

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号： 83901
 研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2009 ～ 2011
 課題番号： 21390110
 研究課題名（和文） 肺癌における分子生物学的分類による解析

研究課題名（英文） Analysis of lung adenocarcinoma according to molecular biological classification

研究代表者

谷田部 恭 (Yasushi YATABE)
 愛知県がんセンター（研究所）分子腫瘍学部・研究員

研究者番号： 90280809

研究成果の概要（和文）： i) 前癌病変、上皮内腺癌の検討, ii) 重複病変の解析, iii) 組織内遺伝子異常の多様性, iv) 分子病理学的鑑別診断への応用の 4 つの分野について、肺腺癌における分子生物学的分類を本にした解析を行った。i)については、世界肺癌学会の病理パネル委員として、上皮内癌・微小浸潤癌の定義を提唱し、新腺癌分類に盛り込むことができた。ii)については、遺伝子変異で特徴づけられた腺癌 50 例について SNP array を用いた解析を現在も進行中であり、その結果を用いて重複病変の分子生物学的な特性について解明したい。iii)では、これまで報告のある EGFR 遺伝子変異の組織内多様性が見かけ上の変化であることを証明し、薬剤応答性に重要な示唆を与えた。iv)では、この期間に分子標的薬として保険収載される予定であった ALK 阻害剤について、国内外の診断アルゴリズムの開発スタディに積極的に参加するとともに、国際的に我々の考えを提示した。その結果は日本肺癌学会の取り扱いの手引きの作成に大きく採用され、現在の臨床的判断の礎の一つを築くに至っている。

研究成果の概要（英文）： We carried out this study according to four themes that we initially laid out. For analysis of preinvasive and in-situ lesions, we could establish definition of adenocarcinoma in-situ in the new adenocarcinoma classification as a member of the IASLC pathology panel. We are still analyzing multiple lesions using SNP array that is of our second theme. To the third theme of intra-tumor heterogeneity, we could show that different EGFR mutation status within individual tumors was caused by combination of heterogeneous distribution of gene amplification and mutation allele specific imbalance, and we called the phenomenon “pseudo-heterogeneity”. We have also achieved sufficient results for the fourth theme, because we participated in international collaborative studies to establish ALK diagnostic algorithm and established it as a guidance requested from the Japanese Lung Cancer Association.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	1,390,000	4,170,000	18,070,000

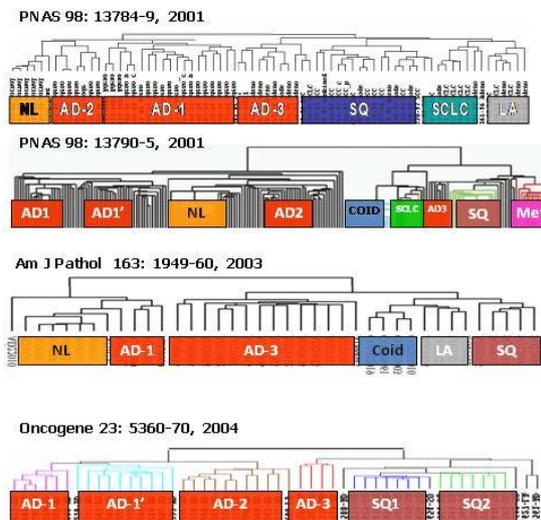
研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学
キーワード：呼吸器・縦隔（肺腺癌、分子病理学）

1. 研究開始当初の背景

①□ 研究の背景

肺腺癌の分子生物学的分類

発現解析においては、ゲノムワイドの分子発現パターンの相同性によってそれぞれの腫瘍の特徴を類型化する階層的クラスタリング解析がしばしば用いられる。この解析は分子発現パターンを指標にしたいわゆる分子生物学的な腫瘍の分類¹と捉えることが可能である。肺がんにおける発現解析は2004年、PNAS誌に同時に発表された2つの論文から始まる。BhattacharjeeらのHarvard大学のグループの報告²、GarbarらのStanford大学からの報告³ともに非常に似通った分子生物学的な分類を示した。すなわち、肺がんは大きく2群に大別され、一方では正常肺組織と主として肺腺癌からなるブランチ、もう一方は腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌など組織型の小クラスターは保たれるもののそれらがもう一方のブランチを形成している。続く報告としてBorzukらの報告⁴、我々の報告⁵があげられるが、その結果もきわめて類似した結果を示している(図1)。また、逆に腺癌に着目してこれらの結果をみると、腺癌は大きく2つのタイプに分けられることを示している。すなわち、正常肺組織に類似した発現パターンを有するタイプと、他の組織型との共通性の多い発現パターンを示す腺癌である。さらに、詳細に見てみると、発現パターンの違いはクラスター間距離によって表されることから、この2つの腺癌型における発現パターンの違いは、扁平上皮癌と小細胞癌との隔たりよりもはるかに大きいことになる。さらに、Stanford大学の報告³では(図1、左2段目)。大腸癌の転移を原発性肺癌とあわせて検討しているが、この転移性肺癌は



扁平上皮癌ともっとも近くクラスタリングされている。これは、転移した大腸癌(腺癌)と肺扁平上皮癌は組織型としては大きく異なるものの、肺腺癌亜型間(右左のブランチ間)の違いよりもはるかに発現パターンとしては類似していることになる。

