

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 05 月 1 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791323

研究課題名（和文） 非小細胞肺癌における SISH 法を用いた遺伝子増幅解析と EGFR-TKI 耐性の検討

研究課題名（英文） Research on gene copy number and resistance to EGFR-TKI therapy using silver in situ hybridization (SISH) technology for non-small-cell lung cancer.

研究代表者

吉田 浩一（YOSHIDA KOICHI）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00424490

研究成果の概要（和文）：10 種類の肺癌細胞株を用いて Ventana 社（Tucson, AZ）で開発された IGF1R-SISH 法を行った。培養細胞を用いたセルブロック標本から、SISH 法を用い、IGF1R と chromosome 15 遺伝子に対する DNA プローブを組織標本上でハイブリダイズさせ。標的遺伝子の増幅の有無を光学顕微鏡にて解析した。IGF1R のコピー数増加は 1.12-7.56 の範囲となり、平均では 2.26 で中央値は 2.11 であった。特に扁平上皮癌細胞株ではコピー数が 7.56 と高値を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：An experimental SISH probe designed by Ventana Medical Systems (Tucson, AZ) was used to evaluate IGF1R gene copy number on 10 non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines. The mean number of IGF1R gene copies/nuclei per cell line was 2.26 (range: 1.12 - 7.56). The median copy number was 2.11. Squamous cell carcinoma had 7.56 copy number compared to non-SCC histologies. IGF1R gene copy number detected by SISH is higher in Squamous cell carcinoma cell line than in other cell line of NSCLC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：肺癌・EGFR・EGFR-TKI・EGFR 遺伝子変異・上皮成長因子受容体・分子標的治療・薬剤耐性・IGF-1R・FISH・SISH

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩により、発癌が遺伝子の異常による細胞内シグナル伝達系や細胞周期調節に関与する分子機能の破綻として認識されるに至った。上皮増殖因子受容体 (EGFR) 及びその下流シグナルは近年の肺癌領域で最も研究が盛んな分野である。EGFR の過剰発

現や変異が多く、悪性腫瘍の増殖に重要な役割を担っていることから、EGFR に対する分子標的治療薬 (EGFR-TKI: 上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬) が開発され大いに期待されたが、当初の予想に反し間質性肺炎などの重篤な副作用が生じたり、効果が認められない臨床試験結果がいくつか報告さ

れた。しかしながら、肺腺癌、アジア人、女性、非喫煙者などある特定の患者群では有意に EGFR-TKI の効果が認められることが報告され、これら患者群におけるバイオマーカー解析の結果、EGFR 遺伝子変異の陽性率が高いことが報告された。一方、欧米諸国におけるバイオマーカー解析では、EGFR 遺伝子の増幅（遺伝子コピー数の異常）と EGFR-TKI の奏効率に相関関係が認められ、いくつかの臨床試験では実際に FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法を用いて EGFR 遺伝子増幅の解析を行っている。EGFR の歴史を振り返ると、非小細胞肺癌に対する効果予測因子として EGFR の蛋白発現は相関性がなかったのに対し、EGFR 遺伝子変異と FISH 法による EGFR 遺伝子増幅は有意に相関性を認め、非小細胞肺癌（特に腺癌）における治療戦略に必須なマーカーとして確立された。しかし EGFR-TKI が劇的な腫瘍縮小効果を示す一方で、ある時点を境に治療抵抗性を獲得してしまうことも広く知られている。最近の研究では T790M 遺伝子変異、MET 遺伝子変異など 2 次耐性因子の発現が関与していることが明らかになり、耐性獲得機序が明確化されつつある。この耐性因子として注目されているのが IGF1R（インスリン様成長因子 1 受容体）である。IGF1R は細胞膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体であり EGFR 同様に癌細胞における増殖、浸潤、転移に関与しているとされる。また EGFR-TKI 耐性の機序のひとつとして IGF1R が関与していると考えられており、すでに新しい分子標的型抗癌剤として、IGF1R チロシンキナーゼ阻害剤 (IGF1R-TKI) の臨床開発が進んでおり、一部では抗腫瘍効果が確認されている。今までに積極的に臨床試験行われてきたが、現段階において IGF1R 遺伝子の増幅や変異は肺癌における分子標的治療のバイオマーカーとして確立されておらず、中でも IGF1R 遺伝子増幅の解析は急務であると考えている。

