

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08365

研究課題名(和文) 高悪性度EGFR遺伝子変異型肺腺がんの発生・進展に関する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Carcinogenesis and progression of high grade EGFR-mutated lung adenocarcinoma

研究代表者

大橋 健一 (OHASHI, Kenichi)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40231203

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)：予後不良であった肺腺がん外科手術例を多数集めデータベースを作成し、高悪性度、予後不良に関連した病理学的特徴を明らかにし、高悪性度肺腺がんの分子基盤を明らかにすることを目的とした。IIP合併肺腺がんの病理学的特徴を明らかにし、mucin family proteinの発現を重点的に検討した。EGFR変異型肺腺がんの予後、悪性度は微小乳頭状の組織亜型成分によって規定され、EGFR変異型肺腺がんの進展過程において重要であることが明らかになった。IIP群ではMUC1、MUC7、MUC21の発現が有意に低い値を示し、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC9においては高い発現を示した。

研究成果の概要(英文)：Surgically resected lung adenocarcinomas with and without lymph node metastasis and biopsy samples from inoperably advanced tumors were examined pathologically. The micropapillary element was clarified to be an exclusive determinant of malignant potential in EGFR-mutated lung adenocarcinomas. Pathological features and mucin family protein expression profile of idiopathic interstitial pneumonia (IIP)-associated pulmonary adenocarcinomas was investigated. In the IIP group, expression of MUC1, MUC7 and MUC21 was lower, and that of MUC4, MUC5AC, MUC5 and MUC9 was higher than non-IIP group. In the TRU group cases, IIP group cases showed distinctly lower expression of MUC1, and higher expression of MUC4, MUC5B and MUC9 than non-IIP group cases. Expression of MUC21 was tightly linked to micropapillary and low papillary lepidic variants. IIP-associated pulmonary adenocarcinomas, especially those of TRU group, showed specific expression profile of mucin family proteins.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺がん 腺がん 病理学 EGFR 間質性肺炎 粘液

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞が有する遺伝子異常、発現分子の違いが次々と明らかになり、それぞれの分子異常に合わせた新しい治療薬の開発が行われている。肺がんは日本人がん死の20%以上を占める致死率の高い難治がんであり、一次予防として喫煙対策は進んでいるが、喫煙と関係のない腺がんの比率は増加している。日本人に多い肺腺がんは組織形態の違いにより腺房型、乳頭型、充実型、細気管支肺胞上皮型、混合型などに亜分類されるが、EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)、KRAS、BRAF 遺伝子の変異、EML4/ALK キメラ遺伝子などの遺伝子異常が明らかになり、それぞれの遺伝子異常と臨床病理学的特徴の関係が報告されている。EGFR 遺伝子の変異を有した肺腺がんは日本人に多く、一般に非喫煙者、女性の細気管支肺胞上皮型に多く、予後はやや良好とされる。一方欧米に多い KRAS 変異を有する腺がんには粘液腺がんが多く、予後は不良とされている。

これまで申請者が所属する研究室では、KRAS 変異肺腺がんの発生機序について主に研究を行ってきており、変異型 KRAS 遺伝子を導入したヒト気道上皮細胞を用いた研究では KRAS の下流で働く分子を網羅的に解析し、イオンチャンネル制御因子 FXR3、RAS-ERK pathway の DUSP6、マイクロ RNA -31 ががんの発生、進展に重要な働きをしていることを明らかにした。また KRAS 変異を有しているヒト肺腺がんの中に増殖活性が高く、予後が特に悪い一群があることも明らかにした。2012 年以降は EGFR 遺伝子変異のある肺腺がんにも研究対象を広げ、変異型 EGFR 遺伝子を導入したヒト気道上皮細胞の網羅的な遺伝子解析では、変異型 KRAS 遺伝子を導入したものと共通して CCL3, IL24, IL1B などのサイトカイン、ケモカイン遺伝子の高発現が誘導されることを明らかにし、ヒト肺腺がんの発生、進展に促進的に働いていることを明らかにした。一般的に EGFR 変異を有している肺腺がんは予後が比較的良好なものが多いとされているが、臨床病理学的に悪性度の高い一群が存在し、細胞・組織形態に特徴を有していることがわかってきた。547 例の内科症例を用いた検討では、EGFR 変異群(特に Exon19 deletion 例)では多発性微小脳転移を示す頻度が高く、100 例の外科切除例を用いた Preliminary な検討ではリンパ転移を示した EGFR 変異型腺がんには微小乳頭型、充実型が高頻度に見られた。