肺腺癌の分子生物学的分類

われわれは、2002年、TTF-1発現を示す腺癌が、きわめて特異な臨床病理学的特徴、形態像を示し、想定される発癌機序が異なることを報告した⁶。われわれがTTF-1に着目した理由は、①肺の機能維持に重要なサーファクタント類の転写制御因子であり、②その欠損マウスでは気道系は保たれるのに対し、肺末梢の無形成が生じること、③TTF-1発現領域が肺末梢領域を支配する幹細胞領域と一致することなどからである。その2年後に肺癌におけるEGFR遺伝子変異が見出され、われわれは世界に先駆けてその検討を行ったグループの一つであるが、その臨床病理学的特徴は、TTF-1発現腺癌とそれとほぼ完全に重複することが分かった⁷。そこで、両者の関連に

ついて検討した結果、EGFR 遺伝子変異はこの肺腺癌亜型に特異的に獲得されることが分かった⁸。さらに、発現解析においてもこの亜型の独立性を示す結果がえられた⁹。先述のクラスター解析で左ブランチに位置する肺癌では、TTF-1 およびその下流に位置するサーファクタントが高発現するとともに、EGFR 遺伝子変異もこの腺癌で高頻度に検出されることが分かった。これらの結果から、TTF-1 発現に代表される肺腺癌亜型は、ある末梢肺幹細胞によって支配される領域から発生した腺癌であり、その領域は体内で唯一のガス交換を司る極めてユニークな機能を有している。その機能を反映し、その発癌機序としてもきわめて特異な腫瘍と推測される。

他の臓器の腫瘍における分子生物学的分類

分子生物学の発展により、その特徴によって分類された分子生物学的分類ともいべき腫瘍の分類が出現してきた。乳癌においては最も発達し、luminal cell A type, luminal cell B type, HER2 type, basal cell type, normal cell-like type のおおむね5型に分類されることが示されている。Luminal type ではエストロゲン受容体の発現を特徴とし、内分泌療法の良いターゲットとなる。HER2 type ではHER2 遺伝子増幅を特徴とした組織の発現を特徴とし、内分泌療法の良いターゲットとなる。HER2 type では組織学的に high-grade の腫瘍が多く、HER2 遺伝子増幅を特徴としていることが知られている。また、basal cell type はCK5, EGFR の発現を特徴とし、細胞増殖能の高いER, PR HER2-triple negative の腫瘍である。乳癌における治療戦略は、図らずもこれらの亜型と一致しており、それぞれのタイプによって化学療法に対する反応性も大きく異なることが報告されている。また、大腸癌においても同様に分子生物学的な分類が試みられ、①

MSI・BRAF 変異の頻度が高い鋸歯状腺腫型腺癌、②KRAS 変異を特徴とする低 MSI, 低 CIMP 腺癌、③p53 変異・APC 変異を特徴とした古典的腺癌に分かれるのではないかと提唱されている。これらの亜型の一つである MSI 型の腫瘍では、他のタイプと比較し、5FU 系抗がん剤の反応性に違いがあることが報告されている。これらの知見は、分子生物学的分類が腫瘍学に新たな概念を提供するとともに、分子標的療法が広まりつつある現在において、治療に直結する有用性の高い分類を提供することを示唆している。

2. 研究の目的

これまでの研究結果をもとに、肺腺癌の分子生物学的理解を深めるとともに、それに伴って得られる知見を診断や治療に積極的に生かしていくことを目標とする。この研究では特に、末梢型肺腺癌における分子発癌過程の解析を取り上げ、以下の4点に焦点を当て、検討を進めていく。

- i) **前癌病変、上皮内病変の検討**：肺腺癌の前駆病変や上皮内病変の直接的な解析を行うことで発癌過程を検討する。
- ii) **重複病変の解析**：肺腺癌では重複癌が多く、同一個体上で生じた2つの腺癌を解析することで、同一発がん物質暴露による発癌過程の相違を知ることができる。
- iii) **組織内遺伝子異常の多様性**：早期に獲得された遺伝子異常は腫瘍内で均一に分布し、後期に獲得された場合は不均一に分布すると想定される。組織内遺伝子異常の多様性を検討することで、遺伝子変異の階層性を描出したい。
- iv) **分子病理学的鑑別診断への応用**：上記過程で得られた知見は、肺重複病変や転移性肺癌の鑑別に役だてることが可

能であり、その応用について検討する。

申請者は現在改定作業が行われている WHO 肺腺癌組織分類委員の一人であり、生物学的に異なる末梢細胞型肺腺癌の概念を WHO 分類に取り入れるべきだと考えている。その結果は、世界で行われる臨床治験の組織分類等をはじめとしてその波及効果は大きい。実際に現在の WHO 分類委員の代表者である Elizabeth Brambilla は、この概念を使った肺腺癌の分類を kick off meeting で用いていた。そのため責任も重大であり、確定な知見と推論とを明瞭に分け、確かなデータを築く上でこの研究は重要と考えている。また、末梢細胞型腺癌は、女性・非喫煙者が多く、現在増加傾向にある肺がんの一群を反映していると思われる。本研究により、その特徴の把握、予防が推進されることで、このタイプの肺腺癌の病因にせまるものとしての意義は大きく、恩恵を被る人口も多い。さらに、EGFR 遺伝子変異などの分子標的薬との関連も明瞭であり、実臨床にも大きく役立つ内容になる。

