

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461896

研究課題名(和文)肺癌個別最適化医療に資するバイオマーカーと標準的放射線療法の確立に関する臨床的研究

研究課題名(英文)Clinical research for the development of predictive biomarker useful for individualized radiotherapy in the treatment of lung cancer

研究代表者

早川 和重 (Hayakawa, Kazushige)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70114189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌のmicropapillary成分(MPC)の有無とvimentin発現をみると、MPC腺癌は低分化腺癌と同等の予後で、両者ともvimentin高発現が認められ、vimentin発現は予後因子となる結果がえられた。切除不能局所進行肺癌でシスプラチン併用の化学放射線療法が施行された症例のEGFR遺伝子変異の有無が治療結果に及ぼす影響をみると、局所進行非小細胞肺癌のEGFR遺伝子変異群の化学放射線療法では早期の遠隔再発を抑える治療手段が必要であると考えられた。また、EGFR高発現は扁平上皮癌に多く、抗EGFR抗体は放射線増感作用を有することが示唆され、扁平上皮癌で有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In adenocarcinoma of the lung, vimentin expression is prevalent and markedly up-regulated in micropapillary component (MPC), which might reflect the biological essence of poorer differentiation or dedifferentiation of MPC, and this might have a role in the acquisition and increase of invasiveness and consequent more malignant nature of MPC. In the 64 patients with stage III non-small cell lung cancer (NSCLC), the progression-free survival (PFS) was significantly shorter, and the overall survival (OS) was longer (6.3 vs. 9.5 months, $p < .001$, PFS, 37.1 vs. 21.1 months, $p = 0.26$, OS). Distant metastasis happened more frequently in the mutant EGFR than in the wild-type EGFR. In 39 patients received concurrent chemoradiotherapy with a humanized IgG1 monoclonal anti-EGFR antibody (nimotuzumab), the PFS was significantly better for patients with Sq than for those with Non-Sq. The low in field relapse rates may be attributed to the radio-sensitizing effect of anti-EGFR antibody.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：肺癌 放射線治療 バイオマーカー 効果予測 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

肺癌はわが国のがん死因の第一位であり、肺癌罹患率はさらに増加することが予想されている。また、高齢者肺癌の増加とともに、心肺機能の低下や他の合併症のために手術不能の早期癌症例の増加も予測される。また、局所進行癌に対する化学放射線療法の至適治療法については未だ研究段階である。とくに肺癌では個々の腫瘍の生物学的特性に大きな差が認められ、腫瘍の特徴に応じた最適な治療法の選択 (precision medicine) が重要である。また、高齢者では、通常の化学療法が不可能な場合が多く、分子標的薬や全身状態をも考慮した治療の個別化(テイラーメイド治療)も必要である。

2. 研究の目的

(1) 肺腺癌の中で micropapillary component を有する腺癌(AC-MPC)の悪性度が高い要因を検討した。

(2) 局所進行非小細胞肺癌における EGFR 遺伝子変異の有無が化学放射線療法の治療効果に及ぼす影響について検討した。

(3) 局所進行非小細胞肺癌に対する化学放射線療法と抗 EGFR 抗体との併用療法(第 II 相試験)の長期治療成績と病理組織標本上の EGFR 発現/変異の程度との相関について検討した。

3. 研究の方法

(1) 北里大学病院で 2002 年～2012 年の間に治癒切除された肺腺癌 629 例を対象として、組織の review を行い、Fibrovascular core を伴わない小腺管状構造を有する AC-MPC と、その他の腺癌(CAC)に分類した。さらに CAC を高文化型(WD-CAC)、中文化型(MD-CAC)、低文化型(PD-CAC)に分類した。

AC-MPC 群と CAC 群の 2 群間で臨床病理学的因子解析を 2 検定で行い、全生存率、無再発生存率を Kaplan-Meier 法で算出し、Cox 比例ハザードモデルで多変量解析した。

2006 年から採取・保管された新鮮凍結組織から AC-MPC と CAC 検体を用いて 2 次元電気泳動を行い、発現量の異なる蛋白質を同定した。同定された蛋白質について、WD-CAC、MD-CAC、PD-CAC、AC-MPC について免疫染色を行い、発現強度、発現部位の評価を行った。免疫染色の結果は scoring し、Spearman の順位相関検定および one way ANOVA Dunnett's post hoc test を用いて解析した。

(2) 切除不能局所進行非小細胞肺癌で 2007 年～2013 年にシスプラチン併用の化学放射線療法が施行され、EGFR 遺伝子変異の有無が評価された患者 64 例を対象とした。対象患者 64 例の内訳は、男性 48 例、女性 16 例、非喫煙者 14 例、喫煙者(履歴も含む)50 例、IIIA 期 29 例、IIIB 期 35 例であった。再発率、再発形式の解析は 2 検定を用いた。EGFR 遺伝子変異に基づく全生存期間(OS)、無増悪生存

