

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790274
 研究課題名（和文）肺腺癌の多段階発癌におけるLKB-1, K-ras, EGFR遺伝子変異の解析
 研究課題名（英文）LKB-1, K-ras, and EGFR gene mutation involvement in the multistep tumorigenesis of primary lung adenocarcinomas
 研究代表者
 大出 貴士 (OIDE TAKASHI)
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：00422246

研究成果の概要（和文）：

亜区域気管支内腔にポリープ状に発育し、印環細胞の形態を示して末梢肺組織中に浸潤する肺腺癌において、*ALK* 遺伝子異常を免疫組織化学的に検出した。*ALK* 遺伝子異常を有する肺癌は分子標的治療の対象となり得ることから近年急速な注目を集めているが、気管支内腔にポリープ状の発育を示した *ALK* 陽性肺癌の報告はこれまでにない。本症例は、*ALK* 遺伝子異常を示す肺癌の一部は中枢気管支表層上皮由来である可能性を示しており、*ALK* 遺伝子異常を伴う肺癌の発癌機構の解明に寄与し得るものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we detected a case of primary pulmonary adenocarcinoma with an immunohistochemically proven *ALK* abnormality. The tumor showed an endobronchial polypoid growth pattern with peripheral pulmonary tissue invasion. Recently, lung cancers having *ALK* gene abnormalities have attracted growing attention because of therapeutic aspects, i.e., *ALK* inhibitor therapies. The present case is the first case of *ALK*-immunopositive lung cancer suggesting central bronchial surface epithelial origin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：病理学, 肺癌, 腺癌, 発癌

1. 研究開始当初の背景

近年急速に発展した分子標的療法は癌の

治療戦略に大きな変革をもたらし、肺癌の領域においては EGFR キナーゼ活性を標的とし

た gefitinib(イレッサ®)の臨床応用に至った。Gefitinib に対しては responder と non-responder が比較的明瞭に存在し、2004年に gefitinib 治療反応性と epidermal growth factor receptor: EGFR チロシンキナーゼドメインの遺伝子変異の間に高い相関があることが報じられた(Paez JG, 他. Science 304: 1497-1500, 2004. Lynch TJ, 他. N Engl J Med 350: 2129-2139, 2004). 以後、肺癌における EGFR 遺伝子変異について、腺癌に特異的であり、女性、非喫煙者、東洋人に多いことが明らかとなり、これはまた gefitinib responder の臨床的特徴ともよく一致していた(Kosaka T, 他. Cancer Res 64: 8919-8923, 2004). 現在ではこれらの EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌の病理学的特徴を抽出する検討がなされており、この過程で末梢呼吸上皮由来の腺癌が EGFR 遺伝子変異特異的サブタイプとして注目されつつある(Yatabe Y, 他. Am J Surg Pathol 29: 633-639, 2005). 末梢呼吸上皮を発生母地する腺癌の多くは従来の組織分類では non-mucinous BAC pattern を含む組織亜型を示し、このタイプの腺癌の発生には、atypical adenomatous hyperplasia (AAH) - adenocarcinoma sequence による multistep carcinogenesis が想定されていることから、この sequence の何れの段階で EGFR 遺伝子変異が critical に作用するのか極めて興味深い。また、付加的遺伝子異常による多段階癌化の観点からは、K-ras や LKB1 といった肺腺癌に高頻度に見られる遺伝子変異が、EGFR 遺伝子変異や喫煙歴などの臨床的特徴とどのように関係するかは重要な検討課題と言える。

