

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591822

研究課題名（和文） 肺癌個別化医療を目指した肺癌再発予測診断システムの構築

研究課題名（英文） Prediction of postoperative recurrences by gene expression profiling in patients with primary resected lung cancer

研究代表者

伊豫田 明 (IYODA AKIRA)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10382548

研究成果の概要（和文）：13 例の大細胞神経内分泌癌（以下 LCNEC）に関して、分子標的治療となるマーカーの遺伝子変異、蛋白発現解析を行った。c-kit、EGFR、K-ras に関しては遺伝子変異、c-KIT、HER-2、VEGF については免疫染色により蛋白発現、さらに EGFR と HER2 に関しては FISH 法による遺伝子発現を解析して、その結果を腺癌症例 14 例と比較検討した。結果として VEGF の発現は LCNEC 症例で全例認められた。HER2 の発現は腺癌症例において HER2 スコア 1+ の発現が多くみられたが、HER2 スコア 2+以上の過剰発現については LCNEC 症例の 2 例にのみ認められた。EGFR 遺伝子変異は、腺癌症例において有意に高頻度に存在しており、LCNEC 症例では 1 例 (exon18) しか認められなかった。LCNEC 症例では、c-KIT の発現を 76.9%に認め、腺癌症例と比較して有意に高頻度であったが、c-kit 遺伝子変異は認められなかった。LCNEC 症例では、VEGF 発現と c-KIT 発現が高頻度で、一部の症例では HER2 の高発現が認められることから、VEGF、c-KIT や HER2 を標的とした治療が有効な可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We analyzed LCNEC gene expression, gene mutation and immunohistochemical expression of known molecular targets and compared expression to that of lung adenocarcinomas. We analyzed 13 patients with primary LCNEC and 14 patients with adenocarcinoma (AC). We evaluated immunohistochemical (IHC) expression for c-KIT, human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), and vascular endothelial growth factor (VEGF), gene mutation for EGFR, K-ras and c-kit, and gene expression using fluorescence in situ hybridization (FISH) for EGFR. In cases with LCNEC, the IHC expression of c-KIT, HER2, and VEGF were 76.9%, 30.8%, and 100%, respectively. There was a significant difference in IHC expression in c-KIT and HER2 between LCNEC and AC. Two cases of LCNEC had overexpression of HER2, and EGFR gene mutation was greater in the AC group, with only a single EGFR mutation (exon 18) identified in the LCNEC group. Although LCNEC had a higher rate of expression of c-KIT by IHC, no c-kit gene mutations were found. These findings suggest a potential role for Anti-VEGF, Anti-c-KIT, and possibly Anti-HER2 targeted agents in the treatment of LCNEC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肺癌、テーラーメイド治療、予後、組織型

1. 研究開始当初の背景

肺癌は現在本邦における死亡率第一位の悪性腫瘍である。女性喫煙者の増加や、女性の肺癌患者の増加とともに今後も肺癌全体の患者数の増加が予想されている。行政により検診が広く行われ、早期発見、早期治療に対する努力がなされているにもかかわらず早期肺癌症例は少なく、依然として肺癌の根治切除可能な症例の割合は低い。また、術前に早期肺癌と診断し、根治的手術を施行した患者においてもその20%にリンパ節転移や再発例を認める。その理由は、肺癌は組織型をはじめとして多様な病態であるにも関わらず、現時点でも小細胞癌、非小細胞癌という非常に単純な枠組みで治療方法が決められており、個々の病態に対応できないことが一因であると考えている。例えば肺癌に対する薬剤感受性に関しては、Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)である gefitinib (イレッサ)が、東洋人、女性、腺癌、非喫煙者に有効であり (J Clin Oncol 2003, 21, 2237-46, JAMA 2003, 290, 2149-58) さらに EGFR の exon 18-21 における変異や EGFR 遺伝子増幅がその反応性と関連している可能性が報告され (N Engl J Med 2004, 350, 2129-39, Science 2004, 304, 1497-00, J Natl Cancer Inst

2005, 97, 643-55)、また、小細胞癌に対して CDDP+CPT-11 が日本人に有効であるのに対して (N Engl J Med. 2002;346:85-91)、海外の試験では有意差が認められなかったことは (J Clin Oncol. 2006;24:2038-43, ASCO 2008 abs#7512)、治療に対する反応性が、人種、性別、組織型、さらに遺伝子型などによって違うことを証明することとなった。今後、肺癌に対する根治的治療の可能性を広げ、その予後を改善するためには、単に、小細胞癌、非小細胞癌という単純な枠組みでなく、分子生物学的手法を用いた新しい診断基準に基づくアプローチが必要である。