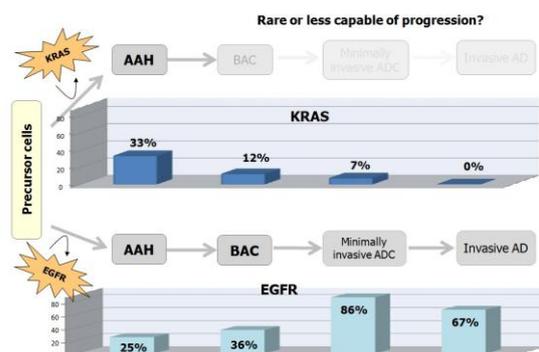
3. 研究の方法

i) 前癌病変、上皮内腺癌の検討

肺腺癌の前癌病変、上皮内病変として提唱されている異型腺腫様過形成 (AAH)、細気管支肺胞上皮癌 (非粘液型、nmBAC) はいずれも TTF-1 やサーファクタントの発現を示す末梢型腺癌の前駆病変と考えられる。我々の検討では、これらの病変には EGFR 遺伝子変異、KRAS 変異のいずれもみられるが、その頻度に大きな違いがあった¹。このことから、KRAS 変異を獲得した AAH は nmBAC への進行が抑えられているのではないかと推測された (図 2)。そこで、この延長上にある以下の 2 つの疑問について検討を行いたい。

① EGFR 遺伝子変異もしくは NULL 遺伝子変異型 (EGFR、KRAS、HER2、BRAF 変異のない肺腺癌) に比して、少数ながらも KRAS 遺伝子変異を有する浸潤性末梢型肺腺癌は存在する。それがどのような機序で浸潤腫瘍に至ったか、広範な遺伝子変異検索 (特にチロシンキナーゼを有する細胞内伝達因子) および SNP array による検討を進めたい。また、EGFR と KRAS 遺伝子変異が相互排他的に生じる理由については、これまで満足のいく学説は提唱されてこなかったが、この検討によりそれを説明できる可能性がある。また、KRAS 遺伝子変異を有する腺癌が EGFR チロシンキナーゼ分子標的薬によって奏功が得られないだけでなく、腫瘍の進行を早めるのではないかというデータが発表され²、私達もそれを支持する結果が得られているが、その理由を分子生物学的に説明し、克服する対策に結び付けることもできるかもしれない。

② 経過が CT など十分に観察できる症例で、前駆病変、上皮内癌と思われる症例を抽出し、EGFR・KRAS 変異との間でその増大率などを比較検討する。これまでの結果からは、KRAS 変異を有する AAH、nmBAC は浸潤癌への進行がきわめて抑制されていると考えられることから、生検組織で KRAS 変異を有する早期病変ということが診断できれば切除は必要ない可能性もある。このような早期病変に対して、切除するか経過観察するか決定に有



用なバイオマーカーは知られておらず、その判断の一助になる可能性がある。

ii) 重複病変の解析

発現解析では腫瘍-転移間の差に比べて腫瘍-腫瘍の差が常に大きいことが報告されている。これは、腫瘍によって経る多段階発癌過程は少なからず異なり、同じ遺伝子変化を集積する可能性が少ないことを示唆している。一方で、同一個体にクローンの異なる 2 つの腫瘍が発生する重複病変は、異なる発癌過程を経ると考えられるものの、同一個体に由来する遺伝的背景に、近似した発がん物質が作用したと考えられる腫瘍化によって発生したともいえる。この状態は、集積された遺伝子変化を同一プールで調べることを意味し、遺伝子変化の差を検出するのに適した方法と言える。これまで、上記前癌病変・上皮内癌と同時に同時性多発腺癌についての解析も行っているが、遺伝子変化の違いからそれら多発の多くが重複癌であることがすでに判明している。そこで、重複病変の多い肺腺癌について、gene chip による発現解析および SNP array を用い、網羅的に遺伝子変異をとらえ、その違いについて検討を行う。

iii) 組織内遺伝子異常の多様性

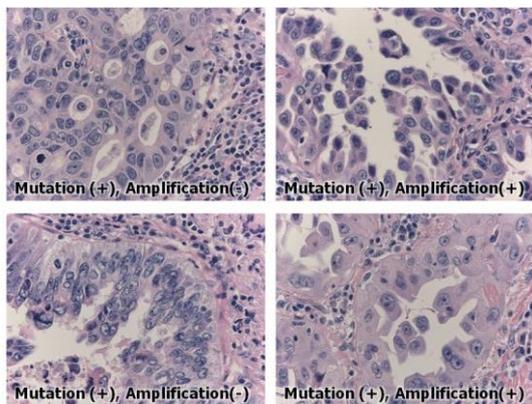
臨床的に問題となる以前のきわめて早期に獲得された遺伝子異常は、その変異を持つ細胞の増殖によって腫瘍が形成されるため、腫瘍内に均一に分布する⁵。これに対し、発生過程の晩期に獲得され、それが高度の growth advantage を示さない場合は、一部の腫瘍細胞に不均一に分布すると想定される。そこで、組織内遺伝子異常の多様性を検討することにより、遺伝子変異の階層性を描出することが可能である。実際にわれわれは2000年にこの方法を用い、組織学的な多様性と遺伝子変

