

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592095

研究課題名(和文) 肺癌における染色体不安定性の解明と治療抵抗性克服への展開

研究課題名(英文) Chromosomal instability in lung cancer and innovative strategy for avoiding therapeutic resistance

研究代表者

岡本 龍郎 (Okamoto, Tatsuro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80568626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌はいまだに難治性癌の一つである。肺癌細胞の遺伝子が動的な状態にあり(genetic instability)、耐性細胞を作り出すことが原因の一つと考えられる。このような癌の特徴には、染色体不安定性：chromosomal instability (CIN)が関与する可能性がある。本研究では、肺癌におけるCINの意義を調べ、CINに関与する因子の検討を行った。今回の検討により、CINを示す細胞では、DNA損傷修復関連因子であるChk2遺伝子の発現が高いこと、Chk2発現が高い肺癌の予後が悪いことが示され、肺癌の進展にChk2が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is one of the leading causes of cancer deaths in the world. The cancer cells have a genetically dynamic state (genetic instability), which is believed to produce the resistant cells. Chromosomal instability (CIN) may be involved in this mechanism. In this study, we examine the significance of CIN in lung cancer, and examined the factors involved in CIN. In the lung cancer cells showing CIN, the high expression of a DNA damage repair-related factor, Chk2 gene. The prognosis of lung cancer with high Chk2 expression is worse than that with low Chk2 expression. It has been suggested that Chk2 is involved in the development of lung cancer

研究分野：呼吸器外科

キーワード：染色体不安定性 非小細胞肺癌 DNA損傷修復

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌における治療抵抗性

肺癌はいまだに難治性癌の一つであり、日本のみならず欧米諸国における癌死亡の第1位である。その理由として、悪性度が高く比較的早期の段階で外科治療を行っても、その半数以上に転移・再発を来すことが挙げられる。切除不能肺癌では細胞傷害性薬剤やチロシンキナーゼ阻害剤などの分子標的治療薬が用いられるが、その有効性は限られており、効果が認められても1-2年のうちに獲得耐性を来す。

肺癌細胞が遺伝子異質性 (genetic heterogeneity) のため内部に耐性細胞を持つこと、遺伝子が動的な状態にあり (genetic instability)、すぐに耐性細胞を作り出す能力をもつことが原因の一つと考えられる。このような癌の性質を担う細胞形質として、高変異形質 (mutator phenotype) や染色体不安定性: chromosomal instability (CIN) の概念が提唱されている。近年の動物モデルや臨床データの報告から、CIN が癌の悪性度や薬剤耐性に関与することが示唆された [Thompson SL et al. *Chromosome Res* 2011;19:433-44]。

(2) 肺癌における染色体不安定性

近年、Comparative Genomic Hybridization (CGH)、Spectral Karyotyping (SKY) や Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Array などゲノム異常解析法の進歩により、詳細かつ網羅的な染色体構造異常が調べられるようになった。CIN は aneuploidy を担う whole chromosomal instability (W-CIN) と欠失変異・増幅・転座などの構造的変化を担う structural chromosomal instability (S-CIN) に大別されるが、最近両者はオーバーラップしていることが示された [Janssen A et al. *Science* 2011;333:1895-8]。肺癌においては、CIN が予後不良因子となることが報告されており [Choi CM et al. *Lung Cancer* 2009;64:66-70]、本形質が生物学的悪性度に関係していることが示唆された。

以前より chromosome 3p の LOH、myc 増幅などの染色体構造異常が観察されてきたが、最近では EGFR 遺伝子 exon19 の欠失変異、EGFR 遺伝子増幅、Echinoderm microtubule associated protein like 4 (EML4) と anaplastic lymphoma kinase (ALK) の染色体転座などが driver mutation として肺癌の増殖に中心的役割を担っていることが明らかとなり、これらに対する阻害剤が劇的な効果を挙げている。さらに最近 EGFR 遺伝子変異や K-ras 遺伝子変異などの変異アレルが特異的に増幅し (mutant allele specific imbalance, MASI)、コピー数の増加が癌の悪性度に関係することが示された。

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の EGFR-TKI に対する獲得耐性においては耐性変異遺伝

子の増幅や cMET 遺伝子増幅等が耐性形質に関与することが示された。耐性細胞の出現は、治療開始時から存在する少量の耐性細胞が治療での選択圧を受け発育してくると考えられるが、このような肺癌の heterogeneity は CIN の影響を受けているであろうことが予想される。以上のことから、肺癌における CIN の生物学的役割や分子機序を解明することは肺癌の進展や薬剤耐性の克服において非常に重要と考えられた。

