

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592098

研究課題名(和文) 肺癌個別化医療を目指した肺癌予後予測診断システムの構築

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

研究代表者

伊豫田 明 (IYODA, Akira)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：10302548

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)：26例の肺大細胞神経内分泌癌(以下LCNEC)に対して、EGFRに関しては遺伝子変異、TOP01、TOP02、TUBB3、ERCC1、EGFR mutation(L858R)については免疫染色により蛋白発現を解析し、その結果を腺癌40例と比較検討した。結果はTOP02の発現がLCNECでは腺癌に比べ有意に高頻度にみられ、EGFR mutation(L858R)特異的な免疫染色は腺癌において有意に高頻度でありLCNECでは認められなかった。EGFR遺伝子変異(exon 19del、L858R)は腺癌において有意に高頻度で、TOP01、TUBB3、ERCC1に関しては両群に差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed LCNEC gene expression, gene mutation and immunohistochemical expression of known molecular targets and compared expression to that of lung adenocarcinomas. We analyzed 26 patients with primary LCNEC and 40 patients with adenocarcinoma (AC). We evaluated immunohistochemical (IHC) expression for topoisomerase I, II (TOP01, 2), excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), class III beta tubulin (TUBB3) and EGFR mutation (L858R) and gene mutation for EGFR using direct DNA sequencing and Scorpion-ARMS. There was a significant difference in IHC expression for TOP02 and EGFR between LCNEC and AC. EGFR gene mutation was greater in the AC group, with no EGFR mutation in the LCNEC group. On the IHC expression of TOP01, ERCC1, and TUBB3, there were no significant differences between LCNEC and AC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺癌 個別化 予後 システムの構築

1. 研究開始当初の背景

肺癌は現在本邦における死亡率第一位の悪性腫瘍であり、女性喫煙者の増加や、女性の肺癌患者の増加とともに今後も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、術前に早期肺癌と診断し、根治的手術を施行した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単純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が一因であると考えている。例えば肺癌に対する薬剤感受性に関しては、Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)であるgefitinib(イレッサ)が、東洋人、女性、腺癌、非喫煙者に有効であり(J Clin Oncol 2003,21,2237-2246, JAMA2003, 290,2149-2158)、さらにEGFR のexon 19,21における変異やEGFR 遺伝子増幅がその反応性と関連している可能性が報告され(N Engl J Med 2004,350,2129-2139, J Natl Cancer Inst 2005,97,643-655)、また、小細胞癌に対してCDDP+CPT-11 が日本人に有効であるのに対して(N Engl J Med 2002;346:85-91)、海外の試験では有意差が認められなかったことは(J Clin Oncol 2006;24:2038-2043, ASCO 2008 abs#7512)、治療に対する反応性が、人種、性別、組織型、さらに遺伝子型などによって違うことを証明することとなった。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ためには、単に、小細胞癌、非小細胞癌という単純な枠組みでなく、分子生物学的手法を用いた新しい診断基準に基づくアプローチが必要である。

このような背景のもと、われわれは、以前の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)、基盤研究(C)19591610(平成19年度 - 平成20年度)、基盤研究(C) 21591822(平成21年度 - 平成23年度)において肺癌の外科切除標本(原発巣)を対象とした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収得した。その後、患者の経過を丹念に追跡し、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腺癌、腺癌と大細胞神経内分泌癌、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

では異なった発現パターンを示すことである。

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抽出した(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病理診断と併用した場合には、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、論文として報告した(Lung Cancer 2009;64:86-91)。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(Ann Thorac Surg 2001;71:1772-1778)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。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、これらにゲノム医学の手法を加えることにより、分子生物学的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、術前や、術後早期に悪性度の高い肺癌と予測される場合には手術単独ではなく、術後に全身化学療法などを併用した集学的治療を行うことによって予後の改善を図り、一方、悪性度の低い肺癌と考えられる場合に

は低浸襲の治療を行い、早期回復を図ることによって高危険群においても術後合併症を予防できる可能性があり、肺癌治療の選択肢を広げることができる。このように、肺癌治療にゲノム医学の手法を加えることで、肺癌に対する画一的な治療の枠を超えて、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。

