

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590358  
 研究課題名（和文） 肺癌組織型、遺伝子多型、遺伝子異常の3者による治療効果及び発癌感受性予測  
 研究課題名（英文） Prediction of therapy effects and cancer susceptibility for lung cancers by combined data of histology, polymorphism and gene alterations  
 研究代表者  
 土屋 永寿（Tsuchiya Eiju）  
 神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長  
 研究者番号：00072314

## 研究成果の概要：

肺癌に於いて、ヒトの個性（*p53*と*MDM2*の多型）とがんの個性（組織型や遺伝子異常）が、発がん、生物学的動態、治療に対する反応性等に与える影響を検討した。その結果、（1）一部の腺癌の発生には*MDM2*の過剰発現が関係しているが、その過剰発現は多型と関係がない、（2）腺癌の各組織型はそれぞれ特有の遺伝子異常を有し、形態から遺伝子異常を推測することが可能、（3）*P53*、*K-ras*、*EGFR*、*p16* 遺伝子のうち、前2者がともに異常を有する場合に最も予後が悪い、（4）*p53*多型と治療反応の関係は更なる検討が必要であった。以上の結果は、分指標的治療薬開発の標的分子を、また、がんの個性に応じた治療法選択の必要性を、示唆するものである。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000		1,500,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトに個性があるようにがんにも個性があり、それぞれの個性は、遺伝子多型（多型）及び、がんの組織型・遺伝子異常と言い換えることができる。我が国の悪性新生物の中で最も死亡頻度の高い肺がんの予防、診断、治療法の開発においては、これら個性の相互関

係を明らかにすることが必要である。

多型についてみると、*P53* 遺伝子のコドン72の多型は*p73*遺伝子産物の細胞死誘導機能に影響を与えて、化学療法や放射線療法による腫瘍の治療効果に影響を及ぼす。また、*MDM2*遺伝子は*p53*遺伝子の機能を抑制する働

きを有する遺伝子として知られているが、この遺伝子発現は転写調節領域の多型により影響を受ける。従って、*MDM2* 遺伝子の多型により *p53* の発がん抑制（細胞死誘導）機能が影響を受ける。つまり、*p53* 遺伝子に変異がない場合には、*MDM2* 遺伝子の多型が肺癌へのかかりやすさに関与しているとの仮説が立てられる。

肺癌の組織型・遺伝子異常についてみると、前者は極めて多彩で、組織型あるいは組織（細胞）亜型により生物学的動態が異なると推測される。一方後者として *p53*, *p16*, *EGFR*, *K-ras* 等が挙げられるが、これらの遺伝子異常は組織形態のみならず生物学的動態にも影響を与えており、特に *EGFR* 変異の有無は肺癌治療薬選択に大きく影響を及ぼしている。

## 2. 研究の目的

上述より、ヒトの個性と肺癌の個性の組み合わせ、がんの個性の中における組織型と遺伝子異常の組み合わせや、遺伝子異常の中での相互の組み合わせ、の相違により、肺癌の生物学的動態や治療に対する反応性等が大きく変化すると予想される。そこで、ヒトの個性として *p53* のコドン 72 と *MDM* の転写調節領域の SNP309 多型を、癌の個性として組織型と組織（細胞）亜型、遺伝子異常（発現異常も含む）として *p53*, *p16*, *EGFR*, *K-ras*, *MDM2* を取り上げ、(1) *p53* 多型と治療効果との関係、(2) *MDM2* の多型と発がん感受性の関係、(3) 組織型と遺伝子異常の関係、及び、遺伝子異常相互の関係、(4) 遺伝子異常の組み合わせによる予後への影響、を検討した。肺癌におけるこのような研究はこれまで認められない。

本研究の結果、(1)より、*p53* 変異とコドン 72 の多型の組み合わせで治療効果の異なることが明らかになれば、事前に治療効果予測ができ、治療法の改良につながる。(2)より、

