	
Age(yr)	Median(range)	68.0 (57-84)		$\rho = 0.748$		$\rho = 0.869$
Histological type	Adenocarcinoma	16 (69.5)	2.7 (1.4-3.4)	$p = 1.000$	50.5 (20.0-280.0)	$p = 0.871$
	Squamous cell carcinoma	7 (30.4)	2.8 (1.4-3.6)		62.0 (22.0-115.0)	
Stage, n(%)	I A	7 (30.4)	2.7 (1.4-2.8)	$p = 0.391$	62.0 (24.0-280.0)	$p = 0.151$
	I B	6 (26.0)	2.25 (1.6-3.4)		33.5 (20.0-128.0)	
	II A	1 (4.3)	2.7		195	
	II B	2 (6.3)	2.4 (1.4-3.4)		29.0 (2.0-38.0)	
	III A	1 (8.6)	2.9		22.0	
	III B	0(0)	-		-	
	IV	6(26.0)	3.0 (2.3-3.6)		63.0 (50.0-115.0)	

*: Significant change

対象は 23 症例で、年齢は 57～84 歳 (平均 70.3 歳)。

性別は男性 17 例、女性 6 例、組織型は腺癌 16 例、扁平上皮癌 7 例であった。

病期は IA 期: 7 例、IB 期: 6 例、IIA 期: 1 例、IIB 期: 2 例、IIIA 期: 1 例、IV 期: 6 例であった。

血中 endocan 濃度と、性別、組織型、病期の間での有意な関連は認められなかった。

年齢と血中 endocan 濃度との間に有意な相関関係は認められなかった。

血中 VEGF 濃度と、性別、組織型、病期の間での有意な関連は認められなかった。

年齢と血中 VEGF 濃度との間に有意な相関関係は認められなかった。

(Table 2)

T 因子の検討

A

Surgical cases		(n=17)		Serum endocan (ng/ml)		Serum VEGF (pg/ml)	
				Median(range)		Median(range)	
Tumor size (cm)	2.0 (1.0-3.4)					$\rho = 0.643$	$\rho = 0.398$
Invaion	Pleural invasion	p10	11 (64.7)	2.8 (1.4-3.4)	$p = 0.048^*$	48.0 (20.0-280.0)	$p = 0.256$
		p1, 2	6 (35.2)	1.95 (1.4-2.7)		71.0 (30.0-195.0)	
	Vascular invasion	v0	12 (70.5)	2.5 (1.4-3.4)	$p = 0.879$	48.5 (20.0-280.0)	$p = 1.000$
		v1,2	5 (29.4)	2.7 (1.6-3.4)		37.0 (22.0-195.0)	
	Lymphatic invasion	ly0	12 (70.5)	2.5 (1.4-3.4)	$p = 0.646$	55.5 (20.0-280.0)	$p = 0.442$
		ly1, 2	5 (29.4)	2.7 (1.7-3.3)		37.0 (20.0-195.0)	

* : Significant change

B

Surgical cases (p10)		(n=11)		Serum endocan (ng/ml)		Serum VEGF (pg/ml)	
				Median(range)		Median(range)	
Tumor size (cm)	2.8 (1.4-4.0)					$\rho = 0.010^{**}$	$\rho = 0.129$
				$rs = 0.733$			
Surgical cases (p11,2)		(n=6)		Serum endocan (ng/ml)		Serum VEGF (pg/ml)	
				Median(range)		Median(range)	
Tumor size (cm)	3.5 (2.0-8.0)					$\rho = 0.499$	$\rho = 0.957$

* * : Significant correlation

A.