2. 研究の目的

肺癌は癌死亡の原因の最多を占める疾患

であり、ことに腺癌は最も高頻度の組織型であることより臨床的にも極めて重要である。従来、末梢性肺腺癌の発生については、前駆病変である異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia: AAH) から非浸潤癌 (上皮内癌) である細気管支肺胞上皮癌 (bronchioloalveolar carcinoma: BAC) を経て浸潤癌 (invasive adenocarcinoma)に至るとする AAH-adenocarcinoma sequence が提唱されている。この過程においては、大腸の adenoma-carcinoma sequence と同様に複数の遺伝子異常が付加的に生じることで浸潤癌としての性質を獲得するとする multistep carcinogenesis が想定されているが、各々の step に関与する遺伝子異常については未だ十分解明されていない。従来、肺腺癌に比較的特異性の高い遺伝子変異として K-ras 遺伝子変異が知られ、また近年では肺腺癌のあるサブセットにおいては EGFR 遺伝子の変異が高頻度に見られることが報告されている。しかしながら、AAH-adenocarcinoma sequence の各段階におけるこれらの遺伝子異常の頻度については施設間の相違があり一定の見解が得られていない。また、最近では肺腺癌の3分の1以上の症例で、Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子である LKB1 (癌抑制遺伝子) に変異が見られることが報告され (Fernandez P, 他. Oncogene 23:5084-5091, 2004), 肺腺癌の発生に極めて重要な役割を担っていると考えられるが、AAH および BAC における LKB1 変異の頻度については現在まで報告がない。本研究では、AAH から BAC を経て浸潤癌に至る過程で生じる遺伝子異常を明らかにすることを目的とし、肺腺癌発生に深く関わりと考えられる K-ras, EGFR, および LKB1 遺伝子変異について解析を行う。AAH から癌化および浸潤・転移能の獲得に至る過程で鍵となる遺伝子の異常が特定でき

れば、癌化の機序の解明に資すると同時にこれを標的とした治療法の開発にも寄与することが期待される。

3. 研究の方法

1) 症例の抽出と臨床的検討

千葉大学医学部附属病院において外科切除された肺腺癌(non-mucinous BAC および adenocarcinoma mixed subtype with BAC pattern)およびAAHについて、臨床チャートより年齢、性別、喫煙歴といった事項の調査を行う。

2) DNA抽出・増幅・変異解析

ホルマリン固定パラフィン包埋された外科手術材料より薄切切片を作製し、H&E染色の後に病変の観察を行ない、組織学的診断を確認する。続いて未染切片の病変に対応する部分を切除し、通常の方法でDNAを抽出する。

LKB1:

マイクロサテライトマーカー (D19S886, D19S565, D19S591, D19S549, D19S216)を用いて、STK11/LKB1 locusのLOH解析を行なう。増幅産物を熱変性し、ABI Prism 3100 gene analyzer (千葉大学医学部共同研究施設所有)により塩基配列を決定する。また、exon 1-9についてSTK11/LKB1特異的primer (Sugihara, 他. Am J Surg Pathol 154: 1835-1840, 1999)を用いてPCR法により増幅し、homozygous deletion analysisを行う。Integrin- β -4 or MKK4をpositive internal primerとして用いる。

K-ras:

コドン 12 およびコドン 13 について、PCR-RFLP法による判定を行う。

EGFR:

神奈川県立がんセンター考案のカスタムプライマーを用いてPCR増幅を行ない、遺伝子変異があるものについては増幅過程で反

対側の塩基に loop-hybrids ができるようプローブを設定し、泳動によりバンドを検出する。変異を認めた検体については、sequenceを行ない、塩基配列を決定する。

4. 研究成果

1) ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本における肺腺癌 cancer stem cellの同定

近年、各種悪性腫瘍において cancer stem cellの存在が示唆されており、腫瘍ごとに異なった cancer stem cellのマーカーが同定されつつある。肺癌においては、CD133が cancer stem cellのマーカーである可能性が最近報告された。組織標本において cancer stem cellを同定できれば、多彩な組織像を呈する肺腺癌混合型 (adenocarcinoma mixed subtype)において cancer stem cellの局在の特定が可能となり、発癌において付加的に生じると考えられる遺伝子異常(LKB1, k-ras, EGFR等)と組織像の対比を行い得ると考えられることから、肺腺癌の多段階発癌を検討する上で極めて有用と考えられる。そこで、本研究ではまず、組織切片上でのCD133陽性癌細胞の免疫組織学的同定を行う方針とした。対象とした症例は、異型腺腫様過形成1例、細気管支肺胞上皮癌6例(粘液産生型4例および粘液非産生型2例)、および肺腺癌混合型7例。自験外科切除例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから4 μ m薄切切片を作製し、抗CD133抗体を用いて通常の方法で免疫染色を行った。肺腺癌全例および異型腺腫様過形成1例において一部の癌細胞の細胞質および核に淡い陽性像が見られたものの、細胞膜には明らかな陽性像は見られなかった。同様の陽性像は非癌部の肺胞上皮細胞においても認められることから、非特異的反応の可能性も考えられた。一般に、cancer stem cellは癌細胞の数%以下の頻度を占めるのみ

