

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592068

研究課題名(和文) 同時多発肺病変に対する細胞遺伝学的プロファイルに基づいた治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic strategy for synchronous double lung cancers based on molecular analysis

研究代表者

永安 武(Nagayasu, Takeshi)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80284686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ節転移を認めなかった同時多発肺癌の6症例と同一肺葉内転移の6症例の12症例24腫瘍に対しaCGHによる解析を行った。二つの腫瘍間の細胞遺伝学的プロファイルの一致率の平均は、転移で55.5%、同時多発で19.6%と有意差を認めた($p=0.02$)。二つの腫瘍間の細胞遺伝学的プロファイルの一致率が肺内転移と多発肺癌で大きく異なり、原発なのか肺内転移なのか診断の手法として有用な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed molecular analysis of 12 synchronous double lung cancer patients with out lymph node metastasis (intrapulmonary metastasis in the same lobe (pm1): $n=6$, primary: $n=6$). We then evaluated the clinical outcomes of patients with pathologically diagnosed synchronous double lung cancers (intrapulmonary metastasis (pm): $n=80$, primary: $n=39$) and other T3 tumors ($n=230$). Examination of the concordance rate (CR) of the copy number changes (CNCs) for paired tumors showed that the metastasis group was larger than the primary group (55.5% vs. 19.6%, $p=0.04$). Pathological diagnosis and molecular classification were the same in 10 out of 12 cases (83%). Both pathological and molecular assessment using aCGH adapted in the current study appeared to have a consistency.

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：同時多発肺癌 肺内転移 原発多発肺癌 染色体構造変化 array CGH

1. 研究開始当初の背景

近年、CT 検診などの画像診断の進歩により、小型肺癌や多発肺癌が見つかる頻度が増加している。多発肺癌が、それぞれ独立した肺癌か、一つの癌とその転移であるかを判断することは、临床上非常に重要である。独立したものであれば、病期は軽く、治療方針としては手術になる可能性が高い。転移であれば、病期は IIB 期以上であり、治療方針としては、化学療法が主体となる。現在の多発肺癌の診断では、独立した腫瘍であるか転移であるか、発生部位と組織型に基づいた Martini and Melamed criteria が用いられている (Martini N, Melamed MR. J Thorac Cardiovasc Surg 1975)。しかし、明確な診断基準は確立されていない。

実際、当院当科での手術成績を元にした臨床研究では、同一肺葉内に発生する多発肺癌のリンパ節転移陰性例では、原発・転移症例のそれぞれの予後に有意差は見られない。肺内転移は多発原発腫瘍より予後は不良であると考えられる為、この結果は肺内転移と診断された症例の中に多発の原発腫瘍が混在していることを示唆し、同時に現在行われている臨床病理学的診断の限界を示している。

一方、近年の分子生物学的手法の進歩は DNA マイクロアレイによる高解像度な変異解析を可能とし、癌の変異解析は新たな局面を迎えている (Zhao X, et al. Cancer Res 2004)。以前より造血器腫瘍では転座・欠失等の染色体の構造変化が直接悪性化に関与することが知られていたが、上皮性悪性腫瘍でも同様に染色体の構造変化が悪性化に関与していることが明らかになっている (Mitelman F et al. Nat Genet 2004)。

肺腫瘍においても、遺伝子変異が解析され、多数の報告を認めている (Tae-Min Kim, Seon-Hee Yim, Jung-Sook Lee, et al. Clin Cancer Res 2005)。これによれば、コピー数多型 (CNV: copy number variation) やヘテロ性の消失 (LOH: loss of heterozygosity)、点突然変異 (somatic point mutation) が認められ、その解析比較が診断に有用ではないかと報告されている (Girard N, Ostrovskaya I et al. Clin Cancer Res. 2009, Xiaoyan Wang et al. J Natl Cancer Inst 2009)。

このような背景から、多発肺病変に対し DNA マイクロアレイを用いて遺伝子変異解析 (aCGH: array comparative genomic hybridization) を行い、多発の原発なのか転移なのか判別できるのではないかと、また分化度など臨床・病理学的因子と染色体構造の変化に関連があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

同時多発癌では、組織型が同じであれば多発の原発か転移かの診断は病理学的に困難であり、これを変異解析によって判別する。また、同一組織型の肺癌で分化と染色体構造の変化との比較を行う。これらにより、染色体構造の変化を解析して発癌に至る経路を明らかにすること、また染色体構造の変化と臨床病理学的諸因子との関連をレトロスペクティブに検討する。

3. 研究の方法

・ aCGH を用いた腫瘍細胞の遺伝子解析

(1) 試料からの DNA 抽出

5 μ m 厚及び 10 μ m 厚の薄切 FFPE 標本を HE 染色する。HE 染色像に基づき腫瘍細胞等、標的部分を Laser captured micro-dissection (以下 LCM) または部位限定抽出法により採取する。DNA の回収は DEXPAT® (TaKaRa) を用いて行う。回収した DNA は QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN) を使用して精製を行う。

(2) 抽出した DNA のマイクロアレイへの適用

精製した DNA を manufacturer's protocol に従い、Affymetrix 社 GeneChip System に代表されるような DNA マイクロアレイにハイブリダイズさせる。必要量の DNA が得られないときは、使用する標本量を増やす、もしくは PCR のサイクル数を増やす。