2. 研究の目的

EML4-ALK 陽性肺癌に対するALK 阻害剤の有効性やEpidermal Growth Factor Receptor(EGFR)遺伝子のExon19もしくは21変異陽性肺癌に対するEGFR-Tyrosine kinase inhibitor(EGFR-TKI)の高感受性は、現在の小細胞癌/非小細胞癌という枠組みを越え、病理診断に加えて分子生物学的特徴に基づいた個別化医療の必要性を示唆している。われわれは、基盤研究(C) 21591822「肺癌個別化医療を目指した肺癌再発予測診断システムの構築」という課題から継続し、さらに研究を進展させ、肺癌の予後予測診断システムの構築を目指して肺癌再発、転移の分子メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1)検体の採取

倫理指針に則って研究に関する申請書を東邦大学医学部倫理委員会へ提出し、審査を受けすでに承認済みである(課題名:テーラーメイド医療を目指した原発性肺癌に対する遺伝子解析、平成25年11月21日課題番号2509525047)。説明同意文書も整っている。肺癌と診断され、治療目的に東邦大学医療センター大森病院呼吸器センター外科に入院となり同意を得られた患者を対象とし、以下に示す手順にて治療を行い検体を採取した。

術前に研究に関する説明を行い、同意を得る。同意書に署名があることを確認する。過去の症例に関しては、研究参加を拒否する機会を持つため、ポスター掲示を行い、研究参加に対する拒否の意思表示がない場合には対象とした。

病理組織学的検索とDNA抽出のため、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を作成した。

免疫染色を施行するため、アルブミンコーティングのスライド上に標本を作製した。免疫染色のための各抗体に対してpositive controlを設定し、前処置の有無、抗体希釈倍率の設定を変更し、条件設定を行った。

(2)肺神経内分泌系分化を示す腫瘍の病理学的検討

東邦大学医療センター大森病院に蓄積された肺癌手術症例から肺神経内分泌腫瘍を収集し、病理組織学的検討を行った。対象症例は大細胞神経内分泌癌とし、比較対象として肺腺癌を設定した。選別された症例の病歴から年齢、性別、喫煙、腫瘍部位、術前腫瘍マーカー、術前画像診断におけるpositron emission tomography(PET)のstandardized uptake value(SUV)値、臨床病期、術式、術後補助療法の有無、再発の有無や予後などについて検索した。

(3)既知の癌関連性遺伝子との関連および化学療法と関連のあるバイオマーカー発現の検討

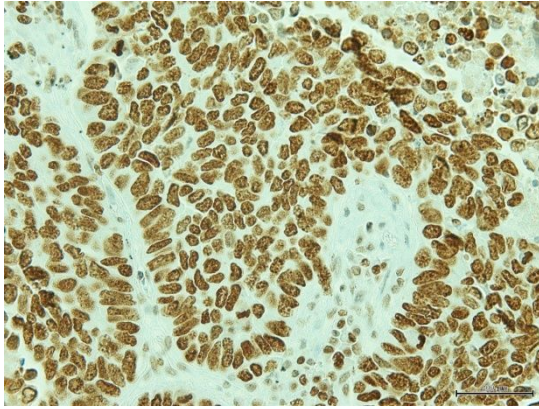
採取した組織検体に対して、以下の方法を用いて検討した。epidermal growth factor receptor(EGFR) exon 18-21における変異をDirect Sequence法・Scorpion ARMS法などを用いて検出を行った。また、採取した組織検体に対して、免疫染色による個々の化学療法の標的マーカーの蛋白発現を解析した。対象として、topoisomerase I, II(TOPO1, 2)、excision repair cross-complementing gene 1(ERCC1)、class III beta tubulin(TUBB3)、EGFRが挙げられる。これらの発現率をLCNECと肺腺癌で比較検討した。

4. 研究成果

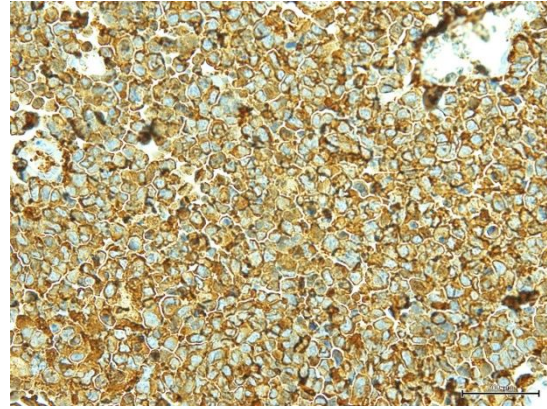
免疫染色によって化学療法に対する標的マーカーの発現率についてそれぞれ検討した。

- (1) TOPO1の発現(図1)は大細胞神経内分泌癌、腺癌ともに高頻度であり有意差を認めなかった。
- (2) TOPO2の発現(図2)が腺癌と比べて有意に高頻度であった。
- (3) ERCC1の発現(図3)は大細胞神経内分泌癌、腺癌ともに低頻度であった。
- (4) TUBB3の発現(図4)では大細胞神経内分泌癌と腺癌の間に有意差を認めなかった。
- (5) EGFR遺伝子変異(L858R)の発現(図5)は大細胞神経内分泌癌に比べ腺癌において有意に高頻度で、大細胞神経内分泌癌では明らかな発現は認められなかった。