とされることから、前癌病変あるいは早期癌の微小な病変からの検出は難しい可能性もあり、抗原賦活法等の手技に改善の余地が残された。

2) 発癌遺伝子 ALK 陽性を示す肺腺癌の病理組織学的検討

近年、肺癌に対する化学療法において急速なパラダイムシフトが認められ、分子標的療法が標準治療となりつつある。その主な標的遺伝子変異として *EGFR* 遺伝子変異が既に臨床の場において検討される状況である。一方、*EGFR* とは無関係に肺腺癌の発症に関与する *ALK* 遺伝子異常が 2007 年に日本において同定され、以後急速に *ALK* 遺伝子異常を示す肺腺癌の症例が蓄積されつつある。*ALK* 遺伝子異常はもともと悪性リンパ腫において見出された遺伝子異常であり、血液疾患領域においては既に分子標的療法のストラテジーが確立されつつある。*ALK* 遺伝子異常を伴う肺癌については近年発見がなされたばかりの疾患単位であることから、その詳細な臨床病理学的特徴は未だ十分に解明されているとは言いが、これを明らかにし適切な診断を行うことができれば、既に悪性リンパ腫治療に用いられている治療戦略を肺癌治療に応用可能と推測されることから、現時点での肺癌有病者の治療に早急な有益性を獲得し得る重要な検討課題と考えられる。そこで、本研究執行期間中に検討し得た新規肺腺癌症例に関して、新規に開発された高感度免疫組織化学法である iAEP 法によって *ALK* 遺伝子異常について解析を行った。*ALK* 遺伝子異常を示す肺腺癌では粘液産生を示す印環細胞癌の形態を示すものが多いことが報告されているが、このような形態を示す症例は肺腺癌においては稀である。そこで、我々が本研究執行期間中に経験した、亜区域気管支内腔

にポリープ状に発育するいわゆる endobronchial polypoid adenocarcinoma の像を示すととも末梢肺組織中に印環細胞癌の形態を示して浸潤する特異な肺腺癌の 1 例において、*ALK* 免疫染色 (iAEP 法) を行ったところ、癌細胞が陽性に染色されることを見出した (図 1～8)。

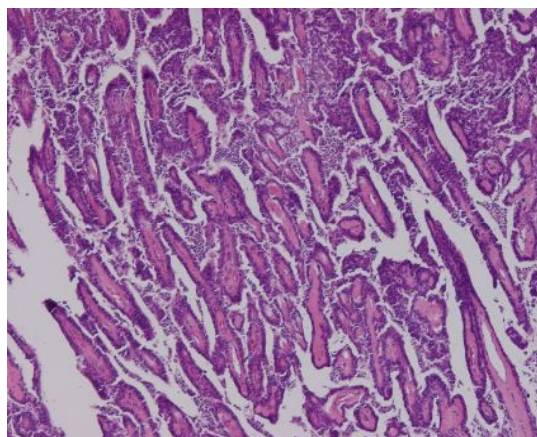


図 1. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像 (H&E 染色)

亜区域気管支内腔に乳頭状に増殖する腺癌組織を認める。

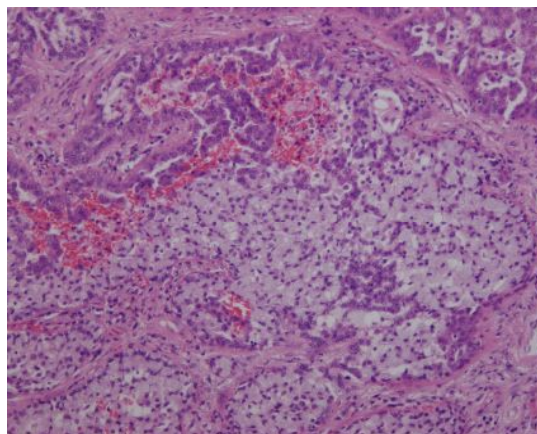


図 2. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像 (H&E 染色)

