

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591652  
 研究課題名（和文） 遺伝子変異を指標とした肺癌の高感度播種およびリンパ節転移検知システムの構築  
 研究課題名（英文） Development of a sensitive detection system of pleural dissemination and nodal metastases in lung cancer  
 研究代表者  
 多久和 輝尚 (TAKUWA TERUHISA)  
 兵庫医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00412049

研究成果の概要：肺癌では手術で完全に病巣を取り除いても、顕微鏡で見つけることの出来ないような微小な癌病巣が体に残ることが多く、手術後の再発そして死亡につながる。今回の研究では、癌を切除したあとの胸の中(胸腔やリンパ節など)に小さな病巣が残っているかどうかを、遺伝子解析の手法を用いて検討した。その結果、遺伝子解析を用いても現在の顕微鏡レベルでの検査以上の高感度な癌病巣の検出は困難であることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：呼吸器外科学、肺癌、遺伝子変異、胸膜播種、リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) (原発性)肺癌は極めて予後不良の悪性腫瘍であり、手術で完全切除を施行しても半数の症例では手術後に再発を認める。再発の原因は、手術前や手術時に臨床的に検出できなかった腫瘍細胞の遺残であり、このような微小病巣を高感度に検出するシステムが構築できれば、肺癌の診断と治療に大きく貢献することが期待される。
- (2) 肺癌のおよそ半数には EGFR/K-ras/p53 のいずれかの遺伝子変異が認められる。遺

伝子の検出は、癌細胞の顕微鏡的検出よりも高感度であるので、癌病巣を認めなくても、変異遺伝子の存在を検出することで、癌細胞の進展(播種・リンパ節転移や遠隔転移等)を高感度に検出可能となりうる。

(3) これまでの我々を含めた国内外の研究により、明らかな遠隔転移を有しない肺癌患者の血液中に肺癌の原発巣に認められた変異遺伝子が検出されることが示されている。そこで遺伝子変異を指標とした微小遠隔転移の検出に関する研究が多数

行われている。しかしながら胸膜播種やリンパ節転移については、遺伝子変異を指標とした微小病巣の検出は殆ど報告が見られなかった。

## 2. 研究の目的

- (1) (原発性)肺癌における、胸水(または胸腔内洗浄水)・原発巣から離れた同一肺葉内正常肺部分およびリンパ節、におけるEGFR/K-ras/p53 遺伝子変異の検出頻度。
- (2) 上記遺伝子変異検出感度の向上。
- (3) 上記遺伝子変異と病理学的な腫瘍細胞の存在証明(細胞診や組織診断)との比較検討、および早期再発との関連検討による、遺伝子変異を指標とした微小病巣の高感度診断法の妥当性の検討。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体採取：

- ①(原発性)肺癌患者の手術(区域切除以上)時に、胸水を採取する。胸水を認めない患者では、胸腔内を生理食塩水100mLで洗浄し胸腔内洗浄液を回収し検体とする。
- ②切除肺から、原発巣および原発巣から最も離れた正常肺部分を切り出し、それぞれ検体とする。
- ③郭清したリンパ節を検体とする。

### (2) 遺伝子抽出と遺伝子変異解析：

- ①上記①～③で採取した検体から遺伝子(ゲノム DNA)を抽出し、EGFR 遺伝子(エクソン 18-22)・K-ras 遺伝子(コドン 12)および p53 遺伝子(エクソン 5-8)を、PCRにより増幅する。
- ②増幅された PCR フラグメントの変異の有無を、ダイレクトシーケンス法・SSCP 法および WAVE 法により解析する。各方法による原発巣での遺伝子変異の検出感度を比較し、SSCP 法と WAVE 法については解析条件の改善を図る。

### (3) 遺伝子変異を指標とした高感度診断法の有用性と妥当性の検討：

- ①原発巣で検出された遺伝子変異が、各検体(胸水または洗浄水、正常肺、リンパ節)で検出される頻度の評価、また病理学的腫瘍細胞存在(播種、肺内転移、リンパ節転移)との比較検討
- ②上記①で検討した遺伝子異常を指標とした診断法および病理学的診断法と、早期再発との関連(臨床的妥当性の検討)

