

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007 ~ 2008

課題番号:19591610

研究課題名(和文) 肺癌個別化医療に向けたリンパ節転移予測診断システムの構築

研究課題名(英文) Prediction of lymph node metastasis by gene expression profiling in patients with primary resected lung cancer

研究代表者

伊豫田 明 (YODA AKIRA)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 10302548

研究成果の概要:100 例の肺癌患者からの手術後摘出検体より腫瘍組織検体と正常肺組織検体を採取し、個々の検体を匿名化した状態で、oligoDNA マイクロアレイ解析を行った。対象とした DNA は既知の機能を有した 10000 遺伝子とし、その発現解析を行い、リンパ節転移予測遺伝子として 15 遺伝子、早期再発予測遺伝子として 40 遺伝子を抽出した。数遺伝子に関して、マイクロアレイ解析と定量 PCR の結果が相関することを確認した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード:呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺癌は現在男性の死亡率第一位の悪性腫瘍である。しかしながら現在、女性喫煙者の増加が見られ、女性の肺癌患者の増加とともに肺癌全体の患者数の増加が予想されている。行政により検診が広く行われ、早期発見、早期治療に対する努力がなされているにもかかわらず早期肺癌症例は少なく、依然と

して肺癌の根治切除可能な症例の割合は低い。また、早期肺癌に対する根治的手術施行患者においてもその 20% にリンパ節転移や再発例を認める。その理由は、肺癌は組織型をはじめとして多様な病態であるにも関わらず、現時点でも小細胞癌、非小細胞癌という非常におおまかな枠組みで治療方法が

決められており、個々の病態に対応できないことも一因であると考えている。今後、肺癌に対する根治的治療の可能性を広げ、その予後を改善するには新しい診断基準に基づくアプローチが必要である。

このような背景の基、われわれは、前研究課題である基盤研究(C)(2)15591467(平成15年度—平成16年度)、基盤研究(C)(2)17591458(平成17年度—平成18年度)において肺癌の外科切除標本(原発巣)を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を行い、肺癌患者100例のプロファイリングを拾得した。その後、患者の経過を丹念にフォローし、肺癌の組織型、リンパ節転移の有無、再発の有無により、肺癌原発巣の遺伝子発現パターンが異なることを見出した。具体的には肺扁平上皮癌と肺腺癌、病理組織学的にリンパ節転移陽性の肺癌とリンパ節転移陰性の肺癌、さらに術後早期に再発する肺癌と再発がみられない肺癌では異なった遺伝子発現パターンを示すことである。

この研究は従来の病理学に、最新のゲノム科学の方法論と知識を加味することで、より精度の高い診断が可能となることを示した画期的な研究である。現在肺癌は、術前の画像診断と、術後の病理組織学的診断をもとに、TNM分類にしたがって、病期分類しているが、今後、これらのゲノム医学の手法を加えることにより、ゲノム個別化TNM分類と言えるような、従来よりもさらに予後と密接に関連した病期分類を新たに構築できる可能性が考えられる。このように患者の病態を個人のゲノムレベルで診断できるようになることによって、肺癌に対する画一的な治療の枠を超えて、ゲノム科学的に悪性度の低い肺癌と考えられる場合には、より低侵襲の治療を行い、悪性度の高い肺癌と考えられる場合には手術、術後化学療法、放射線療法な

どを併用した集学的治療を行うなど、個々の患者に対応しうる多様性をもったテーラーメイド医療を遂行することができるようになり、治療をより有効に無駄なく行える点で患者はもちろん医療経済にとっても大きなメリットとなると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、肺癌に対する画一的な治療の枠を超えて、ゲノム科学的に悪性度の低い肺癌と考えられる場合には、より低侵襲の治療を行い、悪性度の高い肺癌と考えられる場合には手術、術後化学療法、放射線療法などを併用した集学的治療を行うなど、個々の患者に対応しうる多様性をもったテーラーメイド医療を遂行することができるように、治療をより有効に無駄なく行える手法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リンパ節転移予測または早期再発予測診断システムの構築