末梢肺組織に浸潤する部分では、細胞質内に粘液を貯留する印環細胞癌の形態を示している。*ALK* 遺伝子変異を伴う肺腺癌に典型的とされる所見。

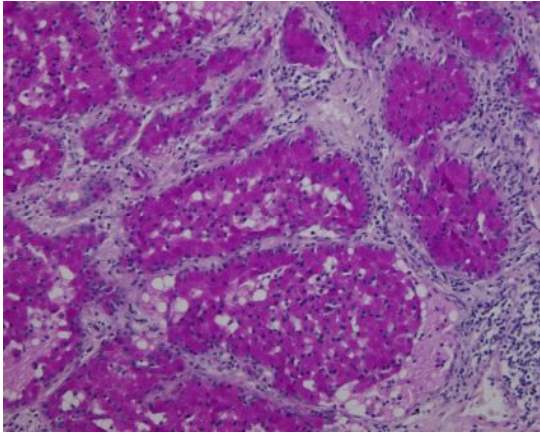


図3. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像(ジアスターゼ消化 PAS 染色)

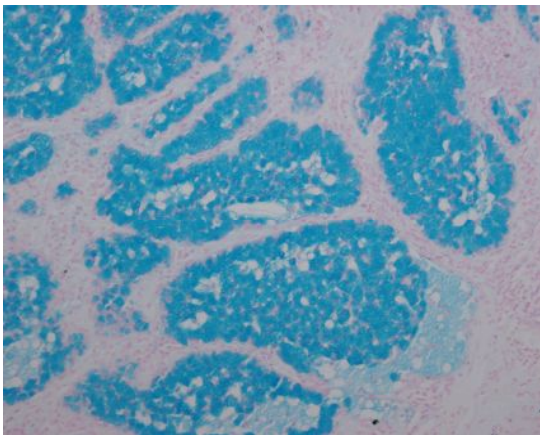


図4. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像(alcian-blue 染色)

印環細胞癌部分では、ジアスターゼ消化 PAS 染色および alcian-blue 染色にて癌細胞の胞体内に豊富な粘液を認める。

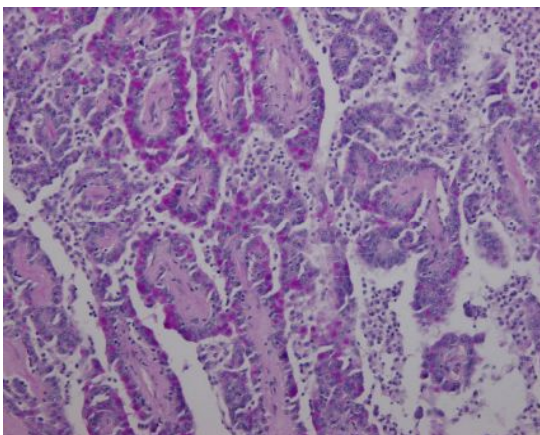


図5. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像(ジアスターゼ消化 PAS 染色)

気管支腔内の乳頭型腺癌部分においても、少数ながら粘液細胞の混在が認められる。

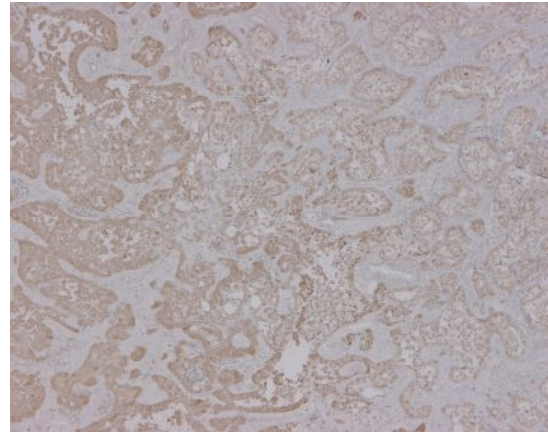


図6. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像(ALK 免疫染色, iAEP 法)