2. 研究の目的

近年 FISH 法より簡便に EGFR 遺伝子の増幅を解析できる SISH 法 (Silver in situ hybridization) が米国 Ventana 社 (Tucson, AZ) で開発された。両者とも目的遺伝子 DNA プローブをハイブリダイズさせて増幅を解析する手法には変わらない。SISH 法に着眼した理由は、従来の FISH 法では蛍光物質を使用して目的遺伝子 DNA プローブをハイブリダイズさせるため、常に観察のための暗室と蛍光顕微鏡が必要で、蛍光物質は時間とともに消退してしまい再現性に乏しいという難点があったからである。これに対して SISH 法は銀を用いてハイブリダイズさせるため、時間とともに消退することがなく再現性に優れている。つまり SISH 法により標本を製作した後、数ヶ月経っても蛍光顕微鏡や暗室を

使用することなく、通常の光学顕微鏡を使用して遺伝子増幅の評価が可能であるという点が画期的である。このように非小細胞肺癌において EGFR-TKI によるさらなるテーラード治療化へ向け、EGFR 及び IGF1R 遺伝子増幅解析を新しい手法により確立し臨床応用するのが本研究の目的である。本研究は非小細胞肺癌における EGFR (上皮成長因子受容体) の遺伝子増幅を、新しく開発された SISH 法 (Silver in situ hybridization) を用いて解析し、更に同手法を用いて IGF1R (インスリン様成長因子 1 受容体) 遺伝子増幅も解析する。この結果から EGFR-TKI (上皮成長因子受容体阻害剤) の治療効果と IGF1R 遺伝子増幅との間に相関性を見出すことを目的としているが、IGF1R 遺伝子増幅が EGFR-TKI 治療における新しい耐性因子となり得るかの検証が目的である。

3. 研究の方法

過去に当施設で肺癌と診断され外科切除もしくは化学療法が行われた後、再発もしくは転移によって EGFR-TKI による化学療法を受けた症例を対象とした後向き研究である。また臨床検体を用いる前に肺癌培養細胞株を用いて予備実験を行うこととする。対象症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本から、厚さ 4 μ m の薄切切片標本を作製して、SISH (Silver in situ hybridization) 法を用い、EGFR と chromosome 7 及び IGF1R と chromosome 15 遺伝子に対する DNA プローブを組織標本上でハイブリダイズさせ、標的遺伝子の増幅の有無を光学顕微鏡にて解析を行う。評価方法はコロラド大学により提唱された FISH 解析評価法に準じて行う。IGF1R 遺伝子増幅陽性例における EGFR-TKI の治療効果を解析するだけでなく、EGFR 遺伝子変異陽性例、及び EGFR 遺伝子増幅陽性例も同時に解析する。また同検体を用いて IGF1R 蛋白発現を免疫組織化学染色法によって解析を行い、SISH 法との比較検討を統計学的に SPSS 統計解析ソフトウェアを用いて行う。

4. 研究成果

10 種類 (腺癌: A549, HCC15, HCC78, HCC2279, H1650, H1975 扁平上皮癌: H157, NE18, 大細胞癌: H1299, H460) の肺癌細胞株を用いて IGF-1R の免疫染色と IGF1R-SISH 法を行った。培養細胞を遠心した後、ホルマリン固定パラフィン包埋セルブロック標本を作製した。厚さ 4 μ m の薄切切片標本を作製して、米国コロラド大学へ郵送し、同大学で SISH 法を用い、EGFR と chromosome 7 及び IGF1R と chromosome 15 遺伝子に対する DNA プローブを組織標本上でハイブリダイズさせた。標的遺伝子の増幅の有無は東京医科大学内にて光学顕微鏡で解析を行った。解析にあたり評価方法は FISH 法に準じるとともに、コロラド大学からの SISH 評価方法も参考にした。

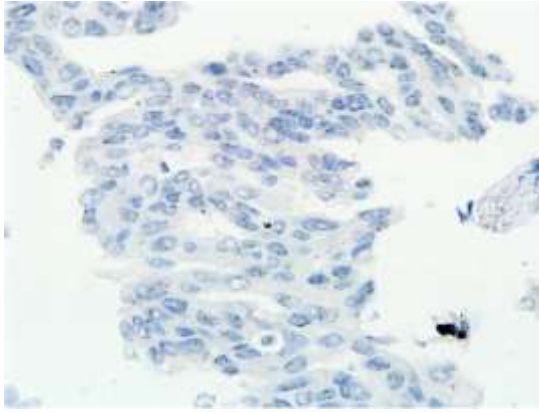


図1 腺癌(SISH法)

