

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25年4月1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590531

研究課題名（和文）EGFR 遺伝子変異検査方法の精度向上を図り肺癌の個別化治療を樹立する

研究課題名（英文）ESTABLISH THE INDIVIDUALIZED TREATMENT ON LUNG ADENOCARCINOMA USING THE *EGFR* GENE MUTATION ANALYSIS.

研究代表者

中村 洋一（NAKAMURA YOICHI）

長崎大学・医歯薬総合研究科・講師

研究者番号：20432974

研究成果の概要（和文）：mixed-type 肺腺癌の病理亜型に従ってマイクロダイセクションを行い、病理亜型毎に EGFR 遺伝子の変異解析を行った。その結果、EGFR 遺伝子変異陽性症例 38 例中 9 例に組織亜型に沿って遺伝子変異の heterogeneity が指摘できた。Heterogeneity の認められた症例は喫煙歴との相関が高かった。同一症例における EGFR-TKI に対する治療効果の病変毎のばらつきの理由が示されたと考える。

研究成果の概要（英文）：Intra-tumor heterogeneity of *EGFR* mutations in patients with mixed-type lung adenocarcinoma was analyzed according to the distribution of histological subtypes. Intra-tumor heterogeneity of *EGFR* mutations was detected in 9 of 38 tumors, and there was a significant correlation between heterogeneity of *EGFR* mutations and smoking history ($P < 0.043$).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査

キーワード：遺伝子検査学

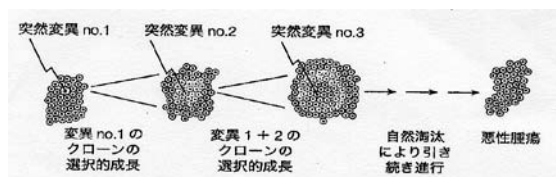
1. 研究開始当初の背景

EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (gefitinib, erlotinib) は、非小細胞肺癌を対象とする分子標的薬である。本薬剤は、その標的受容体である EGF 受容体上の ATP 結合部位における特定の遺伝子に変異が生じた場合、非常に高い抗腫瘍活性を発揮することが知られており、現在ではその遺伝子変異は効果予測因子として考えられるようになって

た。この EGF 受容体の遺伝子変異は、通常同一腫瘍内において一様に分布していると考えられてきた。しかし、申請者はこれまでに、同一症例に同時期に併発した 2 つの原発性肺癌において、各々異なるタイプの EGF 受容体遺伝子変異が存在することを報告した (Nakano H, et al. Lung Cancer 60:136-40, 2008.)。また、未治療例においても、治療前から感受性変異と耐性変異が混在

していることが報告された。(Maheswaran S, et al. NEJM 359:366-77, 2008.)。ひとつの癌組織内における個々の細胞間での遺伝子の多型性 (polymorphism) の存在については、現在は遺伝子変異による多段階発癌モデルによって説明されている (下図)。

今回、申請者らは EGF 受容体遺伝子においてもこの多段階発癌モデルに準じた遺伝子変異の積み重ねによる多型性が存在し、による多型性が存在し、それが各症例における予後と関連するのではないかと仮説をたてた。その仮説の元、切除後の肺腺癌患者の切り出し検体を、その組織パターン別にマイクロ・ダイセクションを行い、同一症例における遺伝子変異多型の解析を行うものとした。この遺伝子変異多型解析についても、現在複数の方法が行われており、その精度比較が十分なされていないので、それらの精度比較を合わせて行うものとした。



2. 研究の目的

本研究の目的は、非小細胞肺癌組織内に、EGF 受容体遺伝子変異の多型性が存在することを証明することにある。本研究によって、同一症例においても、その EGF 受容体遺伝子変異の発現が均一でないことが証明されれば、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬の使用において、その発現パターンを念頭に置いた非小細胞肺癌の個別化治療の構築が可能となる。また、EGF 受容体遺伝子変異の多型性とその予後との相関が認められれば、そのことを念頭に置いた EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬のあらたな臨床応用 (術後再発予防や化学療法後の地固め療法) が可能となる。さらに、現在広く行われている複数の遺伝子解析 (PCR 方法) の精度の直接比較が行われ、検査の感度、特異度の厳密な評価ができるようになる。

3. 研究の方法

(1) 研究対象: 当院にて切除をうけた非小細胞肺癌の症例で、切除切片内に、組織学的な多型 (Acinous, Papillary, Alveolar, など) を有するもの。年齢が 20 歳以上の症例。本研究についての説明を十分に理解し、文書によって参加の同意が得られる症例。