化について一定の関係があることを見出している⁶。また、2008年には、EGFR 遺伝子**変異**は早期に獲得されるのに対し、EGFR 遺伝子**増幅**は後期に獲得することを報告し、それが転移と関連するかについても検討を加えた⁷。同時または後に他の研究者からもこの考えを示唆する報告がなされ、現在はこの説が有力と考えられている。

これまでに、肺腺癌で5%以上の変異頻度を有する代表的な遺伝子変異(p53, EGFR, KRAS, BRAF)について、腫瘍内の複数の箇所から拡散を抽出し遺伝子変異に多様性があるか検討を行っているが、少なくともこれらの遺伝子変異に不均一が確認された遺伝子はなかった。おそらく、遺伝子変異は早期に獲得されるとともに、腫瘍細胞に対して不可欠の oncogene addiction を引き起こしていると考えられる。これに対し、発現レベルではしばしば不均一な分布を示す分子は多いにも関わらず、腫瘍内不均一分布を示す遺伝子異常としては、promoter methylationと前述のEGFR 遺伝子増幅のみである。2007年、我々のグループは世界に先駆けて、TTF-1 遺伝子増幅が末梢細胞型肺腺癌に検出され、転移と関連することを報告した⁸。この結果は極めてEGFR 遺伝子増幅と似た動態を示しており、腫瘍内不均一分布を示す可能性が示唆される。この検討においてはまずこの点について検討を行いたい。また、これまでのわれわれの検討では遺伝子増幅が腫瘍内不均一性と関連が示唆される唯一の遺伝子変化であり、前述のSNP array による結果による増幅を示す遺伝子についても検討を企てたい。

このような腫瘍内不均一分布を示す遺伝子変異は、後期に獲得される遺伝子であり、その意味で転移・浸潤と関連すると推測される。前述の前癌病変や上皮内病変の解析結果と合

わせることで、腺癌における分子腫瘍学的進展の統合モデルの確立に結び付けたい。また、EGFR 遺伝子増幅の検討で行ったごとく、転移巣でどのようなクローンがその遺伝子変化と関連するのかは、転移のメカニズムを考える上で重要である。さらにそのようなクローンが形態学的などのようなパターンをとるかを検討することによって、転移と関連する形態学的な特徴を抽出することが可能である。これまでに、先進部の芽出浸潤や微小乳頭状増殖が高度の浸潤性と関連があるとされている。一つの腫瘍をなす前頁図の 4 つの成分はいずれも EGFR 遺伝子変異があるものの、後期に獲得される EGFR 遺伝子増幅に差がある。このような仮説が正しいとすると、腫瘍進化の後期に形成される病変、つまりより advanced と推定される病変は遺伝子増幅を有する病変であり、その形態学的な特徴や転移クローンとの比較など、進展度との比較を行うのによいマーカーとしても利用可能である。



iv) 分子病理学的鑑別診断への応用

近年の画像診断技術の向上、治療法の進歩などに伴い、日常診療において重複癌か転移性腫瘍かの選択に迫られることはまれではない。しかしながら多くの場合、治療方法を大きく変えるかもしれないこの鑑別診断は、小さ

な、しばしば変性を伴う生検組織で行わなければならない、補助的手段が欠かせない。他の臓器からの転移性腫瘍については、現在多くの免疫組織学的なマーカーが使用され、実際役に立つが、その数や質は完全とは言えない。われわれは、NCBI で公開された SAGE データベースを用い、情報処理により鑑別分子を抽出し、実際の診断に有用であることを 2004 年に報告した⁹。また、抗体を得て免疫組織化学染色によってもその有用性が確認できた¹⁰。現在は発現解析による膨大なデータが蓄えられており、これらのデータを有機的に活用し、更なる実践的鑑別診断腫瘍マーカーの開発を行いたい。その際には、high-throughput の組織マイクロアレイが役に立つが、この技術も早くから取り入れ、すでに多くの発表を行っている^{11,12}。また、前述のごとく肺癌では重複癌が多く、常に肺内転移か重複癌かの鑑別が問題になる。たとえば、大きさの異なる 2 つの腺癌が異なる肺葉に見出された場合、肺内転移であれば M1/stage IV であるのに対し、重複癌と評価されれば stage IA の可能性さえある。しかしながら、この診断に関して決定的な鑑別方法は確立されていないが、上記過程で得られた知見は、肺重複病変や転移性肺癌の鑑別に役だてることが可能である。その際に問題となるのは、これら鑑別疾患に用いられる対象組織のほとんどはホルマリン固定パラフィン包埋標本であり、しかも生検組織という小さな組織片で検討できなければ意味がない。この点についても、生検組織の未染標本 1 枚から EGFR, KRAS, BRAF などの遺伝子変異を数時間で検出できるアッセイ系を開発し、発表している¹³。この実践的な応用について検討を行いたい。

【文献】

1. Sakamoto H, Shimizu J, Horio Y, et al. Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR

gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. *J Pathol.* 2007;212:287-294.

2. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2890-2896.
3. Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2007;450:893-898.
4. Shibata T, Uryu S, Kokubu A, et al. Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6177-6185.
5. Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, et al. Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1236-1241.
6. Yatabe Y, Konishi H, Mitsudomi T, et al. Topographical distributions of allelic loss in individual non-small-cell lung cancers. *Am J Pathol.* 2000;157:985-993.
7. Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T. Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68:2106-2111.
8. Tanaka H, Yanagisawa K, Yatabe Y, et al. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. *Cancer Res* 2007;67:6007-6011.
9. Koga T, Horio Y, Mitsudomi T, et al. Identification of MGB1 as a marker in the differential diagnosis of lung tumors in patients with a history of breast cancer by analysis of publicly available SAGE data. *J Mol Diagn.* 2004;6:90-95.
10. Sasaki E, Tsunoda N, Hatanaka Y, et al. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Mod Pathol.* 2007;20:208-214.
11. Yatabe Y, Koga T, Mitsudomi T, et al. CK20 expression, CDX2 expression, K-ras mutation, and goblet cell morphology in a subset of lung adenocarcinomas. *J Pathol.* 2004;203:645-652.
12. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Maspin expression in normal lung and non-small-cell lung cancers: cellular property-associated expression under the control of promoter DNA methylation. *Oncogene.* 2004;23:4041-4049.
13. Yatabe Y, Hida T, Horio Y, et al. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn.* 2006;8:335-341.

4. 研究成果

i) 前癌病変、上皮内病変の検討

上記早期病変については、2つの方向からアプローチを行った。まずは、上皮内病変、微小浸潤病変について世界標準の基準作成に関与した。これまでの WHO 分類における細気管支肺胞上皮癌 (BAC) は上皮内癌と定義されているにも

かかわらず、臨床的に”advanced BAC”として取り扱われることが少なくなかった。これは、明瞭な結節を形成せず、肺炎様の複数区域を侵す腫瘍に対して BAC という言葉を用いてきた歴史的背景がある。この腫瘍は置換性増殖を主体としていたため、上皮内癌と再定義されたが、欧州では伝統的に Bronchogenic carcinoma vs bronchioloalveolar carcinoma の構図が現在でも強く残っている。そのため、混乱を避ける意味で、この BAC という用語を分類から除き、上皮内癌を以下の様に定義した (J Thorac Oncol. 2011;6:244-85、Proc Am Thorac Soc. 2011;8:381-5.)。

上皮内癌の定義

3 cm 以下の腫瘍
孤立性の腺癌
完全な置換性増殖
間質浸潤・血管浸潤・胸膜浸潤がない
乳頭状増殖・微小乳頭状増殖がない

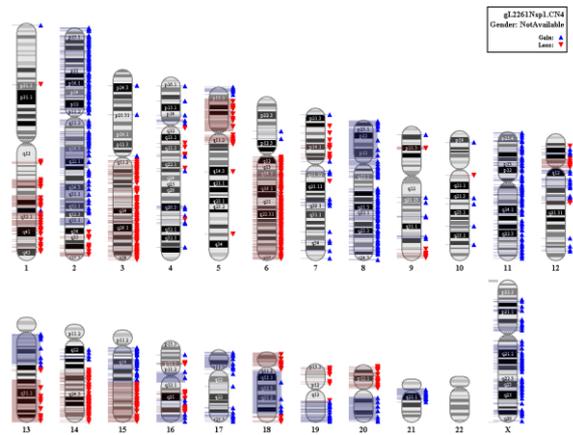
また、これに準ずる微小浸潤癌についても定義をし、この基準で判断して科学的根拠を作っていく事を提唱した。

微小浸潤癌の定義

3 cm 以下の腫瘍
孤立性の腺癌
ほとんどが置換性増殖
いずれの浸潤巣も 5mm 以下
浸潤とは
浸潤性増殖パターン (腺房型、乳頭型、微小乳頭型、充実型)
筋線維芽間質内の腫瘍細胞の侵入
除外規定
リンパ管や血管、胸膜への浸潤を示す腫瘍
腫瘍壊死を伴う腫瘍

また、これまでの結果をもとに、同様の考えを持つコロンビア大学の研究者らとともに、腺癌がほんとうに段階的発がんを遂げるのかについての総説を発表した (Lung Cancer. 2011; 74:7-11)。ここでは幾つかの、段階的発がんモデルでは説明できない基礎的・臨床的な事象を上げ、多段階に疑問を呈する点で、大きな反響を得た。