癌細胞は、ALK 免疫染色陽性を示している。

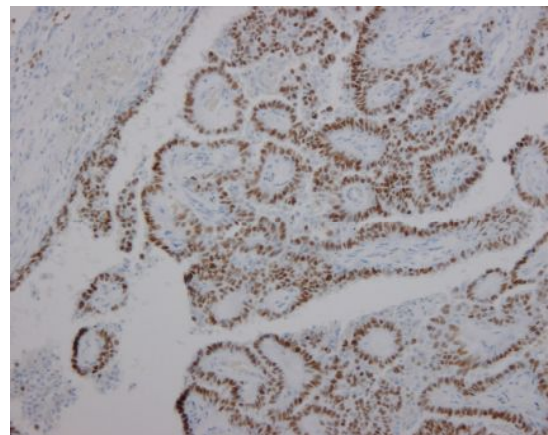


図7. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像(TTF-1 免疫染色)

癌細胞は、TTF-1 陽性を示している。

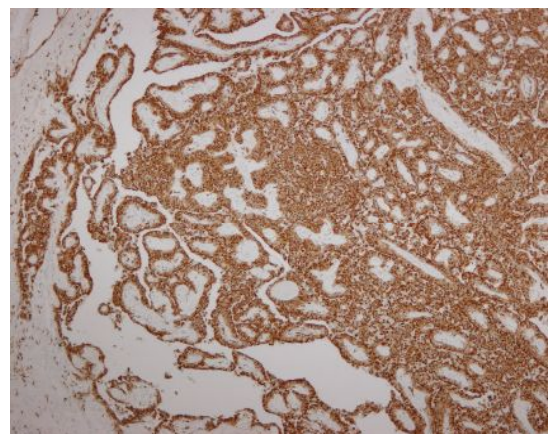


図 8. *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌病理組織像
(Napsin A 免疫染色)

癌細胞は、Napsin A 陽性を示している。

TTF-1 および Napsin A はともに末梢気管支上皮～Ⅱ型肺胞上皮のマーカーとして知られているが、本症例では原発部位である太い気管支の内腔部分においてこれらのマーカー陽性所見を認めることから、これらは aberrant な発現を示しているものと考えられる。

Endobronchial polypoid adenocarcinoma の形態を示した *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌の報告はこれまでになく、我々が見出した症例は *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌の腫瘍発生に示唆を与える興味深い症例であると考えられた。本症例では、太い気管支の表面上皮を癌細胞が置換する上皮内癌の像が認められたことから、亜区域気管支表面上皮が癌の発生母地と考えられる。このような上皮内癌の部分においても癌細胞は *ALK* 免疫染色陽性を示していることから、発癌の早期の段階において既に *ALK* 遺伝子変異が関与しているものと推測される。また、癌細胞は上皮内癌部分および印環細胞の形態を示す浸潤癌部分ともに、末梢気管支上皮～Ⅱ型肺胞上皮のマーカーとされる TTF-1 および Napsin A を発現していたが、これらの分子は aberrant に発現した可能性が高いものと考えられ、このような形質の発現が *ALK* 遺伝子変異陽性肺癌に共通する特徴であるかについても検討を要するものと考えられた。本症例に関しては、現在 RT-PCR 法および FISH 法によって *ALK* 遺伝子異常の確認を施行中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大出貴士, 岸本 充, 廣島健三, 溝渕輝明, 鈴木 実, 吉野一郎, 中谷行雄. 印環細胞癌への分化を伴った *ALK* 陽性 endobronchial polypoid adenocarcinoma の 1 例. 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日, 東京
- ② Takashi Oide, Michiyo Kambe, Kenzo Hiroshima, Hajime Tamura, Yasumitsu Moriya, Hidehisa Hoshino, Kiyoshi Shibuya, Ichiro Yoshino, Mari Mino-Kenudson, Eugene J. Mark, Yukio Nakatani. A case of primary intrapulmonary meningioma. 第 55 回日本病理学会秋期特別総会 2009 年 11 月 19 日, 東京
- ③ 大出貴士, 廣島健三, 米盛葉子, 谷澤 徹, 安福和弘, 渋谷 潔, 吉野一郎, 中谷行雄. 左気管支下幹原発の glomus tumor の 1 例. 第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 17 日, 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大出 貴士 (OIDE TAKASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00422246