(3) データ解析

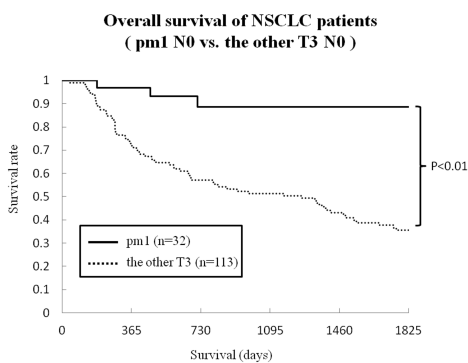
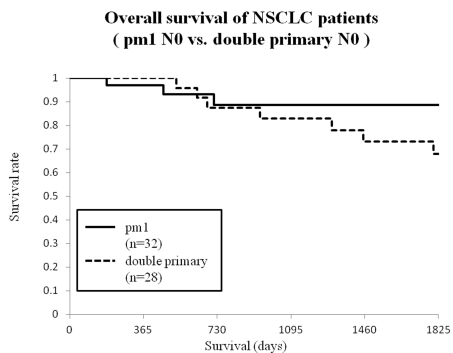
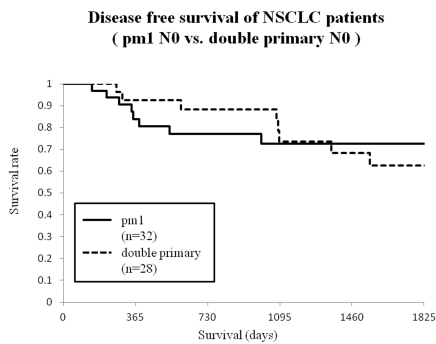
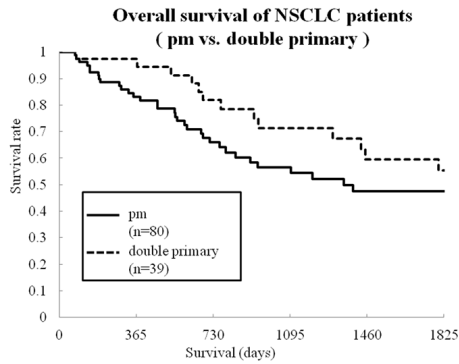
マイクロアレイ解析から得られる signal intensity を元に CNC 解析を行い、hetero call の分布を元に LOH 解析を行う。

4. 研究成果

対象症例は、病理学的に同時多発と診断された 39 症例、pm 診断された 80 症例 (pm1: 69 例, pm2: 9 例, pm3: 2 例) の計 119 症例。その内、リンパ節転移を認めなかった同時多発肺癌の 6 症例と pm1 の 6 症例の 12 症例 24 腫瘍に対し aCGH による解析を行った。

結果は、Copy number changes (CNC) の size・数と臨床病理学的因子には関連を認めなかったが、pm1 で CNC 数が多く ($p=0.14$)、size が大きい ($p=0.42$) 傾向があった。二つの腫瘍間の細胞遺伝学的プロファイルの一致率の平均は、pm1 で 55.5%、同時多発で 19.6% と有意差を認めた ($p=0.02$)。primary、pm の 5 年生存率は 57%、47% ($p=0.27$) と primary が良好な傾向があったが、n0 に限定すると 83%、68% ($p=0.28$) であり、特に pm1 では 88% と予後良好であった。

CNC の解析結果は肺内転移のゲノム不安定性を示しており、転移する過程においてゲノム変化が起こっていると推測される。また二つの腫瘍間の細胞遺伝学的プロファイルの一致率が肺内転移と多発肺癌で大きく異なり、原発なのか肺内転移なのか診断の手法として有用な可能性がある。



(aCGH の結果)

Case	status		aCGH	
	pathology	MM	concordance rate (%)	diagnosis
1 A / B	pm1	pm1	2.6	primary
2 A / B	pm1	pm1	67.3	metastasis
3 A / B	pm1	pm1	61.6	metastasis
4 A / B	pm1	pm1	63	metastasis
5 A / B	pm1	primary	87	metastasis
6 A / B	pm1	primary	51.2	metastasis
7 A / B	primary	primary	11	primary
8 A / B	primary	primary	0.3	primary
9 A / B	primary	primary	10.9	primary
10A / B	primary	primary	23.2	primary
11 A / B	primary	primary	68.8	metastasis
12 A / B	primary	primary	3.4	primary

Abbreviations: A: primary tumor, B: secondary tumor.

MM: Martini and Melamed Criteria, DFS: disease free survival.

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 1 件) 査読有り
Junichi Arai, Tomoshi Tsuchiya, Masahiro Oikawa, Koji Mochinaga, Tomayoshi Hayashi, Koh-ichiro Yoshiura, Kazuhiro Tsukamoto, Naoya Yamasaki, Keitaro Matsumoto, Takuro Miyazaki, Takeshi Nagayasu, Clinical and molecular analysis of synchronous double lung cancers. Lung Cancer 77 (2012) 281- 287

〔 学会発表 〕 (計 1 件)
第 29 回日本呼吸器外科学会(2012 年 5 月 18 日)
秋田キャッスルホテル
同時多発肺腫瘍の
array-comparative-genomic-hybridization(aCGH)を用いた細胞遺伝学的検索と予後解析
荒井淳一、及川将弘、土谷智史、宮崎拓郎、松本桂太郎、山崎直哉、林徳眞吉、吉浦孝一郎、永安 武

〔 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

永安 武 (Nagayasu Takeshi)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究者番号：80284686

(2) 研究分担者

山崎 直哉 (Yamasaki Naoya)

長崎大学 准教授

研究者番号：70404217

土谷 智史 (Tsuchiya Tomoshi)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
講師

研究者番号：30437884

宮崎 拓郎 (Miyazaki Takuro)

長崎大学病院 助教

研究者番号：00584749

(3) 連携研究者 なし