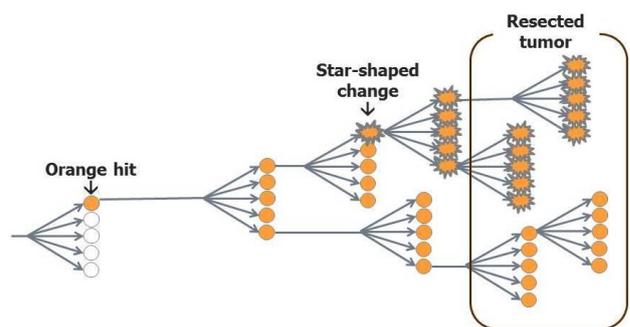
ii) **重複病変の解析**：肺腺癌では重複癌が多く、同一個体上で生じた2つの腺癌を解析することで、同一発がん物質暴露による発癌過程の相違を知ることができる。そこで、gene chip による発現解析および SNP array を用い、網羅的に遺伝子変異をとらえ、その違いについて検討を行った。基本的遺伝子変異 (p53, EGFR, KRAS, BRAF, HER2) を検索し終えた 700 例の肺腺癌症例より、臨床病理学的に詳細な検討が可能な35ペアの重複癌を抽出し、Affymetrix 社の genome-wide human SNP Array 5.0 を用い、コピー数および LOH についてのデータを取り終えた(右図)。全ゲノム的な情報が得られるため、情報データ解析に時間がかかり、現在も解析を行なっているが、その一部の結果からは、安定したデータが得られており、これまでに報告されている myc、cyclin D1、EGFR 遺伝子などの増幅3が検出されている。特に、KRAS 遺伝子増幅の存在について報告されてはいるものの、遺伝子変異との関連は指摘されておらず、EGFR 遺伝子のように遺伝子変異と遺伝子増幅とが共に生じるものなのか深く検討を進めたい。少なくとも mRNA の direct sequencing では増



幅を示唆する結果は得られていないことからその差に興味を持たれる。また、研究目的で記載した肺腺癌における2大亜型(末梢細胞型肺腺癌とそれ以外の腺癌)においてもコピー数変化の類似性比較による階層化クラスターを検討し、発現解析を裏付ける結果が得られるか検討を試みたい。少なくともこれまでの報告からは、BAC array による解析で、データポイント数はかなり少ないまでも同様の分類を示すであろうことが示唆されている。

iii) 組織内遺伝子異常の多様性：

腫瘍内遺伝子変異の多様性を考える上で、腫瘍の発生過程は重要な示唆を与える(図)。



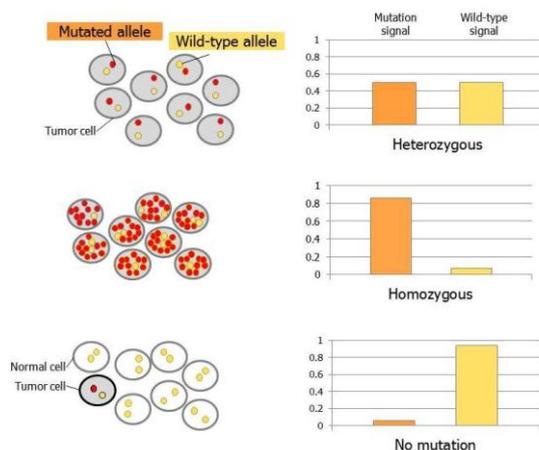
すなわち、腫瘍発生の早期に獲得される遺伝子変異は腫瘍に均一に分布し、後期に獲得される遺伝子変異は多様性を示す可能性がある。

EGFR 遺伝子変異は肺腺癌の前癌病変で

も検出されることを世界に先駆けて発表し (Am J Surg Pathol. 2005;29:633-9)、EGFR 遺伝子変異が非常に早期から獲得される遺伝子変異であることを示唆した。したがって、EGFR 遺伝子変異は腫瘍内で均一に分布していると推測される。しかしながら、いくつかの論文では腫瘍内多様性を指摘し、EGFR 遺伝子検査のための採取部位選択についての重要性を示しているものもある。これに対して、このような EGFR 遺伝子変異の多様性は、近年見出し、見出された 2 つの肺癌遺伝子変異における現象に伴う見かけ上の現象であることを示した。

まず、EGFR 遺伝子増幅が遺伝子変異に関連して生じる。遺伝子増幅は腫瘍の進展、特に浸潤性増殖に伴って獲得される。一部の腫瘍では腫瘍の浸潤性増殖は限局しているため、遺伝子増幅は腫瘍内で不均一に分布していることになる (Cancer Res. 2008;68:2106-11)。一方で、変異を示す遺伝子が EGFR、KRAS などの driver mutations で生じることが示された。一般に遺伝子増幅の際には、変異アリルと正常アリルが無作為に増幅する可能性もあるが、これらの driver mutation では変異アリルが特異的に増幅される (mutation specific allelic imbalance, MASI) ことが、南テキサス大学らの Gazdar らのグループによって報告された (PLoS One. 2009;4:e7464)。この 2 つの現象により、これまで報告されている EGFR 遺伝子変異の腫瘍内多様性が見かけ上の現象であることは以下のように説明される。EGFR 遺伝子変異は腫瘍内に均一に分布するが、EGFR 遺伝子増幅部位 (浸潤部に多い) では、変異アリル特異的増幅 (MASI) が生じている。そのため、増幅部の組織が採取された場合、変異アリ