手術症例 17 例を対象とした。

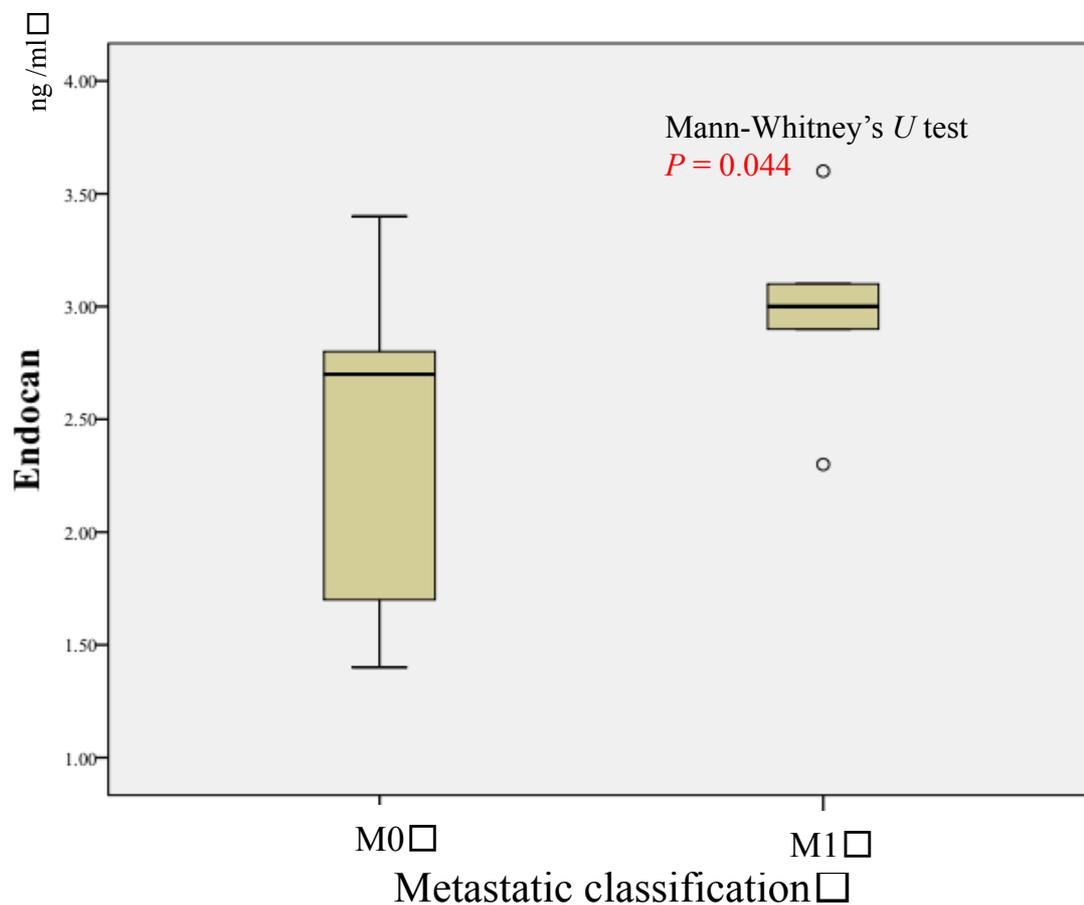
血中 endocan 濃度と腫瘍径、血管浸潤やリンパ管浸潤の有無に有意な関連は認めなかった。胸膜浸潤の有無による 2 群間での血中 endocan 濃度の比較においては、胸膜浸潤がない群(11 例)の方が胸膜浸潤のある群(6 例)よりも、有意に血中 endocan 濃度が高値であった。血中 VEGF 濃度と腫瘍径、胸膜浸潤、血管浸潤、リンパ管浸潤の有無に有意な関連は認めなかった。

B.