(3) CIN と DNA 損傷応答機構との関係

S-CIN の発生機序には DNA の二本鎖切断が深く関わっていると考えられるが、明らかな機序は依然不明である。最近、癌遺伝子の活性化が DNA 複製ストレスを産み、DNA 2 本鎖切断および DNA 損傷応答系 (DNA damage response: DDR) を誘導することが示された [Gorgoulis VG et al. *Nature* 2005;434:907-13]。DNA 損傷の処理機能が破綻すると CIN が引き起こされ、遺伝子異常が蓄積するとのモデルが提唱されている [Halazonetis TD et al. *Science*, 2008;319:1352-5]。ATM, Chk2, BRCA1 などは DDR の主体をなす。また Chk2, BRCA1 は mitosis 異常による CIN 誘導の制御に重要な役割を担っていることが示され [Stolz A et al. *Nat Cell Biology*, 2010;12:492-9]、DDR pathway の破綻と CIN が密に関与する可能性がある。肺癌では Chk2 の発現低下が報告されており、これらの因子を臨床肺癌において検討することは CIN 解明の一步となる。

2. 研究の目的

肺癌においては染色体数の変化や欠失変異・増幅・転座などの染色体構造変化が高頻度に認められ、癌の悪性度や薬剤耐性化との関連していることが示唆されている。これらの遺伝子変化を導く細胞形質として染色体不安定性: chromosomal instability (CIN) の概念が提唱されているが、CIN の臨床肺癌における生物学的役割に関しては十分に解明されていない。本研究では、特に structural-CIN の臨床肺癌における意義とその分子機序を明らかにし、将来的な臨床応用、革新的治療開発の布石とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CIN と肺癌の悪性度、浸潤・転移および患者予後との関連を検討

非小細胞肺癌切除例において、CIN と臨床病理学的因子 (進行病期、リンパ節転移、遠隔転移、予後、病理学的分化度、増殖マーカーなど) との関連を検討した。

・染色体構造異常の評価法

パラフィン包埋切片からの解析: Laser

Scanning Cytometry を用いて、DNA ploidy の解析を行った(Aneuploidy の検索)。

新鮮凍結標本からの genomic DNA の解析：肺癌切除時の新鮮凍結標本から genomic DNA を抽出し、遺伝子コピー数、構造変化の解析を SNP array を用いて行った。

SNP array は、1 枚のアレイで数万から数十万カ所の SNP タイピングを行うことで、クモソームレベルの構造異常の検討や各部位におけるゲノムコピー数の定量が可能である。また SNP array を用いることで、網羅的かつ詳細な構造変化解析が行える。

(2) CIN とドライバー癌遺伝子変異との関連を検討

一部の非小細胞肺癌においては、その発育・増殖を EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 変異などに依存しており(ドライバー遺伝子変異と呼ばれる) gefitinib や erlotinib などの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤や crizotinib や alectinib などの ALK 阻害剤が劇的な効果をあげることがわかっている。EGFR 遺伝子変異を PNA-LNA PCR clamp 法にて、また EML4-ALK 変異を免疫染色法 (iAEP : intercalated antibody-enhanced polymer 法)にて検出し、上述の方法で調べた CIN とドライバー遺伝子変異との関係を調べた。

(3) 肺癌における CIN と DDR 関連因子との関連を検討

S-CIN の発生機序には DNA 二本鎖切断が深く関わっているが、明らかな機序は依然不明である。前述のように、CIN 誘導制御と DDR pathway に深くかかわっている Chk2, BRCA1 などの因子について、それぞれの肺癌における発現レベルや活性化(リン酸化)レベルを定量 PCR および免疫染色にて解析し、CIN との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) CIN と肺癌の悪性度、浸潤・転移および患者予後との関連を検討

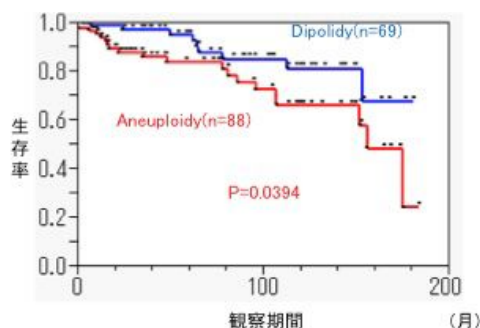
レーザスキャンニングサイトメーター (LSC)法にて DNA ploidy を解析した非小細胞肺癌切除症例 (n=157) [Takeshita M et al. Lung Cancer 2013;80:85-90]の臨床病理学的因子との関連を新たに検討した(表 1)。2 乗検定の結果、男性に aneuploidy が多かった以外は、他の因子との関連を認めなかった。

患者の予後データベースを元に、各因子別に Aneuploidy が予後に及ぼす影響を Kaplan-Meier 生存曲線から解析を行った。症例全体の検討では、Aneuploidy 症例で予後不良であり(図 1)、特に女性、70 歳未満、腺癌症例のみの検討で Aneuploidy 症例の予後が不良であった (p=0.026, p=0.18, p=0.05)。