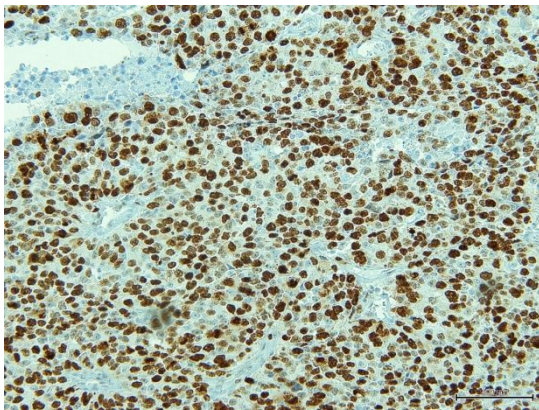
またDirect Sequence法もしくはScorpion ARMS法によるEGFR遺伝子変異は同様に、大細胞神経内分泌癌に比べて腺癌において有意に高頻度で、大細胞神経内分泌癌では明らかな変異は認められなかった。以上のことから、肺癌においては組織型別にmolecular markerの発現、変異に違いがあるため、化学療法および分子標的治療薬の選択には組織型に配慮する必要があると考えられた。



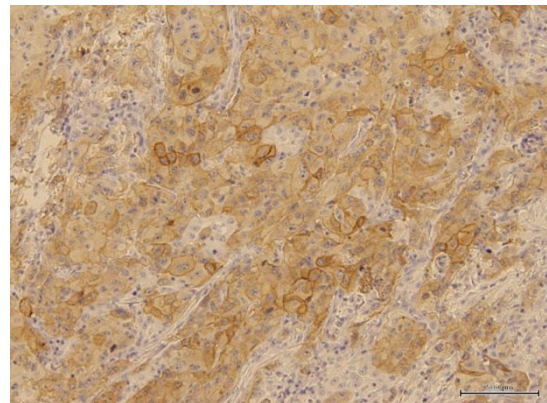
(図 1) LCNEC における TOPO1 発現



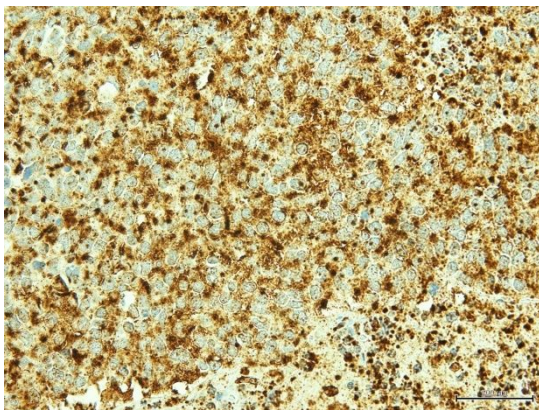
(図 4) LCNEC における TUBB3 発現



(図 2) LCNEC における TOPO2 発現



(図 5) 肺腺癌における EGFR 遺伝子変異 (L858R) の発現



(図 3) LCNEC における ERCC1 発現

さらに「Iyoda A, Jiang SX, et al. Clinicopathological features and the impact of the new TNM classification of malignant tumors in patients with pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology* 2013;1:437-443」に北里大学における肺大細胞神経内分泌癌の臨床病理学的特徴を発表、「Iyoda A, Makino T, et al. Treatments options for patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2014;62:351-356」に肺大細胞神経内分泌癌に対する治療方法に関する調査結果を review article としてまとめ、加えて付随研究として「Koezuka S, Hata Y, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumor in the anterior mediastinum, report of a case. *Molecular and Clinical Oncology* 2014;2:987-990」で MPNST の症例報告、「Koezuka S, Hata Y, et al. Metachronous second primary lung cancer surgically treated five years or more after the initial surgery. *Molecular and Clinical Oncology* in press」において異時性肺重複癌に対する

retrospective study の研究結果を報告し、いずれも acknowledgement に本研究によるサポートを受けた旨を記載した。

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)

Koezuka S, Hata Y, Otsuka H, Makino T, Tochigi N, Shibuya K, Iyoda A. Metachronous second primary lung cancer surgically treated five years or more after the initial surgery. Molecular and Clinical Oncology. 査読有, in press,2015

<http://www.spandidos-publications.com/mco>

Iyoda A, Makino T, Koezuka S, Otsuka H, Hata Y. Treatments options for patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. General Thoracic and Cardiovascular Surgery. 査読有, 62:351-356,2014.