(2) 症例数および試験期間: 50 例を目標とし、登録期間 (集積) は 2 年間とする。

(3) EGF 受容体遺伝子変異解析: 当院に保管してある、非小細胞肺癌 (混合型腺癌) の外科的切除後のパラフィン包埋切片から DNA 抽出用の薄切切片をマイクロダイセクション用のフォイル付きスライドガラスに作成する。その切片において、Acinar、Papillary、Bronchioalveolar carcinoma などの組織形態の分布を確認し、その組織形態毎に、癌細胞のみを慎重に Application Solutions Laser Microdissection System (AS LMD) を用いマイクロ・ダイセクションする。そのマイクロ・ダイセクションによって分離切除された各切片より DNA 抽出剤 (takaraDEXPAT®) を用いて、癌細胞の DNA を抽出する。対象とする EGF 受容体遺伝子多型は、Exon 18 の G719A、Exon 19 部分欠失、Exon 20 の T790M、Exon 21 の L858R の点突然変異、K-ras 変異である。PCR 法については、RFLP 法、PNA-LNA Clamp 法、PCR-Invader 法の、現在我が国で広く採用されている PCR 法で同一検体を解析し、その感度特異度を解析する。この内、RFLP 法については、独自に作成した primer pair を用い、Exon 19 欠失に対しては、変異のない塩基配列を切断する制限酵素 (MseI) を用いて、1st PCR-RFLP を行い変異のない対立遺伝子を大部分取り除いた後、2nd PCR を行い変異のある mutant allele を選択的、有意に増幅させた産物の電気泳動を行う。遺伝子変異の有無は、泳動時の切断の有無で判定すると同時に 2ndPCR 産物を direct sequencing し判定する。Exon20 に対しては、制限酵素 BstUI を用いて 1st PCR-RFLP を行い対立遺伝子を取り除いた後、2nd PCR 産物に direct sequencing を行い判定する。Exon21 に対しては、制限酵素 MscI を用いて 1st PCR-RFLP を行い変異のない対立遺伝子を取り除いた後、変異のある mutant allele を選択的に増幅して変異のある塩基配列を制限酵素 (AsuI) で切断する 2nd PCR-RFLP を行う。遺伝子変異の有無は、産物を制限酵素で切断後、電気泳動を行い判定するとともに、2nd PCR 産物を direct sequencing し判定する L858R に対しては PCR-RFLP 法を用いる。制限酵素は G719A については Ban II、L858R については Asu I を用いて判定する。電気泳動で PCR 産物を確認し判定する。

(4) 患者の臨床情報の収集: 基本情報 (性、年齢、喫煙歴、PS など)、臨床病期、病理病期、生存期間 (Progression-free

survival, Overall survival)、再発後の治療の有無、再発後の治療の効果、有害事象等の臨床情報を収集する。

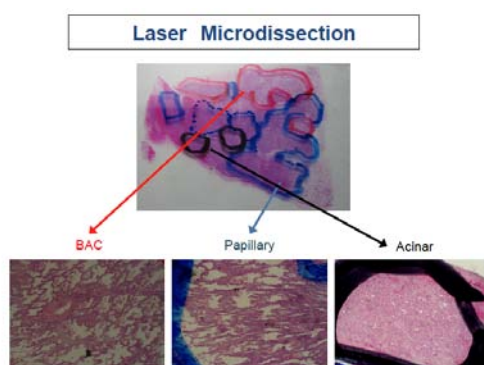
(5) 統計解析：EGF 受容体遺伝子変異の有無および同変異の多型性の有無と患者情報との関連解析を行う。また、生存期間 (Progression-free survival, Overall survival) については単変量解析および Kaplan-Meier 法による生存率曲線を描き、Log-rank 検定を行う。多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いて評価する。

4. 研究成果

(1) 症例：長崎大学病院で 2002 年から 2005 年に手術が施行された病理病期が stageIA, IB の原発性肺癌 241 例を対象とした。そのうち肺腺癌は 181 例であった。その中で肺葉切除の対象となった 145 例の病理型を検討した結果、54 例が組織学的な多型を有する混合型腺癌 (mixed type adenocarcinoma) と診断された。54 例中 10 例を、85 歳以上、アスベスト-シス合併、未分化領域が存在するなどの理由で除外した。44 例を対象として解析を行ったが、44 例中 6 例から十分量の DNA を抽出することができなかつたために、最終的に 38 例を解析対象とした。

(2) 背景：38 例に関して、年齢中央値は 68 歳 (39 歳から 83 歳まで)、男性は 16 名で女性は 22 名、病期は stageIA が 30 例、stageIB が 8 例であった。喫煙歴は 24 例が非喫煙者で 14 名が喫煙者であった。

(3) マイクロダイセクション：図のように、混合型腺癌の術後検体 (パラフィン包埋標本) で異なる病理亜型 (BAC, Papillary, Acinar) が存在する部位を顕微鏡的に確認し、その部位に沿ってマイクロダイセクションを行う (図参照)。