このような背景のもと、われわれは、以前からの研究課題である基盤研究 (C) (2)15591467 (平成15年度-平成16年度)、基盤研究 (C) (2)17591458 (平成17年度-平成18年度)、基盤研究 (C) 19591610 (平成19年度-平成20年度) において肺癌の外科切除標本 (原発巣) を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を行い、肺癌患者100例のプロファイリングを取得した。その後、患者の経過を丹念に追跡し、肺癌の組織型、リンパ節転移の有無、再発の有無により、肺癌原発巣の遺伝子発現パターンが異なることを見出した。具体的には肺扁平上皮癌と肺腺癌、病理組織学的にリンパ節転移陽性の肺癌とリン

パ節転移陰性の肺癌、さらに術後早期に再発する肺癌と再発がみられない肺癌では異なった遺伝子発現パターンを示すことである。(Lung Cancer 2009;64:86-91)。この研究は従来の病理学に、最新のゲノム科学の方法論と知識を加味することで、より精度の高い診断が可能となることを示した画期的な研究である。現在肺癌は、術前の画像診断と、術後の病理組織学的診断をもとに、TNM 分類にしたがって、病期分類しているが、今後、これらにゲノム医学の手法を加えることにより、分子生物学的 TNM 分類と言えるような、従来よりもさらに予後と密接に関連した病期分類を新たに構築できる可能性が考えられる。このように患者の病態を個人のゲノムレベルで診断できるようになることによって、術前や、術後早期に悪性度の高い肺癌と予測され、術後再発病巣の出現が強く疑われる場合には手術単独ではなく、術後に全身化学療法や放射線療法などを併用した積極的な集学的治療を行い予後の改善を図り、一方、悪性度の低い肺癌と考えられる場合には、標準治療よりも、より低侵襲の治療を行い、早期回復を図ることにより、高危険群においても合併症を予防できる可能性があり、治療の選択肢を広げることができる。このように、肺癌に対する画一的な治療の枠を超えて、個々の患者に対応しうる多様性をもったテーラーメイド医療を遂行することができるようになり、治療をより有効に無駄なく行える点で患者はもちろん医療経済にとっても大きなメリットとなる。

2. 研究の目的

本研究は、個人のゲノムレベルで診断することによって、治療の選択肢を広げるような個々の患者に対応しうる多様性をもったテーラーメイド医療を遂行することができ

るように、治療をより有効に無駄なく行える手法を開発することを目的とする。

。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

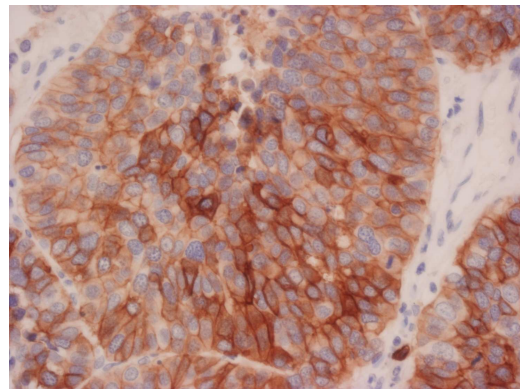
本研究に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する申請書を北里大学倫理審査委員会へ提出し、審査を受けずで承認済みである(平成20年10月10日 受付番号B倫理08-32)。肺癌と診断され、治療目的に北里大学病院呼吸器外科の入院となり同意を得られた患者を対象とし、以下に示す手順にて治療を行い、検体を採取した。1) 術前に研究する説明を行い、同意を得る。同意書に署名があることを確認する2) 手術により標本を摘出し、DNA と RNA 抽出用の凍結標本を腫瘍部位と正常肺部位から採取し、冷凍庫に保存する3) 病理組織的検索と DNA 抽出のため、ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を作成する。

(2) 既知の癌関連性遺伝子との関連の検討

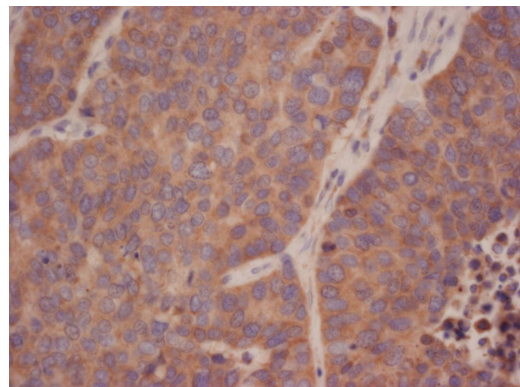
採取した組織検体に対して、以下の方法を用いて検討した。epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 18-21 における変異を Direct Sequence 法を用いて検出を行い、EGFR 遺伝子増幅は FISH 法により検出した。K-ras 遺伝子変異は、codon12, 13 を中心に、Direct Sequence 法にて検出を行った。HER2 の過剰発現解析に関しては、免疫染色により蛋白発現を解析し、関連が疑われた場合にはさらに、FISH 法によって HER2 遺伝子増幅を検討する。c-KIT、VEGF に関しては、免疫染色を行い、蛋白発現を中心に研究した。さらに c-KIT 高発現例に関しては、c-kit 遺伝子の exon 9, exon 11, exon 13 と exon 17 の遺伝子変異を検討した。