表 1.臨床病理背景と Aneuploidy の関連

| 因子 | カテゴリー | P 値 |
|-----------|------------|--------------|
| 年齢 | <70/ 70 | 0.45 |
| 性別 | 男性/女性 | 0.046 |
| Pack-year | <20/ 20 | 0.51 |
| 組織型 | 扁平上皮癌/腺癌 | 0.97 |
| 腫瘍径 | <3cm / 3cm | 0.58 |
| pN | 0/1-2 | 0.60 |
| 病理病期 | / | 0.60 |
| 胸膜浸潤 | 0/ 1~3 | 0.33 |
| 脈管侵襲 | 陰性/陽性 | 0.091 |
| リンパ管侵襲 | 陰性/陽性 | 0.092 |
| 分化度 | 高/中-低 | 0.096 |

図 1.肺癌における DNA ploidy 別予後



(2) CIN とドライバー癌遺伝子変異との関連を検討

腺癌 102 例 ALK 遺伝子変異を免疫組織科学染色 (iAEP 法)にて評価、さらに腺癌 122 例を EGFR 遺伝子変異検索 (PNA-LNA PCR clamp 法)を行い、DNA ploidy の関係を検討したところ、Aneuploidy と EGFR 及び ALK 遺伝子変異との関係を認めなかった (表 2)。

表 2. ドライバー遺伝子変異と Aneuploidy の関係

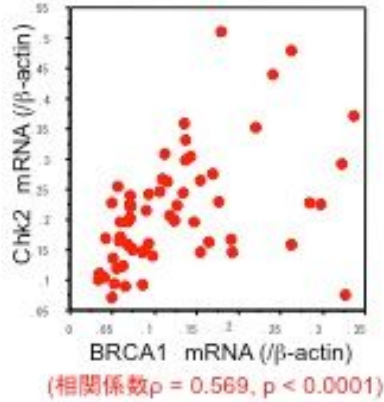
| 遺伝子変異 | カテゴリー | P 値 |
|----------|-------|------|
| EGFR 変異 | 陽性/陰性 | 0.79 |
| EML4-ALK | 陽性/陰性 | 0.64 |

(3) 肺腺癌における DDR 関連因子の発現と CIN との関連を検討

DDR 関連分子 (Chk2, BRCA1) の肺腺癌における遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した (n=59)。

BRCA1 と Chk2 の遺伝子発現量に相関が認められた (図 2)。

図2.肺腺癌における BRCA1 と Chk2 発現量の関係



また、肺癌においては、正常肺と比較し Chk2 遺伝子発現が高かった(表3)。臨床病理学的因子との関係では、BRCA1 および Chk2 発現と、年齢、p27 タンパク発現に関係が認められた(表4)。

表3.肺癌組織における CHK2 遺伝子発現 (n=59)

| 組織 | 平均値 | p 値(paired-t) |
|------|---------------|---------------|
| 正常肺 | 0.1659 | |
| 肺癌組織 | 0.2215 | 0.0123 |

表4. BRCA1、CHK2 遺伝子発現と臨床因子との関係 (Student-t 検定、n=59)

| 因子 | BRCA1(p 値) | Chk2(p 値) |
|---------------|-----------------|-----------|
| 年齢 (< 70/ 70) | P=0.0385 | NS |
| 性別 (M/F) | NS | NS |
| 喫煙歴 (有/無) | NS | NS |
| pT | NS | NS |
| pN | NS | NS |
| EGFR 変異 | NS | NS |
| p53 変異 | NS | NS |
| p27 蛋白発現 | p=0.0159 | p=0.0605 |
| p16 蛋白発現 | NS | NS |

予後解析においては、Chk2 遺伝子発現が予後不良と関係していた。(図3)

CIN を SNP-CGH array にて評価し、BRCA1 および Chk2 との関係を検討。解析ソフトウェアでの解析により、染色体の構造変化の多いサンプル(%def 16%、n=8)を CIN あり、構造変化の少ないサンプル(%def < 16%、n=12)を CIN なしとした(図4)