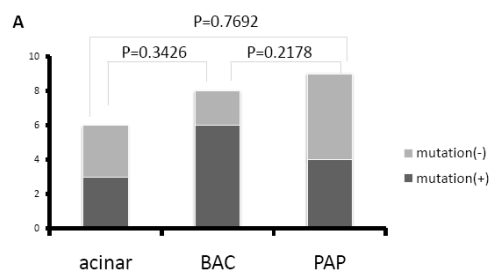


(4) 遺伝子解析の結果：マイクロダイセクションによって得られた病理亜型毎の検体より別々に DNA を抽出し、EGF 受容体の遺伝子

変異解析を行った。その結果、38 例中 19 例に EGF 受容体遺伝子変異を認めた。遺伝子変異の検出について患者背景別に関連解析を行ったが、年齢、性別、病期、喫煙歴で関連のあるものは認めなかつた。次に、腫瘍内における EGF 受容体遺伝子変異の heterogeneity について解析を行った。その結果、9 例において腫瘍内における EGF 受容体遺伝子変異の体遺伝子の heterogeneity が見つかった。

case ID	papillary subtypes	acinar subtypes	BAC subtypes
1	L858R	-	wild type
2	ex19 del	wild type	-
3	L858R	ex19 del, L858R	L858R
4	wild type	ex19 del	wild type
5	wild type	-	ex19 del, L858R
6	wild type	wild type	ex19 del
7	wild type	-	ex19 del
8	wild type	ex19 del	ex19 del
9	L858R	wild type	L858R

遺伝子変異は Papillary や Acinar と比較して BAC にやや多く認められたが、統計学的な有意差は無かつた。



一方で腫瘍内の heterogeneity は喫煙歴を有する症例に有意に多く認められた (P=0.043)。Progression-free survival, Overall survival と EGF 遺伝子変異陽性および変異の heterogeneity との統計学的な関連は認めなかつた。

これらの結果は、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬による治療を受けた症例の抗腫瘍活性が同一症例でも病巣によって異なることがあること、同一症例でも異なる部位から生検をした際に EGF 受容体遺伝子変異の出現に差が生じることがあることが一定の割合で生じること示したものである。これによって、EGF 受容体遺伝子変異陽性症例であっても複数の治療薬を併用して治療した方がよりよい治療効果を得られる可能性があることが示唆された。これらの事実は、今後の個別化治療確立のため臨床応用できると考える。

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 9 件)

- ① Nakamura Y, Sano K, Soda H, et al.: Pharmacokinetics of gefitinib predicts antitumor activity for advanced non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 5: 1404-9, 2010. 査読有
- ② Ide S, Soda H, Nakamura Y, et al.: Interstitial pneumonia probably associated with sorafenib treatment: An alert of an adverse event. Lung Cancer 67: 248-50, 2010. 査読有
- ③ Ogawara D, Fukuda M, Nakamura Y, et al.: Efficacy and safety of amrubicin hydrochloride for the treatment of relapsed small cell lung cancer. Cancer Manag Res 2: 191-195, 2010. 査読有
- ④ Nakamura Y, Soda H, Nakatomi K, et al.: Randomized phase II trial of irinotecan with paclitaxel or gemcitabine for non-small cell lung cancer: association of UGT1A1*6 and UGT1A1*27 with severe neutropenia. J Thorac Oncol 6: 121-127, 2011. 査読有
- ⑤ Yamaguchi H, Nakamura Y, Nakatomi K, et al.: Serum levels of surfactant protein D predict the anti-tumor activity of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 67: 331-338, 2011. 査読有
- ⑥ Ikeda T, Nakamura Y, Kohno S, et al.: Superior vena cava syndrome caused by adult T-cell leukemia/lymphoma: a case report. Acta Med Nagasaki 56: 59-61, 2011. 査読有
- ⑦ Fukuda M, Nakamura Y, Kohno S: Phase II study of irinotecan and cisplatin with concurrent split-course radiotherapy in limited-disease small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 70: 645-651, 2012. 査読有
- ⑧ Takatani H, Nakamura Y, Nakatomi K, et al.: Phase I and II trials of vinorelbine with carboplatin for patients 75 years of age or older with previously untreated non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 13:347-351, 2012. 査読有
- ⑨ Ikeda T, Nakamura Y, Nakatomi K, et al.: Direct comparison of 3 PCR

methods in detecting EGFR mutations in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 13: 369-374, 2012. 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① Tononaga N, Nakatomi K, Nakamura Y, et al.: The analysis of EGFR genetic heterogeneity on mixed adenocarcinoma of the lung. 101th American Association for Cancer Research (101th AACR), Washington DC, USA, April 19, 2010.
- ② Tomonaga N, Nakamura Y, Yamaguchi H, et al.: Analysis of intra-tumor heterogeneity of EGFR mutations in mixed-type lung adenocarcinoma. The 14th International Association for the Study of Lung Cancer (14th IASLC) Amsterdam, Holland, July 5, 2011.
- ③ 中村洋一、朝永七枝、山口博之、その他: 肺腺癌における EGFR 遺伝子変異の同一腫瘍内での遺伝子変異多型分布の解析。第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)
該当なし

○取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 洋一 (NAKAMURA YOICHI)
長崎大学・医歯薬総合研究科・講師
研究者番号: 20432974

(2) 研究分担者

中富 克己 (NAKATOMI KATSUMI)
長崎大学・長崎大学病院・助教
研究者番号: 90457531

(3) 連携研究者

該当なし