また、特発性間質性肺炎(IIP)を合併した肺腺がん例は予後不良を示す高悪性度肺がんと考えられるが、特徴的な組織像を示し、EGFR 遺伝子変異の頻度が低いことが予備的な検討から明らかになっている。

### 2. 研究の目的

(1) リンパ節転移等を伴い予後不良であった外科手術例を多数集め、それぞれについて臨

床病理学的事項に加えて遺伝子異常、微小乳頭型など細胞・組織学的特徴をまとめたデータベースを作成する。高悪性度、予後不良に関連した病理学的特徴を明らかにし、高悪性度肺腺がんの分子基盤を明らかにする。

(2) 予後不良な IIP 合併肺腺がんの病理学的特性を明らかにする。IIP 患者では喫煙歴を有する機会が多いため、合併した肺腺がんが IIP 例特有の変化、慢性炎症と関連したものが、喫煙習慣と関連したものが、未だ結論が出ていない。さらに IIP 合併肺腺がんに特異的に発現される分子、特異的なマーカーを明らかにすることを目的として、mucin family protein の発現を特に重点的に検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 外科的切除された肺腺がん 336 例と生検された肺腺がん 177 例を用いた。腺がんと診断された外科症例(336 例)の腫瘍の最大断面と内科症例(177 例)の生検検体のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、2 人の病理専門医が組織学的に顕微鏡で観察した。外科切除検体の凍結検体から DNA を抽出し、EGFR の exon18, 19, 20, 21 について PCR で増幅、Big Dye terminator kit V.3.1 (Applied Biosystems) と 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いたダイレクトシーケンシング法で解析した。内科症例の生検検体については、Scorpion amplification refractory mutation system 法で EGFR の exon18, 19, 20, 21 について解析されたデータを用いた。統計解析については Pearson  $\chi^2$  test と Fisher's exact test と Mann-Whitney  $U$  test を用いた。再発率曲線は Kaplan-Meier 法を用いてプロットし、術後 5 年再発率を計算した。無再発生存率は log-rank test を用いて比較検討した。病理組織診断の観察者間の一致率は Fleiss kappa statistic を用いて算出した。統計値 0.05 を有意水準とした。

(2) 外科手術を施行した 1170 例の中から、IIP 合併肺腺がん 81 例(IIP 群)、IIP 非合併肺腺がん 115 例(非 IIP 群)について研究対象とした。HE 染色による観察により、組織型・肺腺がん組織型および細胞型・病理病期を国際分類に従い診断した。腺がん細胞型分類については、TRU 型肺腺がん、非 TRU 型肺腺がん、others の 3 型に分類した。Terminal Respiratory Unit (TRU) 型肺腺がんは型肺胞細胞やクララ細胞に類似した形態をとる肺腺がんであり、TTF-1 陽性を示す細胞が主体であり、EGFR 変異率が高く、女性や非喫煙者に比較的多く発生する肺腺がんである。非 Terminal Respiratory Unit (TRU) 型肺腺がんの形態は高円柱状であり、粘液産生性や粘液非産生性の表面上皮細胞の形態をとる細胞が主体である。TTF-1 陰性で HNF4 陽性となる細胞の頻度が高く、EGFR 変異率は低い。IIP 症例については臨床所見と術前的高分解能コンピュータ断層写真 (high-resolution computed tomography,

HR-CT)をもとに診断した。IIPの全症例の術前HR-CTと病理学的所見をATS/ERS/JRS/ALAT 2011 classificationに従って再検討し、集学的評価(multidisciplinary discussion、MDD)を行った。膠原病、職業環境暴露、胸部への放射線治療、肺転移などによる原因の明らかな間質性肺炎症例は除外した。臨床病理学的な検討とともに、mucin family protein, MUC1, MUC2, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC9, MUC21の発現を免疫組織学的に検討した。免疫染色の結果について、染色強度のスコアとそれぞれの占める割合のスコアを掛け合わせた和を全体の発現スコア(MUC level)とした。発現スコア MUC levelは JMP software を用いて二乗検定、Wilcoxon signed-rank test, Kruskal-Wallis testにより統計解析を行い、P値が0.05以下の場合、統計学的に有意とした