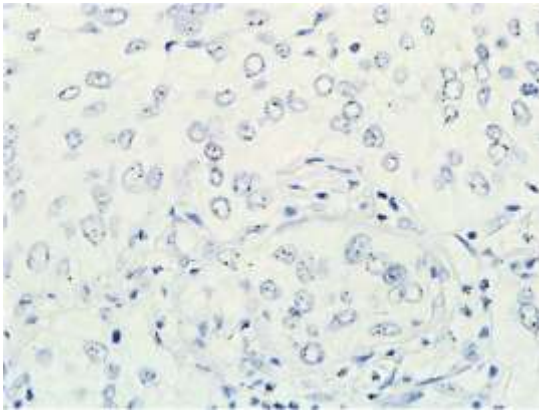


図2 腺癌(SISH法)

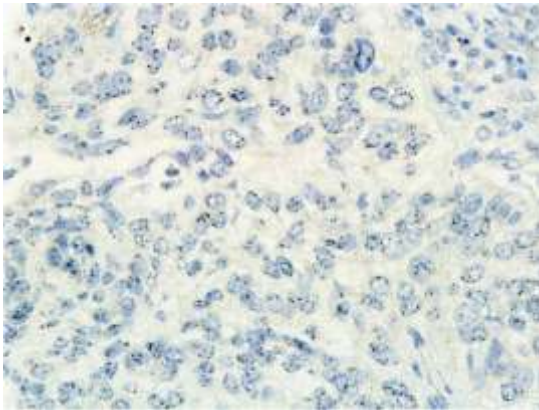


図3 扁平上皮癌(SISH法)

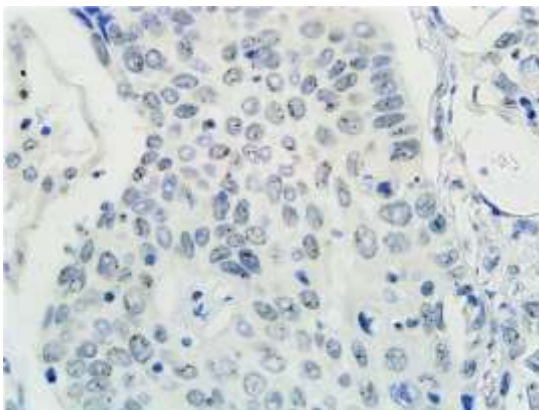


図4 扁平上皮癌(SISH法)

図1-4はコントロールで持ちいた、組織別肺癌を示す。培養細胞株におけるIGF1-Rのコピー数増加は1.12-7.56の範囲となり、平均は2.26で中央値は2.11となった。特に扁平上皮癌細胞株ではコピー数が7.56と高値を示すことを明らかにした。免疫組織化学染色法によって各種抗体間(VENTANA社、及びNOVUS社製)での比較解析を現在行なっており、速やかに臨床検体での解析を行う方針である。

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)

①Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Pathological Vascular Invasion and Tumor Differentiation Predict Cancer Recurrence in Stage IA Non-Small-Cell Lung Cancer After Complete Surgical Resection. J Thorac Oncol. 2012 Jun 5.

②Mascaux C, Wynes MW, Kato Y, Tran C, Asuncion BR, Zhao JM, Gustavson M, Ranger-Moore J, Gaire F, Matsubayashi J, Nagao T, Yoshida K, Ohira T, Ikeda N, Hirsch FR. EGFR protein expression in non-small cell lung cancer predicts response to an EGFR tyrosine kinase inhibitor--a novel antibody for immunohistochemistry or AQUA technology. Clin Cancer Res. 2011 Dec 15;17(24):7796-807

③Kajiwara N, Taira M, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Usuda J, Uchida O, Ohira T, Kawate N, Ikeda N. Early experience using the da Vinci Surgical System for the treatment of mediastinal tumors. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2011 Oct;59(10):693-8

④Saji H, Tsuboi M, Yoshida K, Kato Y, Nomura M, Matsubayashi J, Nagao T, Kakihana M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Prognostic impact of number of resected and involved lymph nodes at complete resection on survival in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2011 Nov;6(11):1865-71.

⑤Kato Y, Peled N, Wynes MW, Yoshida K, Pardo M, Mascaux C, Ohira T, Tsuboi M, Matsubayashi J, Nagao T, Ikeda N, Hirsch FR. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth

factor receptor mutations. J Thorac Oncol.
2010 Oct;5(10):1551-8.

〔学会発表〕（計1件）

①2011 ASCO Annual Meeting

The role of IGF-1R in EGFR TKI resistance
in NSCLC using IHC and AQUA technology. Y.
Kato, C. Mascoux, M. W. Wynes, B. Reyna
Asuncion, C. Tran, K. Yoshida, J.
Matsubayashi, E. Nakajima, T. Ohira, T.
Nagao, K. Furukawa, N. Ikeda, F. R. Hirsch

〔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

吉田浩一 (KOICHI YOSHIDA)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00424490