4. 研究成果

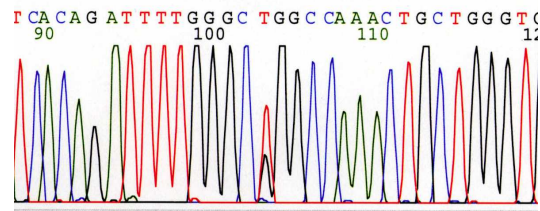
大細胞神経内分泌癌において、c-KIT の発現 (図 1) が腺癌と比べて有意に高頻度であったが、c-kit 遺伝子変異はみられなかった。VEGF の発現 (図 2) は大細胞神経内分泌癌、腺癌ともに高頻度であり、有意差を認めなかった。EGFR 遺伝子変異 (図 3) は大細胞神経内分泌癌に比べて腺癌において有意に高頻度で、大細胞神経内分泌癌では EGFR 遺伝子の exon 19、exon21 には明らかな変異は認められなかった。K-ras 遺伝子変異 (図 4)、FISH 法による EGFR 高発現 (図 5) も腺癌にのみみられた。また、肺大細胞神経内分泌癌にのみ HER2 蛋白の過剰発現 (図 6) がみられ、HER2 遺伝子の過剰発現を FISH 法にて検討したが遺伝子の過剰発現は認められなかった。以上のことから、肺癌においては組織型別に molecular marker の発現、変異に違いがあるため、分子標的治療薬の選択には組織型に配慮する必要があると考えられた。以上の結果は「Iyoda A, Travis WD, et al. Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. Exp Ther Med 2011;2: 1041-1045」として論文作成し、掲載された。さらに付随研究として「Iyoda A, Hiroshima K, et al. Predictors of postoperative survival in patients with locally advanced non-small cell lung carcinoma. Surgery Today 2010; 40: 725-728」 「Iyoda A, Jiang SX, et al. Prediction of postoperative exacerbation of interstitial pneumonia in patients with lung cancer and interstitial lung disease. Exp Ther Med 2011;2: 1073-1076」を論文作成し、掲載された。



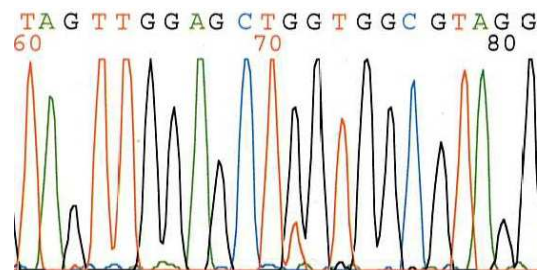
(図 1 Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045 より引用) c-KIT 発現



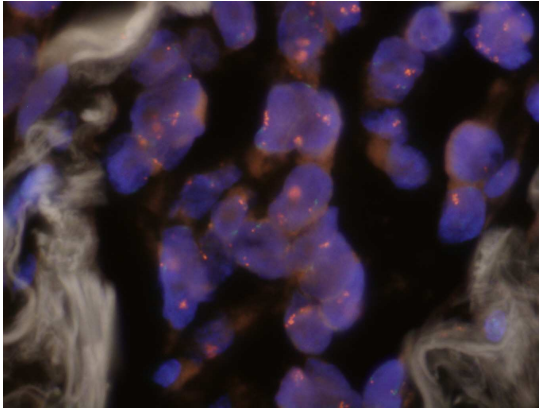
(図 2 Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045 より引用) VEGF 発現



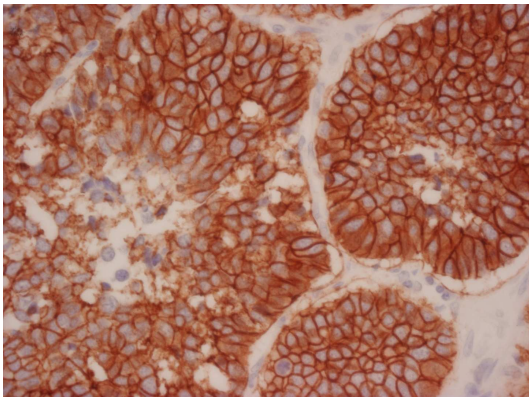
(図 3 Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045 より引用) EGFR 遺伝子変異 (腺癌)