#### 4. 研究成果

(1) EGFR 変異型予後不良肺腺がんの解析  
高悪性度群(リンパ節転移を有するEGFR変異型肺腺癌の群)はその他の3群と比較して、有意に微小乳頭型の成分が多かった。外科症例においてより早期(Stage )の症例とより進行している(Stage 以上)の症例の間で、微小乳頭型成分の割合を比較したが、EGFR変異型肺腺がんではStage II, III, IVにおいて微小乳頭型成分の割合が有意に増加することが明らかになった。また、手術適応のない進行肺腺がん(内科症例)の生検検体において、微小乳頭型成分を有する頻度を比較したところ、手術適応のない進行肺腺がん(内科症例)の生検検体においても微小乳頭型成分の割合は、EGFR変異型肺腺がんでは非EGFR変異型肺腺癌と比較して有意に高かった。さらに、微小乳頭型成分の割合と術後再発率の関係をStage のEGFR変異型肺腺がんの外科症例84例を用いて調べた。EGFR変異型肺腺がん症例の術後再発率は、微小乳頭型成分を含む群が含まない群よりも高かった。特に微小乳頭型成分の割合のカットオフ値が5%、10%の時に術後再発率に有意差が見られた。以上、EGFR変異型肺腺がんの悪性度は微小乳頭型の組織亜型成分によって規定され、EGFR変異型肺腺がんの進展過程において、微小乳頭型成分が特に重要であることが明らかになった。

(2) 特発性間質性肺炎(IIP)を合併した肺腺がん例の解析

IIP群と非IIP群で比較すると、患者特性については全体度同様にIIP群では年齢が高く、男性の割合が高く、喫煙者の割合が高く、喫煙指数が高かった。病理学的特性については下葉発生の頻度が高く、病理病期についてはstageが低いものを多く認めた。組織亜型については、IIP群においてAcinar, Solid, Mucinous型の頻度が高く、Lepidic型の頻度が低い傾向が認められたが、全体としては両群の間において有意な差は認められなかった。細胞亜型についてはIIP群において非TRU

型の頻度が高く、TRU型の頻度が低く、両群の間に明瞭な細胞像の特徴が認められた。生物学的な悪性度と関連して、腫瘍細胞の増殖活性Ki67 indexを比較すると、IIP群の腺がんにおいて有意に高い値が認められ、予後不良の原因の1つになっているものと考えられた。

IIP群、非IIP群の間に認められた組織亜型、細胞亜型の違いが何によって生じているのかが問題となるが、単に喫煙習慣の違いが影響を与えているのか、あるいはIIP、慢性炎症に伴う独自の要因が影響を与えているのかの検討が重要である。そこで、対象を男性喫煙者のみに絞って、IIP群(66例)、非IIP群(285例)で比較した。組織亜型については、Solid型の頻度が高く、Lepidic型の頻度が低い傾向がみとめられたが、両群の間に有意な差は認めなかった。細胞亜型については、肺腺がん全体で検討したときと同様に非TRU型の頻度が高く、TRU型の頻度が低く、両群の間に有意な差が認められた。IIP群の肺腺がん例において、蜂巢肺に発生した肺腺がん(H-IIP群、41例)と蜂巢肺外の部分、健常部に発生した肺腺がん(NH-IIP群、46例)に分け、両群でもう一度組織亜型、細胞亜型を検討した。組織亜型についてはH-IIP群において、Acinar, Mucinous型の頻度が高く、Papillary, Lepidic, Solid型の頻度が低い傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。細胞亜型については、H-IIP群において非TRU型の頻度が高く、TRU型の頻度が低く、有意な差が認められた。増殖活性についてもH-IIP群では有意に高い値を示した。IIP群に特徴的に認めた細胞亜型、増殖活性の違いは蜂巢肺とがんの発生に起因する可能性が示唆された。driver 遺伝子の変異について、EGFRの変異についてはH-IIP群では有意に低い値を示した。KRAS 遺伝子の変異、ALKの発現については有意な差は認められなかった。

粘液分子の発現については、IIP群ではMUC1、MUC7、MUC21の発現スコアが有意に低い値を示した。一方、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC9においてはIIP群で有意に高い発現スコアを示した。対象をTRU型肺腺がんに絞って検討した場合においては、MUC1においてIIP群で有意に低い発現スコアを示し、MUC4、MUC5B、MUC9においてはIIP群で有意に高い発現スコアを示した。非TRU型肺腺がんに絞った検討においては、各種MUCの発現スコアについてIIP群と非IIP群の間において有意な差は認められなかった。MUC21の発現についてはIIPとの直接的な相関は認められなかったが、発現スコアが高い群では非喫煙者、女性、EGFR変異肺腺がん、TRU型、浸潤がんの頻度が有意に高く認められた。