図3. Chk2 遺伝子発現別の予後

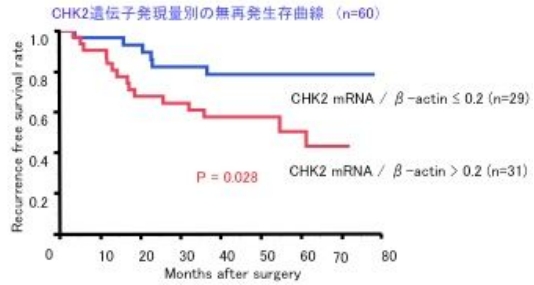


図4. %Def と染色体の構造変化

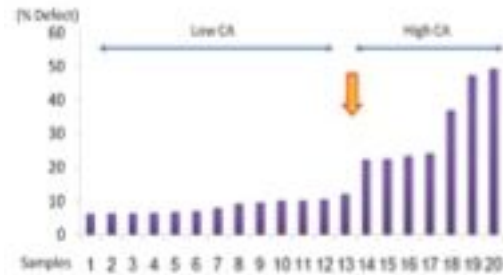


表5. BRCA1、CHK2 遺伝子発現と染色体不安定性 (CIN) との関係

| 因子 | CIN あり | CIN なし | p 値 |
|----------|--------------|--------|-----------------|
| BRCA1 発現 | 0.142 | 0.115 | NS |
| Chk2 発現 | 0.326 | 0.185 | P=0.0129 |

染色体構造変化の多い肺癌(CIN あり)においては、Chk2 発現レベルが高かった(表5)。有意差は認めないものの、CIN 症例に再発を多く認めた(p=0.30)。以上の結果より、肺腺癌の発育。進展に Chk2 発現が重要であることが示唆された。今後、Chk2 蛋白発現および活性化レベルの解析を行い、CIN や予後との関係を検討する予定である。

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 件)

- (1) Okamoto T, Iwata T, Mizobuchi T, Hoshino H, Moriya Y, Yoshida S, Yoshino I: "Prognostic impact of cell type under the seventh TNM staging system in resected non-small cell lung cancer" Thoracic cancer 3. 249-54 (2012), 査読有
- (2) Okamoto T, Yano T, Haro A, Yoshida T, Kohno M, Maehara Y: "Long-term results of surgical treatment for

malignant pleural mesothelioma: a single institution experience." Thoracic Cancer 4. 66-70 (2013), 査読有

- (3) Okamoto T, Iwata T, Mizobuchi T, Hoshino H, Moriya Y, Yoshida S, Yoshino I.: "Surgical Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer with Ipsilateral Pulmonary Metastases." Surgery Today 43. 1123-8 (2013), 査読有
- (4) Okamoto T, Suzuki Y, Fujishita T, Kitahara H, Shimamatsu S, Kohno M, Morodomi Y, Kawano D, Maehara Y. The prognostic impact of the amount of tobacco smoking in non-small cell lung cancer--differences between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Lung Cancer 85. 125-30 (2014), 査読有
- (5) Kohno M, Okamoto T, Suda K, Shimokawa M, Kitahara H, Shimamatsu S, Konishi H, Yoshida T, Takenoyama M, Yano T, Maehara Y. Prognostic and therapeutic implications of aromatase expression in lung adenocarcinomas with EGFR mutations. Clin Cancer Res 20. 3613-22 (2014), 査読有

[学会発表](計4件)

- (1) Tatsuro Okamoto, Hiroyuki Kitao, Hirokazu Kitahara, Shinichiro Shimamatsu, Mikihiro Kohno, Tsukihisa Yosida, Kenichi Suda, Hiroshi Saeki, Eriko Tokunaga, Eiji Oki, and Yoshihiko Maehara: "Chromosomal instability and DNA damage response pathway in lung adenocarcinoma" 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference (APLCC). 2012年11月25-28日、福岡市
- (2) Tatsuro Okamoto, Yuzo Suzuki, Takatoshi Fujishita, Hirokazu Kitahara, Shinichiro Shimamatsu, Mikihiro Kohno, Yohsuke Morodomi, Daigo Kawano and: "Prognostic impact of the amount of tobacco smoking in patients with resected non-small cell lung cancer" IASLC 15th World Conference on Lung Cancer. 2013年10月27-30日、Sydney, Australia
- (3) 岡本 龍郎、北原 大和、島松 晋一郎、河野 幹寛、他: "非小細胞肺癌におけるたばこの腫瘍生物学的影響" 第30回日本呼吸器外科学会総会. 2013年5月9-10日、名古屋市
- (4) Tatsuro Okamoto, Hirokazu Kitahara, Shinichiro Shimamatsu, Masakazu Katsura, Kazutoshi Takada, Takatoshi Fujishita, Yuzo Suzuki, Yosuke

Morodomi, Tetsuzo Tagawa and Yoshihiko Maehara. Prognostic impact of EGFR driver mutations on postoperative recurrence in non-small cell lung cancer. 9th INTERNATIONAL CONFERENCE OF ANTICANCER RESEARCH. 2014年10月8日、Sithonia, Greece

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 龍郎 (TATSURO OKAMOTO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 80565626

(2)研究分担者

波呂 祥 (AKIRA HARO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 90546558