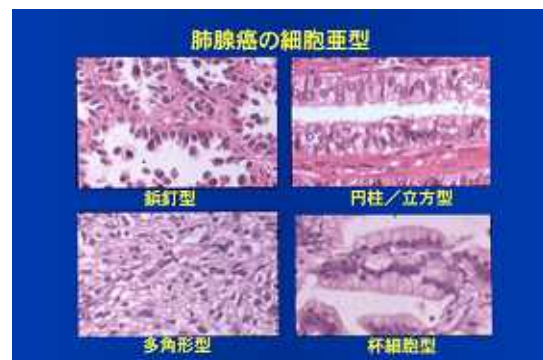
*MDM2* 多型により患者の頻度が異なること（発がん感受性の相違）が判明すれば、個人に合わせた予防法の作成が可能となる。(3)より、癌の個性の明確化により、個別化治療の必要性、及び、分子標的治療薬開発のための標的遺伝子、を明らかにすることが出来る。(4)より、遺伝子異常の組み合わせで予後の異なることが判明すれば、それに合わせた治療法の選択が可能になる等、肺癌の予防や治療法の開発・改良にきわめて有益である。

## 3. 研究の方法

(1) 検索材料は癌研外科で 1989-2004 年に手術切除された肺扁平上皮癌 113 例と、1989-1993 年に手術切除された肺腺癌 223 例で、いずれも凍結保存されたものである。多型解析は、扁平上皮癌例では患者から文書による同意を得ているため連結可能匿名化して、腺癌は 3 省合同の倫理指針が出される以前に収集された症例のため、連結不可能匿名化しておこなった。全体の研究計画については、神奈川県立がんセンター及び癌研究所の倫理委員会から承認を受けた。

(2) 喫煙状態、臨床病理学的事項、及び、治療の有無や方法はカルテを参照し、正常日本人の *MDM2* 多型の頻度は過去に当研究所でなされたデータを対照とした。

(3) 肺癌の組織分類は WHO 分類で、腺癌の亜型分類は WHO と我々独自の細胞亜型分類（鋸釘型、円柱／立方型、胚細胞型、多角形型、杯細胞型）を用いた（図 1）。



(4) 遺伝子異常や多型の解析に用いた DNA は、凍結腫瘍組織と正常肺組織からマイクロダイセクション法で抽出した。遺伝子異

常のうち、*p53* 遺伝子のエクソン 4-8, 10, *K-ras* のコドン 12, *EGFR* のエクソン 19 と 21, *p16* のエクソン 1 と 2 の変異は、PCR-SSCP・ダイレクトシーケンス法、MASA 法、ループハイブリッド(LH)法で、*p16* のメチル化はメチル化特異的 PCR 法で、*p53* のヘテロ接合性の消失 (LOH) はマイクロサテライトマーカーを用いて行った。*P53* 及び *MDM2* の多型(SNP309)は、PCR-SSCP・ダイレクトシーケンス法と LH 法で行い、*MDM2* の過剰発現は免疫染色法で検索した。

(5) 統計学的解析として、目的の(1)(3)については、<sup>2</sup>テスト、フィッシャーズテスト、スチューデント t テストを、(4)については、5 年生存率の比較をカプランマイヤー法とログランクテストを用いて行った。P 値は<0.05 を有意差ありとした。

#### 4 . 研究成果

##### (1) *p53* 多型と治療効果との関係：

*p53* 多型と治療効果との関係は、扁平上皮癌症例についてのみ検索した。

扁平上皮癌 113 例中、術後再発し放射線療法または化学療法 + 放射線療法を受けた症例は 13 例であった。*p53* 変異解析が可能であった 109 例中変異は 97 ( 8 9 % ) に認められた。これら変異を有する症例において、コドン 72 の多型の種類 ( アルギニン / プロリン ) により治療効果が異なるか否かを、症状の改善の有無、腫瘍の縮小効果、生死、生存期間につき検討したが、症例数が少なく結論は出せなかった。

##### (2) *MDM2* の多型と発がん感受性の関係：

*MDM2* の多型と発がん感受性の関係は、腺癌例についてのみ検討した。

*MDM2* の過剰発現は 55/204 例 (27%) に認め、*p53* 遺伝子変異は 94 例 44% に、LOH は 98 例に認められた。*p53* 遺伝子変異や LOH のある症例で

は有意に *MDM2* の過剰発現は少なく ( 其々  $p < 0.01$  ) どちらの *p53* 異常もない症例ではそれ以外の症例に対し有意に *MDM2* が過剰発現していた ( $p < 0.01$  )。 *p53* 異常のない症例における *MDM2* SNP309 の多型頻度は、グアニン (G) / G 31%、G / チロシン (T) 46%、T / T 23% で、健康成人の多型分布と差はなかった。

以上より、肺腺癌では *p53* 遺伝子異常がなくても *MDM2* 過剰発現によって *p53* の機能が抑制され発癌している症例があると考えられた。しかし、その過剰発現に *MDM2* SNP309 多型は関係しておらず、従ってその多型は発がん感受性とは関係がないと考えた。

##### (3) 組織型と遺伝子異常の関係、及び、遺伝子相互の関係：

##### 細胞亜型分類で見た場合 ( 表 1 )

	検索数 (%)	変異を有する症例数 (%)		
		<i>p53</i>	<i>K-ras</i>	<i>EGFR</i>
全例	223	96 (43)	18 (8)	94 (42)
年齢 (平均値 ± SD)	61 ± 11	61 ± 11	63 ± 12	61 ± 12
性 男	124 (56)	61 (49) <sup>§§</sup>	12 (10)	35 (28) <sup>§</sup>
女	99 (44)	35 (35)	6 (6)	59 (60)
細胞亜型分類				
鋳釘	102 (46)	30 (29)	1 (1)	65 (64) <sup>‡</sup>
混合	49 (22)	20 (41)	2 (4)	18 (37)
円柱 / 立方	44 (20)	30 (68) <sup>*†</sup>	6 (14) <sup>*</sup>	8 (18) <sup>†</sup>
多角	19 (8)	12 (63) <sup>**††</sup>	2 (11) <sup>***</sup>	3 (16) <sup>†††</sup>
杯細胞	7 (3)	3 (43)	7 (100) <sup>‡</sup>	0 <sup>†††</sup>
その他	2 (1)	1	0	1
WHO 分類				
腺癌	33 (15)	24 (73)	3 (9)	5 (15)
乳癌	27 (12)	10 (37) <sup>§§§</sup>	1 (4)	12 (44) <sup>§§</sup>
細気管支肺胞上皮	2 (1)	1 (50)	1 (50)	1 (50)
粘液産生充実型腺癌	10 (4)	7 (70)	1 (10)	3 (30)
混合	149 (67)	54 (36) <sup>§§</sup>	12 (8)	73 (49) <sup>§</sup>
その他	2 (1)	0	0	0

\* 対鋳釘、† 対混合、‡ 対他のすべての型、§ 対腺癌、|| 対粘液産生充実型腺癌  
 †† 男対女、病期 † 対 II-IV、非喫煙者対喫煙者、細気管支肺胞上皮型進展+ 対 -  
 シンボルの数 \*, \*\*, \*\*\*, はそれぞれ \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.1$  ( $\chi^2$  或は Fisher's テスト) を表す。

*p53* 変異頻度は、円柱と多角型でそれぞれ 68%、63% と高く、以下杯細胞、混合、鋳釘の順に低くなり、前 2 型と鋳釘、及び、円柱と混合型の間には有意の差が認められた。*K-ras* 変異頻度は、杯細胞型 100%、円柱と多角 14 - 11%、混合と鋳釘 1 - 4% で、杯細胞型は他の細胞型より ( すべて  $p < 0.01$  )、円柱と多角は鋳釘より (それぞれ  $p < 0.01$ ,  $< 0.1$ ) 高かった。*EGFR* 変異頻度は

鉾釘で 64%と最も高く、以下混合 37%、円柱と多角 18-16%、杯細胞 0%の順で、鉾釘と他の亜型 ( $p < 0.01$ )、混合と円柱 ( $p < 0.05$ ) とに差が認められた (表 1)。

*p16* の遺伝子変異とメチレクションを合わせた *p16* 異常の頻度は、多角型、胚細胞で 57-58%、鉾釘、混合、円柱/立方では 10-16%で、多角形は有意に鉾釘、混合、円柱/立方より高かった。WHO 亜型で見ると、*p53* と *EGFR* の変異頻度は亜型間で差が見られたが、*K-ras* 変異頻度は亜型間で差が認められなかった。なお、亜型別 *EGFR* 変異頻度の予測は細胞亜型分類の方が WHO 分類より統計学的に優れていた。

以上より、各細胞亜型は特有の遺伝子変異を有しており、治療法の選択に重要な *EGFR* 変異の有無を形態で予測する場合は、WHO より細胞亜型分類の方が優れている、と考えられた。

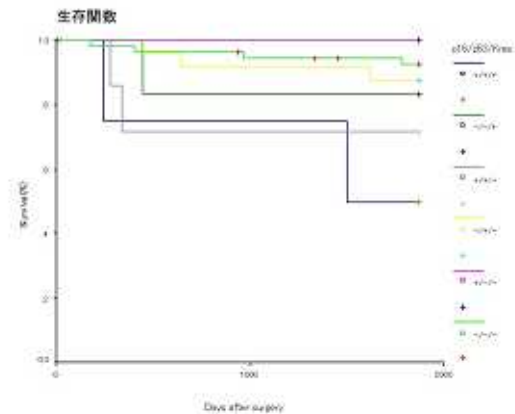
遺伝子変異の相互関係についてみると、*K-ras* と *EGFR* は相互に排他的、また *p53* と *EGFR* 変異も排他的傾向を示した。*p16* 異常は *p53*、*K-ras* 変異と有意に共存するが、*EGFR* 変異とは排他的であった。

以上より、遺伝子異常の相互間に特有の関係があり、発がんに至る情報伝達経路の相違を反映しているものと考えられた。

(4) 遺伝子異常の組み合わせによる予後への影響

*EGFR* 遺伝子変異の有無は 5 年生存率に影響を与えなかったことから、*p16/p53/k-ras* 遺伝子異常の組み合わせの違いによる 5 年生存率を比較した。病理病期 1 期でみると、3 遺伝子ともに異常が認められる (+/+ / +) 症例で最も予後が悪く、*p16* 遺伝子の状態に関わらずに *p53/K-ras* が共に陰性 (-/- / -、或は、+/- / -) の症例ではきわめて予後良好で、両者の間に有意の

差が認められた (図 2)。



病理病期 II+III 期の症例 (進行した症例) においても、同様の傾向であった。

以上より、遺伝子異常の予後に与える影響は病理病期の早い方が明瞭で、その際 *p53* と *K-ras* の異常が重なると著しく予後が悪くなると考えられた。

## 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 1 件)

1) Shimmyo T, Okada A, Hashimoto T, Kobayashi Y, Miyagi Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Osada H and Tsuchiya E. Etiological value of *p53* mutation spectra and differences with histology in lung cancers. *Cancer Sci.* 99(2):287-95, 2008. (査読有り)

[学会発表](計 7 件)

1) 新明卓夫、岡田英、土屋永寿、その他 5 (8 番目): *p53* 変異解析による非小細胞肺癌の発癌原因の検討 第 65 回日本癌学会総会 (2006.9.30) 横浜

2) 岡田英、新明卓夫、土屋永寿、その他 6 (9 番目): *EGFR* 遺伝子変異の頻度から見た肺腺癌亜型分類の有用性の検討 第 47 回日本肺癌学会総会 (2006.12.14) 京都

3) 新明卓夫、岡田英、土屋永寿、その他 5 (8 番目): *p53* 及び *K-ras* 変異の肺腺癌細胞形態及び予後に与える影響 第 47 回日本肺

癌学会総会 (2006.12.14) 京都

4) 岡田英、新明卓夫、土屋永寿、その他 6  
(9 番目): Relationship between cell type  
classification and prognosis in  
pathological stage I lung adenocarcinomas.

第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.4) 横浜

5) 岡田英、新明卓夫、土屋永寿、その他 6  
(9 番目): 鋏釘型肺腺癌症例における *p53*・  
*K-ras*・*EGFR* 変異の有無と予後との関係 第  
48 回日本肺癌学会総会 (2007.11.9) 名古屋

6) 岡田英、新明卓夫、土屋永寿、その他 7  
(10 番目): 各種 *p16* 遺伝子異常の相互関  
係、及び、肺腺癌細胞亜型分類との関係 第  
67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28) 名古屋

7) 岡田英、新明卓夫、土屋永寿、その他 6  
(9 番目): 肺腺癌の細胞亜型分類は WHO 分  
類と比較して臨床上有用である・*p53*・  
*K-ras*・*EGFR* 遺伝子変異の頻度と予後を比較  
して 第 61 回日本胸部外科学会 (2008.10)  
福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土屋 永寿 (TSUCHIYA EIJU)

神奈川県立がんセンター臨床研究所

• 所長

研究者番号 : 00072314