これまでの研究成果として、リンパ節転移予測遺伝子として15遺伝子、早期再発予測遺伝子として40遺伝子が抽出されている。これら遺伝子について個々にTaqMan probeを設定し、定量PCRベースの診断システムに移行する。各遺伝子の正常肺組織またはコントロールとなる培養細胞を用いてカットオフ値の設定を行いアレイ解析のデータとの比較検討を行った。

(2) FISH法によるEpidermal Growth Factor

Receptor のoverexpressionを解析し、肺腺癌におけるリンパ節転移の有無との相関などを検討した。

(3) 稀な組織型である大細胞神経内分泌癌について、これらの診断システムが利用できる可能性を検討するため、大細胞神経内分泌癌におけるリンパ管あるいは血管浸潤、リンパ節転移、肺内転移、術前化学療法、術前放射線療法の効果、術前背景因子として年齢、性別、喫煙の有無とさらに再発、予後との関連を検討し、標的分子マーカーの発現を検討した。

4. 研究成果

この中でわれわれは、術後の治療方針や患者の予後に影響するリンパ節転移の有無に関わる遺伝子発現プロファイルに注目し、解析を進めたのでその具体例について述べる。肺癌患者のプロファイリングから腺癌症例 27 例を選択し、12 例のリンパ節転移陽性例と 15 例のリンパ節転移陰性例の間で発現が異なる 94 遺伝子 (40 遺伝子は発現亢進、54 遺伝子は発現低下) を抽出した。統計学的手法を用いて 94 遺伝子からリンパ節転移の有無を判別するための 15 遺伝子を抽出し、リンパ節転移陽性群を判別するための遺伝子セットを導き出した。(第 59 回日本胸部外科学会定期学術集会 シンポジウムにて発表) さらに 14 の肺腺癌症例を加えて計 41 症例で臨床病理学的因子の中で、特に予後について検討を行ったところ、従来の病理診断においてリンパ節転移陽性と診断された症例は、リンパ節転移陰性と診断された症例よりも予後不良であったが、リンパ節転移陰性と診断された症例でも術後にリンパ節転移を

含めて再発する症例が複数見られた。しかしながら従来の病理診断に加えて遺伝子発現プロファイルを用いて抽出した 15 遺伝子による判別式を併用した場合には、病理診断だけで分類した時よりも、より明瞭に有意差を持って ($P=0.0002$) 再発群と無再発群を判別できることを明らかにした。これまで文献としては、最大腫瘍径 2cm 以下の小型末梢肺腺癌で、病理学的にリンパ節転移陰性と診断された症例でも約 20% の症例に micrometastasis を認め、micrometastasis を認めた症例は認めなかった症例に比べて有意に予後不良であったという報告 (Wu J et al. Ann Thorac Surg 71;1772-8:2001) もあることから、病理組織学的に判定が困難な micrometastasis などの病態を、遺伝子プロファイルを併用することにより予後不良群として判別可能であったと考えられる。上記結果に関して Lung Cancer 誌に投稿し、accept された。

腺癌においてマイクロアレイ解析で高発現を認めた MVP gene と FOLR1 gene に対して定量 PCR 解析を施行し、定量 PCR でも正常組織と比較して癌組織で有意に高発現している事を証明した。

FISH 法による Epidermal Growth Factor Receptor の overexpression の解析は腺癌症例 62 例に施行し、その内発現が認められたものは 6 例のみであり、検討の結果、明らかなリンパ節転移の有無との相関は認められなかった。

大細胞神経内分泌癌に関しては、1990 年から 2007 年までに診断した 40 例を臨床病理学的に検討した。LCNEC の内訳は男性 36 例、女性 4 例と男性が多く、年齢は 50 才から 85 才、平均年齢は 63 才であった。手術方法は縮小手術が 2 例のみで、肺葉切除 30 例、2 葉切除 3 例、肺全摘 5 例であり、合併切除