#### 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 9件)

1. Sadoyama S, Sekine A, Satoh H, Iwasawa T, Kato T, Ikeda S, Sata M, Baba T, Tabata E, Minami Y, Nemoto K, Hayashihara K, Saito T, Okudela K, Ohashi K, Tajiri M, Ogura T. Isolated Brain Metastases as the First Relapse After the Curative Surgical Resection in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients With an EGFR Mutation. Clin Lung Cancer. 査読有 2018; 19, e29-e36.
2. Okudela K, Mitsui H, Matsumura M, Arai H, Shino K, Sekine A, Woo T, Suzuki T, Ishikawa Y, Umeda S, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. The potential significance of alpha-enolase (ENO1) in lung adenocarcinomas - A utility of the immunohistochemical expression in pathologic diagnosis. Pathol Int. 査読有 2017 ; 67, 602-609.
3. Okudela K, Kojima Y, Matsumura M, Arai H, Umeda S, Tateishi Y, Mitsui H, Suzuki T, Tajiri M, Ogura T, Ohashi K. Relationship between non-TRU lung adenocarcinomas and bronchiolar metaplasia - potential implication in their histogenesis. Histol Histopathol. 査読有 2018; 33, 317-326.
4. Miyake A, Okudela K, Matsumura M, Hideaki M, Arai H, Umeda S, Yamanaka S, Ishikawa Y, Tajiri M, Ohashi K. Update on the potential significance of psammoma bodies in lung adenocarcinoma from a modern perspective. Histopathology. 査読有 2018; 72, 609-618.
5. Ikeda S, Sekine A, Baba T, Yamanaka Y, Sadoyama S, Yamakawa H, Oda T, Okuda R, Kitamura H, Okudela K, Iwasawa T, Ohashi K, Takemura T, Ogura T. Low body surface area predicts hepatotoxicity of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Sci Rep. 査読有 2017 7, 10811.
6. Kojima Y, Okudela K, Matsumura M, Omori T, Baba T, Sekine A, Woo T, Umeda S, Takemura T, Mitsui H, Suzuki T, Tateishi Y, Iwasawa T, Arai H, Tajiri M, Ogura T, Kameda Y, Masuda M, Ohashi K. The pathological features of idiopathic interstitial pneumonia-associated pulmonary adenocarcinomas. Histopathology. 査読有 2017; 70, 568-578.
7. Okudela K, Mitsui H, Ohashi K. Alterations in cathepsin L expression in lung cancers. Pathology international 2016; 66, 386-392.
8. Okudela K, Mitsui H, Ohashi K. Expression of tropomyosins in lung cancer - a potential role in carcinogenesis and its utility in a histopathological diagnosis.

Histology and histopathology 査読有 2016; 31, 857-866.

9. Matsumura M, Okudela K, Ohashi K. A Histopathological Feature of EGFR-Mutated Lung Adenocarcinomas with Highly Malignant Potential - An Implication of Micropapillary Element. PloS one 査読有 2016; 11, e0166795.

〔学会発表〕(計 6件)

1. 松村 舞依, 奥寺 康司, 小島 陽子, 梅田 茂明, 立石 陽子, 三井 秀昭, 鈴木 健久, 荒井 宏雅, 関根 朗雅, 大橋 健一. 高悪性度の EGFR 変異型肺腺癌の組織病理学的特性 日本病理学会(2017年5月)
2. 片岡 俊朗, 奥寺 康司, 澤住 知枝, 梅田 茂明, 山中 正二, 石川 善啓, 荒井 宏雅, 田尻 道彦, 大橋 健一. 肺の繊毛性粘液結節性乳頭状腫瘍の3例に関する臨床病理学的な研究 日本病理学会(2017年5月)
3. 梅田 茂明, 奥寺 康司, 小島 陽子, 三井 秀昭, 立石 陽子, 鈴木 健久, 松村 舞依, 斎藤 悠一, 大橋 健一. 肺腺がんにおいて IL-24 の発現損失は浸潤を促進する 日本病理学会(2017年5月)
4. 奥寺 康司, 小島 陽子, 松村 舞依, 梅田 茂明, 立石 陽子, 荒井 宏雅, 関根 朗雅, 大橋 健一. 肺腺がんの組織形成に細気管支の異形成が関与する可能性 日本病理学会(2017年5月)
5. 小島 陽子, 奥寺 康司, 大橋 健一. 間質性肺炎に合併する肺癌の病理組織学的検討 日本病理学会(2016年4月)
6. 奥寺 康司, 三井 秀昭, 大橋 健一. 肺腺癌におけるカテプシン L の発現. 日本病理学会(2016年4月)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pathola/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大橋 健一 (OHASHI, Kenichi)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：40231203

(2)研究分担者

奥寺 康司 (OKUDELA, Koji)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号：10326027

立石陽子 (TATEISHI Yoko)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：20644438

梅田茂明 (UMEDA Shigeaki)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：30644439