(図 4 Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045 より引用) K-ras 遺伝子変異 (腺癌)



(図 5 Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045
より引用) EGFR-FISH 高発現 (腺癌)



(図 6 Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045
より引用) HER2 発現

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 4 件)

- ① Rusch VW, 伊豫田明, 吉村博邦, 佐藤之俊, 早川和重. The current status and future direction of surgical treatments for lung cancer. 肺癌 2010 ; 50 : 253-264
- ② Iyoda A, Hiroshima K, Moriya Y, Yoshida S, Suzuki M, Shibuya K, Yoshino I. Predictors of postoperative survival in patients with locally advanced

non-small cell lung carcinoma. Surgery Today 2010; 40: 725-728

- ③ Iyoda A, Travis WD, Sarkaria IS, Jiang SX, Amano H, Sato Y, Saegusa M, Rusch VW, Satoh Y. Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. Exp Therap Med 2011; 2: 1041-1045
- ④ Iyoda A, Jiang SX, Amano H, Ogawa F, Matsui Y, Kurouzu N, Hara H, Nezu K, Mikami T, Saegusa M, Satoh Y. Prediction of postoperative exacerbation of interstitial pneumonia in patients with lung cancer and interstitial lung disease. Exp Therap Med 2011; 2: 1073-1076

[学会発表] (計 7 件)

- ① Iyoda A, Jiang SX, Ijima D, Nezu K, Ogawa F, Matsui Y, Amano H, Hara H, Okayasu I, Masuda N, Hayakawa K, Yoshimura H, Satoh Y. Postoperative recurrence and the prognosis in patients with pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. 13th World Conference on Lung Cancer. 2009/8/2. San Francisco, USA
- ② 伊豫田明、秋山啓輔、小川史洋、伊藤諭子、松井啓夫、天野英樹、原 英則、根津賢司、吉村博邦、佐藤之俊. 間質性肺炎合併肺癌における術後急性増悪関連因子の検討. 第 27 回 日本呼吸器外科学会総会. 2010/5/13. 仙台国際センター (宮城県)
- ③ 伊豫田 明、蔣 世旭、根津賢司、小川史洋、松井啓夫、天野英樹、原 英則、岡安 勲、益田典幸、早川和重、吉村博

邦、佐藤之俊. 肺癌治療のスタンダード-外科治療と補助療法との組み合わせ-肺大細胞神経内分泌癌の治療経験から. 第110回 日本外科学会定期学術集会. 2010/4/10. 名古屋国際会議場 (愛知県)

- ④ 伊豫田 明、小川史洋、松井啓夫、天野英樹、久朗津尚美、原 英則、根津賢司、吉村博邦、佐藤之俊. 肺大細胞神経内分泌癌切除症例における術後再発の検討. 第63回 日本胸部外科学会定期学術集会. 2010/10/27. 大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑤ 伊豫田明、蔣 世旭、根津賢司、小川史洋、松井啓夫、天野英樹、原 英則、久朗津尚美、益田典幸、早川和重、佐藤之俊. 肺大細胞神経内分泌癌に対する分子標的治療を目的とした遺伝子変異、蛋白発現解析. 第51回 日本肺癌学会総会・ワークショップ. 2010/11/4. 広島国際会議場 (広島県)
- ⑥ 伊豫田明、蔣 世旭、根津賢司、小川史洋、松井啓夫、天野英樹、原 英則、久朗津尚美、益田典幸、早川和重、佐藤之俊. 肺大細胞神経内分泌癌に対する遺伝子変異、蛋白発現解析. 第111回 日本外科学会定期学術集会. 平成23年5月26日-28日. 誌上発表 (予定 東京)
- ⑦ 伊豫田明、蔣 世旭、山崎宏継、石井 大、中島裕康、小川史洋、松井啓夫、塩見 和、原 英則、久朗津尚美、益田典幸、早川和重、佐藤之俊. 肺神経内分泌腫瘍に対する手術および術後補助療法に関する検討. 第52回 日本肺癌学会総会. 2011/11/3. 大阪国際会議場 (大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊豫田 明 (AKIRA IYODA)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：10302548

(2) 研究分担者

佐藤之俊 (YUKITOSHI SATOH)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：90321637

天野英樹 (HIDEKI AMANO)
北里大学・医学部・助教
研究者番号：60296481