臓器は胸壁 4 例、気管分岐部+食道が 1 例であった。肉眼的に明らかな不完全切除は 1 例のみで、microscopic に断端陽性例が 1 例みられた。切除標本における腫瘍最大径は平均 3.9cm であり、病理病期は I A 期 6 例、I B 期 12 例、II A 期 2 例、II B 期 4 例、III A 期 8 例、III B 期 7 例、IV 期 1 例であった。再発は 22 例にみられ、その内遠隔転移が 17 例、縦隔リンパ節再発が 8 例にみられた。40 症例全体の 5 年生存率は 37% で、I 期症例のみの 5 年生存率も 54% と予後は不良であった。LCNEC と診断された症例はこれまでの報告と同様に予後不良であり、完全切除された症例や I 期症例であっても遠隔転移による再発例が多く認められた。したがって、LCNEC は積極的に術後補助化学療法を含めた集学的治療を検討すべきと考えられることを 2008 年日本胸部外科学会学術集会、日本肺癌学会総会にて発表した。その中で、純粋型の大細胞神経内分泌癌 13 例に関して FISH 法による Epidermal Growth Factor Receptor の overexpression を検討したが、全例発現は認められなかった。K-ras codon 12 と 13 の遺伝子変異も全例認められなかったが、免疫染色にて Her2 の overexpression を 2 例に認め、c-kit の overexpression を 10 例に、VEGF の overexpression を 13 例全例に認めた。今後、腺癌の結果と比較する予定である。

関連研究として悪性胸膜中皮腫に関する臨床病理学的検討に関する論文、大細胞神経内分泌癌に関する再発、予後に関する論文、局所進行肺癌に関する論文を作成し、accept 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 4 件)

- ① Moriya Y, Iyoda A, Kasai Y, Sugimoto T, Hashida J, Nimura Y, Kato M, Takiguchi M, Fujisawa T, Seki N, Yoshino I. Prediction of lymph node metastasis by gene expression profiling in patients with primary resected lung cancer. Lung Cancer .64:86-91,2009 査読有
- ② Iyoda A, Yusa T, Kadoyama C, Sasaki K, Kimura H, Yamakawa H, Shiba M, Fujisawa T, Yoshino I. Diffuse malignant pleural mesothelioma: a multi-institutional clinicopathological study. Surg Today. 38:993-8, 2008 査読有
- ③ Iyoda A, Hiroshima K, Moriya Y, Iwadate Y, Takiguchi Y, Uno T, Nakatani Y, Yoshino I. Postoperative recurrence and the role of adjuvant chemotherapy in patients with pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. J Thorac Cardiovasc Surg in press 査読有
- ④ Iyoda A, Hiroshima K, Moriya Y, Yoshida S, Suzuki M, Shibuya K, Yoshino I. Predictors of postoperative survival in patients with locally advanced non-small cell lung carcinoma. Surg Today in press 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 伊豫田明、原 英則、蔣 世旭
小川史洋、松井啓夫、天野英樹、岡安 勲
吉村博邦、佐藤之俊。

「肺大細胞神経内分泌癌に対する治療戦略」
第 49 回日本肺癌学会総会 ワークショップ
2008 年 11 月 13 日 北九州市

- ② 伊豫田明、原 英則、蔣 世旭
松井啓夫、小川史洋、天野英樹、岡安 勲

吉村博邦、佐藤之俊。

「肺大細胞神経内分泌癌切除症例の検討」
第 61 回日本胸部外科学会定期学術集会
2008 年 10 月 13 日 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊豫田 明 (IYODA AKIRA)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号: 10302548

(2) 研究分担者

佐藤之俊 (SATO YUKITOSHI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 90321637
天野英樹 (AMANO HIDEKI)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 60296481

(3) 連携研究者

関 直彦 (SEKI NAHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50345013
渋谷 潔 (SHIBUYA KIYOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 20302565
廣島健三 (HIROSHIMA KENZO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 80218833