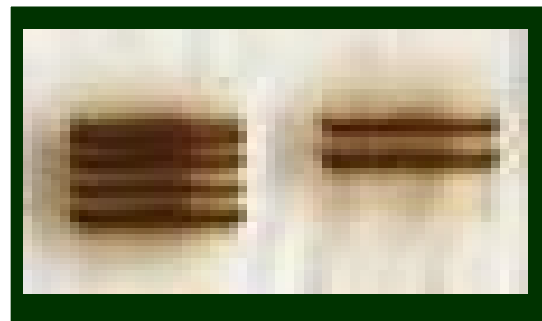
## 4. 研究成果

### (1) 原発性肺癌での遺伝子変異：

- ①(原発性)肺癌患者 246 例の原発巣にお

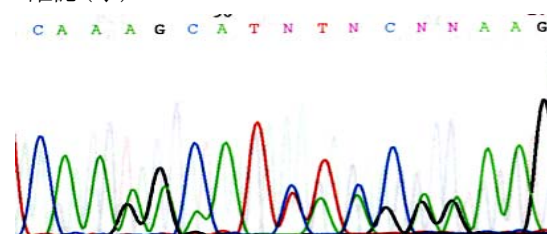
ける遺伝子変異を検索した。その結果、EGFR 遺伝子変異は 53 例(22.7%)に認められ、その大部分はエクソン 19 または 22 に変異を認め、組織型では腺癌が大部分を占めた。K-ras 遺伝子変異は 4 例(1.6%、すべて腺癌)に認められ、EGFR と K-ras 遺伝子変異を同時に認めた症例は無かった。また、p53 遺伝子変異例のほぼ半数は、EGFR 遺伝子変異や K-ras 遺伝子変異と重複して認めた。

②以上の結果はこれまでの原発性肺癌における遺伝子異常の報告と同様の結果であった。また、ダイレクトシーケンス法や WAVE 法と比較して SSCP 法は最も遺伝子変異検出感度にすぐれていることを確認した。下に SSCP 法で検出した EGFR 遺伝子変異の例を示すが、本例ではわずかに数個の腫瘍細胞(循環腫瘍細胞)から遺伝子変異が検出しえた。



SSCP 法(↑)：左レーンが変異遺伝子

ダイレクトシーケンス法による変異の確認(↓)



以上の結果に基づいて以降の検討は、腺癌症例のみを対象として行い、遺伝子変異解析は SSCP 法を用いて行なう(変異の確認は SSCP 法による異常バンドを切り出して、ダイレクトシーケンス法で確認することとした)。

③また、SSCP 法を用いて腺癌(AD)や関連病変(BAC:肺胞上皮癌・AAH:異型性腺腫様過形成)多発症例 21 例の遺伝子変異を検討する(下表)と、顕微鏡的には同一(つまり肺内転移)と診断された病変の中に異なる遺伝子変異パターンが 2 例で検出され、遺伝子変異が指標とした肺転移と重複癌の鑑別の有用性が示された。

case	lesions		
	AD	BAC	AAH
Case 1	●		
Case 2	● ● #		
Case 3	★ ★		
Case 4	● ● ●		
Case 5	● ●		
Case 6	● ● ●		
Case 7	●	●	●
Case 8	●	●	
Case 9	●	● ●	
Case 10	●	●	
Case 11	●	●	
Case 12	●	●	
Case 13	●	●	
Case 14	●		●
Case 15	●		●
Case 16	●		●
Case 17	●		●
Case 18		● ●	●
Case 19		●	●
Case 20			● ● ●
Case 21		● ●	

Abbreviations:  
AD, adenocarcinoma; BAC, bronchioloalveolar carcinoma; AAH, atypical adenomatous hyperplasia, #, mediastinal LN (#7)

凡例：黄色○＝EGFR エクソン 21 変異  
赤色○＝EGFR エクソン 19 変異  
青色☆＝K-ras 変異  
青色○＝EGFR/K-ras/p53 変異無し

(2) 遺伝子変異を指標とした胸膜播種の高感度診断：

- ①原発巣に EGFR/K-ras 変異を認め、術中に胸水または胸腔洗浄液を採取しえた 25 例を対象とした。
- ②25 例の中で細胞診で悪性細胞陽性と診断された症例は 3 例 (12.0%) で、いずれも原発巣に認めた EGFR 遺伝子変異を胸水 (または洗浄液) にも検出した。一方、細胞診が陰性であった残りの 22 例においては、胸水 (または洗浄液) 中に EGFR/K-ras 遺伝子変異を認めなかった。
- ③胸水 (または洗浄液) 中細胞診陽性であった 3 例 (遺伝子変異も陽性) は、いずれも術後 2 年以内に局所再発しており、胸水または洗浄細胞診は術後再発の予測因子として重要であるが、これに遺伝子変異解析を追加する意義は認められなかった。

(3) 遺伝子変異を指標としたリンパ節転移の高感度診断：

上記 (2) と同様に、リンパ節転移に関しても病理学的な転移有無と遺伝子変異の検出を比較したが、遺伝子変異に基づいた微小転移の検出は出来なかった。すなわち病理学的リンパ節転移が最も重

要な予後予測因子であった。

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 10 件)

- ① Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto M, Takuwa T, Kondo N, Hasegawa S, Circulating tumor cells in pulmonary blood of primary lung cancer patients, Ann Thorac Surg, 87 巻, 1669-1675 頁, 2009 年, 査読有り
- ② Matsumoto S, Tanaka F, Sato K, Kimura S, Maekawa T, Hasegawa S, Wada H, Monitoring with a non-invasive bioluminescent in vivo imaging system of pleural metastasis of lung carcinoma, Lung cancer, (Web 上で公開), 2009 年, 査読有り
- ③ Iwakiri S, Nagai S, Katakura K, Date H, Wada H, Tanaka F, D2-40-positive lymphatic vessel density is a poor prognostic factor in squamous cell carcinoma of the lung, Ann Thorac Surg, 16 巻, 1678-1685 頁, 2009 年, 査読有り
- ④ 田中文啓, 長谷川誠紀, 肺癌オーダーメイド治療の現況と今後の展望：バイオマーカーに基づいた肺癌化学療法の個別化、外科治療, 100 巻, 235-241 頁, 2009 年, 査読無し
- ⑤ 田中文啓, 肺がん分子標的治療・その後の展開：肺がんのアジュバント治療と分子標的、がん分子標的治療, 5 巻, 195-205 頁, 2008 年, 査読無し
- ⑥ 多久和輝尚, 松本成司, 奥村好邦, 田中文啓, 長谷川誠紀, COPD を合併した肺癌症例に対する肺葉切除術：チオトロピウム吸入の有用性, Therapeutic Research, 29 巻, 69-72 頁, 2008 年, 査読有り
- ⑦ Nagai S, Takenaka K, Sonobe M, Wada H, Tanaka F, Schedule-dependent synergistic effect of pemetrexed combined with gemcitabine against malignant pleural mesothelioma and non-small cell lung cancer cell lines, Chemotherapy, 54 巻, 166-175 頁, 2008 年, 査読有り
- ⑧ Ogawa E, Takenaka K, Katakura H, Adachi M, Otake Y, Toda Y, Kotani H, Manabe T, Wada H, Tanaka F, Perimembrane Aurora-A expression is a significant prognostic factor in correlation with proliferative activity in non-small-cell lung cancer (NSCLC), Ann Surg Oncol, 15 巻, 547-554 頁, 2007

年、査読有り

- ⑨ Mino N, Takenaka K, Sonobe M, Miyahara R, Yanagihara K, Otake Y, Wada H, Tanaka F, Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and its prognostic significance in resected non-small cell lung cancer, J Surg Oncol, 95 巻、250-257 頁、2007 年、査読有り
- ⑩ Sonobe M, Nakagawa M, Takenaka K, Katakura H, Adachi M, Yanagihara K, Otake Y, Wada H, Tanaka F, Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations on the expression of EGFR, phosphoryl-Akt, and phosphoryl-MAPK, and on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer, J Surg Oncol, 95 巻、63-69 頁、2007 年、査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① Tanaka F, Circulating tumor cell in peripheral blood (CTC) and pulmonary venous blood of patients with resected primary lung cancer, 45th annual meeting of the Society of Thoracic Surgeons (STS), 2009 年 1 月 26 日、サンフランシスコ市(アメリカ合衆国)
- ② 多久和輝尚, 腺癌関連病変同時多発例の遺伝子学的検討、日本肺癌学会総会、2008 年 11 月 14 日、小倉市
- ③ 田中文啓, 各科領域における術後補助化学療法の現状: 非小細胞肺癌における術後補助化学療法、第 46 回日本癌治療学会総会、2008 年 11 月 1 日、名古屋市
- ④ Tanaka F, Clinicopathological features in correlation with epidermal growth factor receptor mutation in non-small cell lung cancer (NSCLC), 43rd Annual Meeting of The American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2007 年 6 月 2 日、シカゴ市(アメリカ合衆国)
- ⑤ Takuwa T, EGFR/K-ras mutations in adenocarcinoma and atypical adenomatous hyperplasia (AAH), 43rd Annual Meeting of The American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2007 年 6 月 2 日、シカゴ市(アメリカ合衆国)
- ⑥ Tanaka F, FDG-PET in correlation with epidermal growth factor receptor gene mutations in resected non-small cell lung cancer (NSCLC), 98th annual meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), 2007 年 4 月 19 日、ロサンゼルス市(アメリカ合衆国)

[図書] (計 1 件)

- ① 田中文啓, 中外医学社、Annual Review 呼吸器、2007 年、211-230 頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多久和 輝尚 (TAKUWA TERUHISA)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00412049

### (2) 研究分担者

田中 文啓 (TANAKA FUMIHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10283673

### (3) 連携研究者

なし