ルが誇張されて検出される。これに対して、遺伝子増幅を伴わない部分では、変異アリルと正常アリルからなる。それは EGFR 遺伝子変異ががん遺伝子であり、活性化型変異のため、変異が 1 つあればその増殖シグナルを恒常的に下流に伝えるためである。臨床検体においては正常組織の混入は避けられないため、変異アリルは混入した正常細胞の正常アリルによって常に希釈されることになる。このため、正常細胞の混入が著しいと、遺伝子増幅を伴わない部位では変異アリルが検出限界以下に希釈されてしまうが、遺伝子増幅部では変異アリルが特異的に増えているため、正常細胞によって同程度希釈されていても変異シグナルが検出される (図)。これが見かけ上の遺伝子変異多様性として検出されていると推測される (J Clin Oncol. 2011;29:2972-7.)。

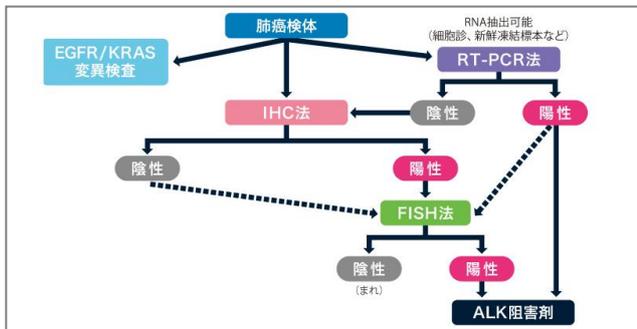


iv) 分子病理学的鑑別診断への応用：、研究期間に分子標的薬として保険収載される予定であった ALK 阻害剤について、国内外の診断アルゴリズムの開発スタディに積極的に参加した。現在 ALK 阻害剤の患者適格条件の判定においては、FISH 法、免疫染色法、

RT-PCR 法があり、それらには検査としての特徴とそれらが検索できる組織材料に違いがある (表)。

特徴	適応
	胸水細胞診
できれば最も確実！	BAL
でも、でなければ何も結果が得られていないのと同じ！	擦過
	凍結組織
現在の Golden standard !	胸水セルブロック
FISH	パラフィン標本が必要
評価が難しい…	気管支鏡生検 FFPE 切除 FFPE 組織
IHC	パラフィン切片を用いる
簡単・早い！	胸水セルブロック 気管支鏡生検 FFPE
最適化した条件での染色が必須	切除 FFPE 組織
偽陽性も！	

それらの特徴に鑑み、次のような診断アルゴリズムを策定した。



ALK 診断のアルゴリズムに関して国際的に最も早い時期でその指針を表したものとして注目を集めるとともに、これらの結果が現在の主流の考え方になっていることから、世界的にも評価されている。これらについては、総説として世界肺癌学会の総説として発表される予定である。

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 22 件) (全て査読有り)

1. Nishikawa E, ... Yatabe Y (10th/13), ... Mir-375 Is Activated by Ash1 and Inhibits Yap1 in a Lineage Dependent Manner in Lung Cancer. *Cancer Res.* in press
2. Yatabe Y, Borczuk AC, Powell CA. Do All Lung Adenocarcinomas Follow a Stepwise Progression? *Lung Cancer.* 2011;74:7-11.
3. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y (6th/48), et al. *J Thorac Oncol.* 2011;6:244-85.
4. Harada T, Yatabe Y, Takeshita M, Koga T, Yano T, Wang Y, Giaccone G. Role and Relevance of Trkb Mutations and Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17:2638-45.
5. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous Distribution of EGFR Mutations Is Extremely Rare in Lung Adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29:2972-7.
6. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H, Ishikawa Y, Kimura H, Mitsudomi T, Tanio Y, Mano H; ALK Lung Cancer Study Group. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med.* 2010;363:1734-9.
7. Bryant CM, Albertus DL, Kim S, Chen G, Brambilla C, Guedj M, Arima C, Travis WD, Yatabe Y (9th/12),... Clinically Relevant Characterization of Lung Adenocarcinoma Subtypes Based on Cellular Pathways: An International Validation Study. *PLoS One.* 2010;5:e11712.
8. Fujiwara S, Nawa A, ..., Yatabe Y (10th/10). Thyroid Transcription Factor 1 Expression in Ovarian Carcinomas Is an Independent Prognostic Factor. *Hum Pathol.* 2010;41:560-5.
9. Girard N, Lou E, Azzoli CG, Reddy R, Robson M, Harlan M, Orlow I, Yatabe Y (8th/18),... Analysis of Genetic Variants in Never-Smokers with Lung Cancer Facilitated