DOI:10.1007/s11748-014-0379-9

Koezuka S, Hata Y, Sato F, Makino T, Otsuka H, Tochigi N, Mitsuda A, Shibuya K, Takagi K, Iyoda A. Malignant peripheral nerve sheath tumor in the anterior mediastinum, report of a case. Molecular and Clinical Oncology. 査読有, 2:987-990,2014.

DOI:10.3892/mco.2014.343

Iyoda A, Jiang SX, Travis WD, Kurouzu N, Ogawa F, Amano H, Sato Y, Rusch VW, Saegusa M, Satoh Y. Clinicopathological features and the impact of the new TNM classification of malignant tumors in patients with pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Molecular and Clinical Oncology. 査読有, 1:437-443,2013. DOI:10.3892/mco.2013.80

[学会発表](計7件)

牧野崇、秦美暢、佐藤史朋、大塚創、肥塚智、田巻一義、笹本修一、磯部和順、栃木直文、渋谷和俊、伊豫田明：肺高悪性度神経内分泌癌の術後再発の検討。第31回日本呼吸器外科学会総会、ホテル日航東京(東京都港区)、2014/5/29

牧野崇、秦美暢、大塚創、佐藤史朋、肥塚智、田巻一義、笹本修一、磯部和順、栃木直文、渋谷和俊、伊豫田明：肺大細胞神経内分泌癌手術例の臨床病理学的検討。第114回日本外科学会定期学術集会、国立京都国際会館(京都府京都市)、2014/4/4

伊豫田明、肥塚智、牧野崇、大塚創、佐藤史朋、田巻一義、秦美暢、栃木直文、三上哲夫、渋谷和俊：肺の高悪性度神経内分泌腫瘍をめぐる諸問題 - 細胞診と外科治療の接点。第52回日本臨床細胞学会秋期大会、大阪国際会議場(大阪府大阪市)、2013/11/3

Akira Iyoda, Satoshi Koezuka, Takashi Makino, Hajime Otsuka, Fumitomo Sato, Kazuyoshi Tamaki, Yoshinobu Hata, Naobumi Tochigi, Kazutoshi Shibuya, Tetuo Mikami, Kazutoshi Isobe, Sakae Homma :

Bronchopulmonary carcinoids. 15th World Conference on Lung Cancer(招待講演), Sydney, Australia, 2013/10/28

伊豫田明、内藤雅仁、石井大、山崎宏継、中島裕康、小川史洋、松井啓夫、塩見和、原英則、佐藤之俊：冠動脈疾患を有する肺癌手術症例の検討。第65回日本胸部外科学会定期学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2012/10/18

伊豫田明、石井大、山崎宏継、中島裕康、小川史洋、松井啓夫、塩見和、原英則、久朗津尚美、佐藤之俊：循環器合併症を有する肺癌手術症例の術後合併症に関する検討。第29回日本呼吸器外科学会総会、秋田キャッスルホテル(秋田県秋田市)、2012/5/18

伊豫田明、石井大、山崎宏継、中島裕康、小川史洋、松井啓夫、塩見和、久朗津尚、原英則、佐藤之俊：併存疾患を有する肺癌手術症例における術後合併症に関する検討。第112回日本外科学会定期学術集会、幕張メッセ(千葉県千葉市)、2012/4/14

[その他]

東邦大学医療センター大森病院・呼吸器外科ホームページ

www.lab.toho-u.ac.jp/med/omori/respi_surgery/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊豫田 明 (IYODA, Akira)
東邦大学・医学部・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

秦 美暢 (HATA, Yoshinobu)
東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：90349910

田巻 一義 (TAMAKI, Kazuyoshi)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：80385799

佐藤 史朋 (SATO, Fumitomo)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：30385736

大塚 創 (OTSUKA, Hajime)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：70408855

牧野 崇 (MAKINO, Takashi)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：30459797

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし