

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2008
課題番号：18590851
研究課題名（和文） 異型腺腫様過形成から肺腺癌への発癌機構の解明と化学予防
研究課題名（英文） Mechanism of carcinogenesis from pulmonary atypical adenomatous hyperplasia to adenocarcinoma

研究代表者
瀧川 奈義夫（TAKIGAWA NAGIO）
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：60325107

研究成果の概要：

上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異は肺腺癌の前癌病変である異型腺腫様過形成（AAH）においても肺腺癌においても同程度に認められた。AAH および腺癌の多発病変を有する症例の解析により、同一患者においても病変ごとに EGFR 遺伝子変異のパターンが異なっていることが多く、変異はランダムに生じていると考えられた。また、EGFR 遺伝子変異の有無にかかわらず、STAT3 の発現が癌進展の分子マーカーになりうる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：呼吸器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、発癌、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

肺癌死亡率は増加の一途をたどり、本邦における肺癌死亡者数は悪性腫瘍のなかで最多となっている。なかでも腺癌の占める割合は最大であり、その対策は急務である。しかしながら、外科的療法および内科的治療においては長足の進歩は望めず、癌の予防に重点をおいた治療戦略が期待される。肺腺癌の前

癌病変はこれまで不明な点が多かったが、異型腺腫様過形成（AAH）という概念が認知されてきた。また、肺腺癌の進展とともに胸部CT上のすりガラス陰影の内部に充実性部分が広がっていくことが確認されている。

肺腺癌における遺伝子変異として上皮成長因子受容体（Epidermoid growth factor receptor：EGFR）変異あるいは KRAS 変異が

認められ、それらは概ね一方のみの変異であり、地域性、人種差および発癌物質に対する感受性の差が推察されている。KRAS 変異の頻度は欧米で高いが日本では低く、喫煙による発癌と密接に関連している。一方、EGFR 変異は東アジアでは高いが欧米では低く、喫煙との関連性は少ないと考えられている。なかでも日本人の非喫煙者の肺腺癌は EGFR 変異が多く、KRAS 変異は少ない。禁煙により発症数を減らすことのできる肺癌と異なり、非喫煙者の肺癌に関しては有効な手段が講じられていない。EGFR 変異のある肺腺癌の発癌機構を明らかにすることにより、薬物治療を含めた予防策をたてることが可能と考えられている。

2. 研究の目的

AAH から肺腺癌への発癌機構を解明し、その進行を抑制する方法を探索する。

3. 研究の方法

(1) 肺腺癌もしくは AAH の生検あるいは手術標本より得られた組織を用いてパラフィン包埋、厚さ $4\mu\text{m}$ の連続切片作製を行う。これらの検体を Hematoxylin-Eosine (HE) 染色と EGFR、STAT3、AKT、MAPK に対する免疫組織染色を行い、腫瘍組織でのこれら蛋白の発現レベルを比較し、臨床的背景との関連性について検討を行う。

(2) 手術標本より得られた検体からパラフィン包埋、厚さ $4\mu\text{m}$ の連続切片の作成を行う。HE 染色を行い、腫瘍組織の存在部位を確認し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより腫瘍組織を分離する。これら検体から DNA の抽出を行い、PCR 法にて EGFR の腫瘍細胞における変異の有無を確認する。肺腺癌、AAH でのこれら変異の頻度、その他

臨床的背景ごとに変異の頻度について比較検討する。

4. 研究成果

(1) 肺腺癌 31 病変は 25 人から得られ、20 病変は 16 人の女性、11 病変は 9 人の男性から得られた。肺腺癌 10 病変は 7 人の喫煙者もしくは喫煙歴を有する患者から得られ、21 病変は 18 人の非喫煙患者から得られた。exon 19 と 21 の EGFR 遺伝子の変異は 40 検体中 11 例 (28%) に認められた。AAH と肺腺癌における exon 19 と 21 の遺伝子の変異はそれぞれ 44% と 23% ($p=0.34$) であった。exon 19 のフレームシフト変異と exon 21 の点突然変異は 9 検体 (23%) に認められた。EGFR チロシンキナーゼ阻害剤耐性と関連する EGFR exon 20 (T790M) の遺伝子変異は、40 病変中 2 病変 (5%) に変異を認めた。この 2 病変はいずれも女性、非喫煙者の検体であり、他の遺伝子変異と共に検出した。このうち 1 例は、AAH で exon 19 (D761Y) の点突然変異も有していた。他の 1 例は、肺腺癌で exon 21 (L858R) の点突然変異も認めた。次いで 9 例の多発病変について解析を行った。9 例中 6 例で少なくとも一つの病変に EGFR 遺伝子変異を認めた。この中で同一の EGFR 遺伝子変異パターンを認めたものはなかった。1 例は、exon 19 (del E746-A750) の変異と exon 21 (L861Q) の変異と異なるものであった。他の 2 例は、1 病変では exon 20 (T790M) および exon 21 (L858R) の変異、もしくは exon 21 (L858R) の変異を認めたが、他の 1 病変では変異を認めなかった。AAH と肺腺癌を同時に認めた 2 例で、AAH 病変のみに exon 19 のフレームシフト変異を認めた。また別の AAH と肺腺癌を同時に認めた 1 例で両方の病変に exon 19 (D761Y) の遺伝子変異を認めたが exon 20 (T790M) の遺伝子変異は AAH の病変のみに認められた。以上

より多発病変を有する症例は、同一患者においても病変ごとに変異のパターンが異なっていた。

少なくとも同一人物に生じる肺腺癌およびAAHにおいては、同じ機序で発癌しているものと考え、一次癌の解析により二次癌予防にもなりうると予想していた。しかしながら、同一症例においても病変ごとにEGFR遺伝子変異のパターンが異なっていることも多く、遺伝子変異はランダムに生じている可能性が示唆された。

(2) 胸部CT上周囲にすりガラス陰影を伴い中心部に充実性部分をもつ肺腺癌の標本は30例得られた。検体の中心の充実性部分、肺胞置換部分、辺縁の正常部分における発現は、それぞれEGFRで30%、14%、0%、pSTAT3で26%、84%、30%に認められた。EGFR遺伝子変異は、L858Rが7例、deletionが4例に検出されたが、EGFRとの相関は認められなかった。遺伝子変異の有無にかかわらず、STAT3の発現が癌進展の分子マーカーになりうる可能性が示唆された。

(3) EGFR遺伝子変異の研究については、世界的にも本邦を中心に進んでおり、本研究もその先頭集団の中に位置していると考えている。我々はA/Jマウスの自然発癌の系およびEGFR遺伝子改変マウスの系で発癌予防の実験も平行して行っている。EGFR遺伝子改変マウスの肺腺癌組織のpSTAT3は高発現しているが、その発現は中心の充実性部分ではなく正常肺組織との辺縁に認められ、臨床検体と同様な結果が得られており(図1)、STAT3阻害剤を用いた研究に着手している。

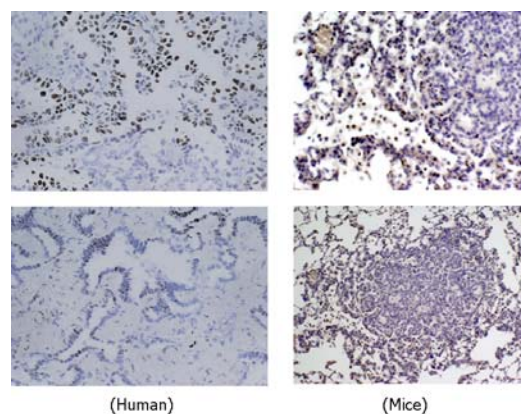


図1: ヒト肺腺癌とマウス肺腺癌におけるリン酸化STAT3の発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kozuki T, Hisamoto A, Tabata M, Takigawa N, Kiura K, Segawa Y, Nakata M, Mandai K, Eguchi K, Ueoka H, Tanimoto M. Mutation of the epidermal growth factor receptor gene in the development of adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 58:30-35, 2007.
- ② Ogino A, Kitao H, Hirano S, Uchida A, Ishiai M, Kozuki T, Takigawa N, Takata M, Kiura K, Tanimoto M. Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* 67:7807-7814, 2007.
- ③ Hisamoto A, Kondo E, Kiura K, Okada T, Hosokawa S, Mimoto J, Takigawa N, Tanimoto M. Point mutation of K-ras gene in cisplatin-induced lung tumours in A/J mice. *Lung Cancer* 58:15-20, 2007.
- ④ Uchida A, Hirano S, Kitao H, Ogino A, Rai K, Toyooka S, Takigawa N, Tabata M, Takata M, Kiura K, Tanimoto M. Activation of downstream epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling provides gefitinib-resistance in cells carrying

EGFR mutation. Cancer Sci 98:357-363,
2007.

[学会発表] (計3件)

① 高田三郎、瀧川奈義夫、大橋圭明、畝川芳彦、山下素弘、寺本典弘、新海 哲、上月稔幸、堀田勝幸、田端雅弘、木浦勝行、谷本光音 すりガラス陰影を伴う肺腺癌の進展におけるEGFRシグナルの関与発表者、第49回日本肺癌学会総会 2008年11月13日

② Ogino A, Kitao H, Hirano S, Uchida A, Takigawa N, Kiura K, Tanimoto M. Emergence of EGFR T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a NSCLC cell line. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research. 2007年4月16日 LA, USA

③ Kozuki T, Hisamoto A, Takigawa N, Tabata M, Segawa Y, Nakata M, Umemura S, Ohashi K, Kiura K, Eguchi K, Ueoka H, Tanimoto M. Early occurrence of epidermal growth factor receptor Mutation in lung adenocarcinoma: Comparison between pulmonary atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2006年4月17日 Washington DC, USA

[図書] (計1件)

① Kiura K, Takigawa N, Segawa Y: Springer, Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis, 2009, 609

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60325107

(2) 研究分担者

木浦 勝行 (KIURA KATUYUKI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10243502

田端 雅弘 (TABATA MASAHIRO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：30243504

(3) 連携研究者

なし。