手術例 17 例の内、胸膜浸潤を認めない 11 例では、血中 endocan 濃度と腫瘍径に有意な相関関係を認めた。胸膜浸潤を認める 6 例では血中 endocan 濃度と腫瘍径の相関関係を認めなかった。血中 VEGF 濃度はどちらの群でも有意な相関関係を認めなかった。

(Figure 1)

血中 endocan 濃度と M 因子の検討

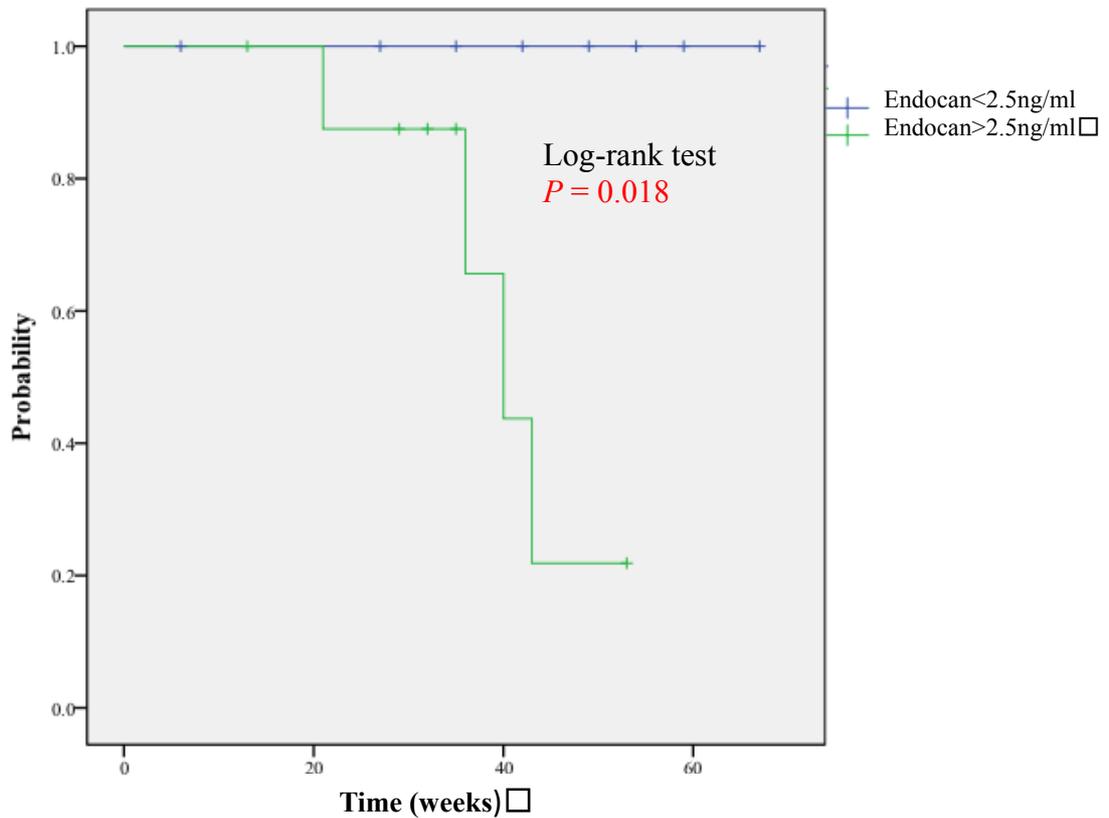


M 因子の検討では、全 23 例を対象とした。

遠隔転移のない 17 例と遠隔転移のある 6 例の 2 群間での血中 endocan 濃度の比較において、遠隔転移のある群は有意に血中 endocan 濃度が高値であった。

(Figure 2)

遠隔転移の無い症例の無増悪生存期間と血中 endocan 濃度の検討



遠隔転移のなかった症例群(c-I~III期)17例を経時的に観察し、血中 endocan 濃度 2.5ng/ml 以上の群(9例)と 2.5ng/ml 未満の群(8例)の2群に分け、無増悪生存期間を検討した。

観察期間: 術後 6 週~67 週 中央値 36.3 週。

血中 endocan 濃度 2.5ng/ml 以上の群は、有意に再発が多く、無増悪生存率は 2.5ng/ml 以上の群で 21.9%、2.5 ng/ml 未満の群で 100%であった。