期間(PFS)、再発後生存期間(PPS)は Kaplan-Meier 曲線で算出し、Cox 比例ハザードモデルを用いて検討した。

(3) 試験治療は胸部放射線治療 60Gy/30 回にシスプラチン 80mg/m²+ピノレルピン 20mg/m² と抗 EGFR 抗体 Nimotuzumab 200mg/週を同時併用した。本試験に同意された評価可能 39 例を対象とした。内訳は、年齢中央値 62 歳(31～73 歳)、男女比 34/5、IIIA 期 21 例、IIIB 期 18 例、PS0/1 が 25/14 であった。

4. 研究成果

(1) 2 次元電気泳動による proteomics 解析では 19 個の蛋白質が CAC に比べて 1.5 倍高く、とくに vimentin は AC-MPC で 3.5 倍の発現が認められた。

AC-MPC の 101 例と CAC の 119 例での病理組織標本の免疫染色を用いた判定量解析の結果では、Vimentin の発現は AC-MPC 例の 95 例(94.1%)で認められ、WD-CAC 例で 11/41(27.5%)、MD-CAC 例で 30/41(73.2%)、PD-CAC 例で 37/37(100%)に認められた。Vimentin の発現程度のスコア化による評価では、WD-CAC: 0.6±1.2、MD-CAC: 1.9±1.7、PD-CAC: 3.8±2.7、MPC: 4.0±2.1、BG-NMPC(MPC の背景上皮細胞): 2.3±1.9 であり、WD-CAC、MD-CAC、BG-CAC と MPC との間に有意な発現の差が認められた(p<0.001)。AC-MPC と PD-CAC との間には有意差は認められなかった(p=0.561)(図 1)。AC-MPC の中で Vimentin の高発現は血管浸潤とリンパ節転移の進行度とよく相関していた(p<0.02)。多変量解析でも Vimentin の高発現とリンパ節転移の進行度は予後に影響する独立因子であった(p<0.048)。

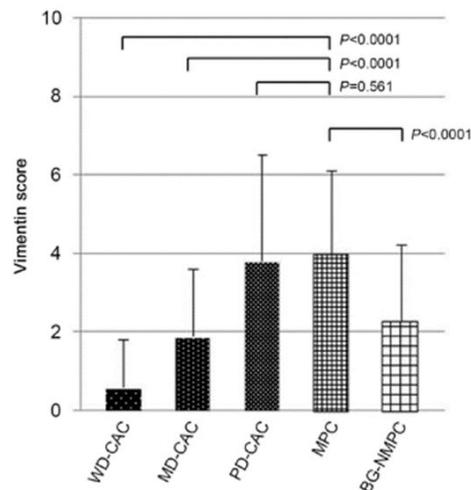


図 1 通常腺癌 119 例と MPC 101 例の Vimentin 発現スコア。error bar は標準偏差。

臨床的に腫瘍径 3cm 以上の AC-MPC 例と CAC 例を比較すると、MPC 例では血管浸潤、胸膜浸潤、リンパ節転移の頻度が有意に高かった(p<0.0001)。また、AC-MPC の 101 例と CAC の 528 例の経過観察期間、5 年生存率、無再発生存率は、それぞれ 38.1 か月(4.5～123.8

月), 66.1%, 31.1%と45.7か月(3.1~136.2月), 89.3%, 76.8であり, AC-MPCの予後が有意に不良であった($P < 0.0001$)。分化度との比較では, AC-MPCの予後はWD-CAC, MD-CACと比べて有意に不良であった($p < 0.0002$)が, PD-CACとの間には有意差は認められなかった($p = 0.5259$)。

以上から Vimentin の発現がバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

(2) EGFR 遺伝子変異陽性(陽性群)は15例(23%)であった。全体の治療奏功割合は73.4%であり, 変異別では, 陽性群 66.7%, 陰性群 75.5%であった(有意差なし)。観察期間中央値は27.4か月であり, 観察期間中の再発率は陽性群 100%, 陰性群 89%であった。遠隔再発は, 陽性群 14/15, 陰性群 29/49であり, 変異群で有意に高率であった($p < 0.01$)。予後解析では, 変異陽性群の生存期間は陰性群に比し有意に短かった(陽性群 6.3か月, 陰性群 9.5か月, $p < 0.001$)。一方, OSは陽性群の方が長い傾向にあった(中央値: 陽性群 37.1か月, 陰性群 21.1か月, $p = 0.26$)。再発例では, PPSは陽性群で優位に長かった(中央値: 陽性群 29.9か月, 陰性群 11.2か月, $p = 0.015$)。多変量解析ではEGFR 遺伝子変異陽性は, PFSの独立した予後不良因子であった(HR 3.23; 95%CI 1.51-6.88; $p < 0.01$)。PPSでは逆に陽性群の予後が良好の傾向が示された(HR 0.41; 95%CI 0.16-1.03, $p = 0.06$)。