- by an Internet-Based Blood Collection Protocol: A Preliminary Report. *Clin Cancer Res.* 2010;16:755-63.
10. Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara TA, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M. Regulation of DNA Polymerase Pold4 Influences Genomic Instability in Lung Cancer. *Cancer Res.* 2010;70:8407-16.
 11. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical Detection of Egfr Mutation Using Mutation-Specific Antibodies in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3349-55.
 12. Yatabe Y. Egfr Mutations and the Terminal Respiratory Unit. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:23-36. (Review)
 13. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, Geisinger KR, Asamura H, Brambilla E, Garg K, Hirsch FR, Noguchi M, Powell CA, Rusch VW, Scagliotti G, Yatabe Y. Pathologic Diagnosis of Advanced Lung Cancer Based on Small Biopsies and Cytology: A Paradigm Shift. *J Thorac Oncol.* 2010;5:411-4.
 14. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib Versus Cisplatin Plus Docetaxel in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (Wjtog3405): An Open Label, Randomised Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:121-8.
 15. Suda K, Murakami I, Katayama T, Tomizawa K, Osada H, Sekido Y, Maehara Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Reciprocal and Complementary Role of Met Amplification and Egfr T790m Mutation in Acquired Resistance to Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5489-98.
 16. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J.* 2010 Jan;277(2):301-8. (Review.)
 17. Ebi H, Tomida S, Takeuchi T, Arima C, Sato T, Mitsudomi T, Yatabe Y, Osada H, Takahashi T. Relationship of Deregulated Signaling Converging onto Mtor with Prognosis and Classification of Lung Adenocarcinoma Shown by Two Independent in Silico Analyses. *Cancer Res.* 2009;69:4027-35.
 18. Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y. Combined Inhibition of Met and Egfr Suppresses Proliferation of Malignant Mesothelioma Cells. *Carcinogenesis.* 2009.
 19. Kosaka T, Yatabe Y, Onozato R, Kuwano H, Mitsudomi T. Prognostic Implication of Egfr, Kras, and Tp53 Gene Mutations in a Large Cohort of Japanese Patients with Surgically Treated Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2009;4:22-9.
 20. Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Arima C, Matsuo K, Mitsudomi T, Yatabe Y, Takahashi T. Relapse-Related Molecular Signature in Lung Adenocarcinomas Identifies Patients with Dismal Prognosis. *J Clin Oncol.* 2009;27:2793-9.
 21. Varella-Garcia M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Kosaka T, Nakajima E, Xavier AC, Skokan M, Zeng C, Franklin WA, Bunn PA, Jr., Hirsch FR. Egfr and Her2 Genomic Gain in Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer after Surgery: Impact on Outcome to Treatment with Gefitinib and Association with Egfr and Kras Mutations in a Japanese Cohort. *J Thorac Oncol.* 2009;4:318-25.
 22. ... Yatabe Y (7th/9), Osada H, Takahashi T. Relationship of Deregulated Signaling Converging onto Mtor with Prognosis and Classification of Lung Adenocarcinoma Shown by Two Independent in Silico Analyses. *Cancer Res.* 2009;69:4027-35
- [学会発表] (計 11 件)
1. Yasushi YATABE (2011) : Is the EGFR mutation distributed heterogeneously within tumor?, the 100th annual meeting of US-Canadian Academy of Pathology (米国・サンアントニオ) [口演]
 2. Yasushi YATABE (2011). Is the EGFR Mutation Distributed Heterogeneously within Tumors? Annual meeting of US-Canada Academy of Pathology, workshop (米国・サンアントニオ) [ワークショップ]
 3. Yasushi YATABE (2011). Diagnostic algorithm of ALK fusion ADC in clinical practice. 5th IASLC/ASCO/ESMO International Conference on Molecular Targeted Therapy in Lung Cancer at Malta. Symposium (マルタ) [シンポジウム]
 4. Yasushi YATABE (2011). It's TRU!: Role of TTF-1 and EGFR Developmental Pathways

In Lung Adenocarcinoma, Educational Symposium (米国・コロラド) [シンポジウム]

5. Yasushi YATABE(2011) Pitfalls for EGFR mutation specific antibodies, oral workshop Molecular classification of lung carcinoma (1):Adenocarcinoma, oral workshop Standardization of IHC for ALK, oral workshop IASLC Path Panel in fall. Workshop (つくば) [ワークショップ]
6. Yatabe Y, Wistuba I. : Molecular correlation and classification of lung cancer. IASLC Pathology Panel Meeting, 2011 (つくば) [ワークショップ]
7. Yatabe Y: Unveiling the Molecular Landscape of Lung Adenocarcinoma Development. The 4th Asia Pacific Lung Cancer Conference, 2010.12、(韓国・ソウル) [シンポジウム]
8. Yatabe Y : EGFR mutation in lung cancer cell differentiation and survival. American Thoracic Society, 2010.05、(米国・ニューヨーク) [シンポジウム]
9. Yatabe Y (2009) . Morphological and Biological Characteristics of Lung Adenocarcinomas Harboring EGFR, KRAS, BRAF, HER2, and EML4-ALK Gene Alterations. The 49th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society, (東京) [シンポジウム]
10. Yatabe Y : MEET THE EXPERT, An Emerging Concept of Lung Adenocarcinoma: What can we learn from EGFR, KRAS, BRAF, HER2 and EML4-ALK gene alterations? The 13th World Conference on Lung Cancer. 2009 , (米国・サンフランシスコ) [シンポジウム]
11. Yatabe Y : TTF-1 Positive Metastatic Cervical Cancer. The Third Korean-Japanese Joint Slide Conference of Lung Pathology . 2009, (名古屋) [ワークショップ]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷田部 恭 (YATABE, Yasushi)
愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学
部・研究員
研究者番号 : 90280809

(2) 研究分担者

光富 徹哉 (MITSUDOMI, Tetsuya)
愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学

部・研究員
研究者番号 : 70209807

(3) 連携研究者

高橋 隆 (TAKAHASHI, Takashi)
名古屋大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号 : 50231395