以上から局所進行非小細胞肺癌のEGFR 遺伝子変異群の化学放射線療法では早期の遠隔再発を抑える治療手段(初期治療の強化)が必要であると考えられた。

(3) 全体の3年5年生存率は66.4% 58.4%と良好で, grade 3以上の非血液毒性は認められなかった。PFS期間中央値は16.9か月, 組織型別では, 扁平上皮癌($n = 16$)が50%, 非扁平上皮癌($n = 23$)が13.7%と扁平上皮癌で良好であった。初回再発形式では, 局所再発率は扁平上皮癌 4/16(25%), 非扁平上皮癌 3/23(13%)といずれも低率であった。しかし, 遠隔再発率は非扁平上皮癌が16/23(70%)で, 扁平上皮癌の4/16(25%)に比べて有意に高かった($p < 0.05$)。EGFR IHC/FISH法を用いたEGFR 蛋白/変異の割合を20例について調べたところ, EGFR2+/3+発現は扁平上皮癌が8/10, 非扁平上皮癌は4/10であった。EGFR 変異は非扁平上皮癌の2例のみであった。以上の結果から抗EGFR抗体は放射線増感作用を有することが示唆され, EGFRの発現率が扁平上皮癌で有用である可能性が示された。

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 3件)

Ishihara M, Igawa S, Sasaki J, Otani S, Katagiri M, Soda I, Ishiyama H,

Hayakawa K, Masuda N: Evaluation of concurrent chemoradiotherapy for locally advanced NSCLC according to the EGFR mutation status. *Oncol Lett*, in press. 査読有

Katoh N, Soda I, Tamamura H, Takahashi S, Uchinami Y, Ishiyama H, Ota K, Inoue T, Onimaru R, Shibuya K, Hayakawa K, Shirato H: Clinical outcomes of stage I and IIA nonsmall cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiotherapy using a realtime tumor-tracking radiotherapy system. *Radiation Oncology* (2017) 12:3. DOI 10.1186/s13014-016-0742-3. 査読有
Nakashima H, Jiang SX, Sato Y, Hoshi K, Matsumoto T, Nagashio R, Kobayashi M, Matsuo Y, Shiomi K, Hayakawa K, Saegusa M, Satoh Y: Prevalent and up-regulated vimentin expression in micropapillary components of lung adenocarcinomas and its adverse prognostic significance. *Pathol Int*. 2015;65(4):183-92. DOI: 10.1111/pin.12257. 査読有

[学会発表](計 5件)

Hayakawa K, Nishimura Y, Harada H, Soejima T, Tsujino K, Kozuka T, Tanaka M, Sasaki T, Yamamoto N, Nakagawa K: Phase II study of nimotuzumab in combination with concurrent chemoradiotherapy (CRT) in patients with locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): five-year follow-up results. IASLC 17th World Conference on Lung Cancer, Dec. 4-7, 2016, Vienna, Austria.

Hayakawa K: Combined use of molecular targeting drugs in radiation therapy for locally advanced non-small cell lung cancer (Symposium). 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto, Japan, May 26, 2015.

蔣世旭, 中島裕康, 梅沢敦子, 長塩亮, 佐藤雄一, 一戸昌明, 早川和重, 佐藤之俊, 村雲芳樹: Microdissection に基づいたDNAマイクロアレイによる肺腺癌微小乳頭成分遺伝子発現の解析. 第104回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2015.4.30.

竹中浩二, 早田格, 関口茜衣, 川上正悟, 小森承子, 石山博條, 早川和重: 肺癌の定位放射線治療後の再発症例の画像所見: CT冠状断像による評価. 日本放射線腫瘍学会第27回学術大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014.12.12.

蔣世旭, 梅沢敦子, 岡安勲, 村雲芳樹, 佐藤雄一, 三上哲夫, 桑尾定仁, 早川和重, 佐藤之俊: 肺癌における変異型EGFR

を特異的に認識する抗体の感度・特異性の検討．第 103 回日本病理学会総会，広島国際会議場(広島県広島市)，2014.4.24 .

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

早川 和重 (HAYAKAWA, Kazushige)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：7 0 1 1 4 1 8 9

(2) 研究分担者

三藤 久 (MITSUFUJI, Hisashi)
北里大学・看護学部・准教授
研究者番号：4 0 2 6 0 8 5 6

蒋 世旭 (JIANG, Shi-Xu)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：7 0 2 7 6 1 5 3

(3) 連携研究者

益田 典幸 (MASUDA, Noriyuki)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：7 0 1 4 5 4 6 5

(4) 研究協力者

()