

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790425

研究課題名(和文) 肺癌における免疫染色を用いた新しいEGFR遺伝子変異検出法の確立

研究課題名(英文) Establish of new detection of EGFR mutation status using immunostaining in non-small cell lung cancer

研究代表者

河原 明彦 (Kawahara, Akihiko)

久留米大学・大学病院・臨床検査技師

研究者番号：00469347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞性肺癌と診断された133患者を対象に、PNA-LNA PCR clamp assay(PCR)と免疫組織・細胞化学を施行した。免疫染色の結果は、陽性判定37患者(27.8%)、陰性判定85患者(63.9%)であり、不確かな判定が11患者(8.3%)みられた。PCR法との相関性は、陽性判定で94.6%、陰性判定で90.6%の一致率であった。EGFR-TKI治療がなされた42患者において、EGFR遺伝子変異抗体陽性患者は陰性患者に比べ、再発期間の延長を認めた( $P = 0.002$ )。これらの結果より、EGFR遺伝子変異抗体を用いた免疫染色は、患者治療に役立つ新しい迅速な検出方法である。

研究成果の概要(英文)：To establish a testing algorithm for EGFR mutation status in NSCLC patients, we utilized PNA-LNA PCR clamp assay and immunostaining. In the 133 samples, positive, negative and equivocal results for EGFR mutation-specific antibodies were observed in 37 patients (27.8%), 85 patients (63.9%) and 11 patients (8.3%), respectively. Thirty-seven patients showed positive EGFR expression by immunostaining, and 35 (94.6%) of these also tested positive in the DNA-based assay. Of 85 EGFR-negative patients by immunostaining, 77 (90.6%) also tested negative in the DNA-based assay. In NSCLC patients treated with EGFR-TKIs, the progression-free survival after the start of EGFR-TKIs treatment was significantly longer in patients with EGFR positive expression than in those with equivocal and negative expression ( $P = 0.002$ ). Our results suggest immunostaining for EGFR mutation-specific antibodies are a new test for EGFR-TKI inhibition and could be a useful indicator with regard to patient management.

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：病理学 免疫染色 EGFR遺伝子変異抗体

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界的に増加傾向をしめている癌の1つであり、特に女性肺癌の増加が著しい。近年、上皮増殖因子受容体(Epidermal growth factor receptor: EGFR)の遺伝子変異を伴う患者はイレッサやタルセバなどの抗がん剤に効果を示すことが明らかとなり、現在の肺癌治療にはEGFR遺伝子変異の確認は必要不可欠である。EGFR遺伝子変異を伴う肺癌患者は、非喫煙者・アジア人・女性・腺癌という特徴があり、本邦での肺癌患者の30~50%はこのEGFR遺伝子変異を有すると考えられている。EGFR遺伝子変異検索には、一般にダイレクトシーケンス法が用いられているが、特異性は高いが感度が低く、がん組織切片がなければ施行できないという大きな欠点がある。一方、我々は高感度であるpeptide nucleic acid - locked nucleic acid (PNA-LNA) polymerase chain reaction(PCR) clamp法を用いて肺癌EGFR遺伝子変異検出を試みている。

EGFR遺伝子変異検索においてダイレクトシーケンス法やPNA-LNA PCR clamp法は組織/細胞サンプルからDNA抽出を行い、特殊な機器を使用しなければならないため、検出時間に加えコストが掛かる。近年、EGFR遺伝子のエクソン19(delE746-A750)およびエクソン21(L858R)の変異を特異的に認識する抗体が発売され、どの肺癌細胞が遺伝子変異を伴っているのかが可視化できるようになった。本邦では我々が世界に向けていち早く報告した。さらに、進行肺癌患者はがん切除することができないため、微量の生検サンプルを用いた免疫組織化学においてEGFR遺伝子変異検索が可能であることを証明した。

### 2. 研究の目的

我々は、既に上述するEGFR遺伝子変異抗体の特異性と有効性を確認していたため、次に免疫組織/細胞化学を用いて迅速なEGFR遺伝子変異検出のためのアルゴリズムの確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 迅速なEGFR遺伝子変異検出のためのアルゴリズムを確立するための133患者情報や臨床所見、肺癌外科サンプル、細胞診サンプルは、通常の病理診断の中でルーチンに得る。イレッサ/タルセバの治療効果は内科・外科学から提供され、随時データの更新を行う。

(2) 肺癌患者のEGFR遺伝子変異の確認のために、EGFR遺伝子変異抗体を用いた免疫染色とPNA-LNA PCR clamp法を併用したDNA遺伝子解析を行い、それぞれの両者の相関を明らかにする。

組織および細胞サンプルの免疫染色(immunostaining)  
切除された組織を10%ホルマリン固定後、脱水処理し作成したパラフィンブロックを4μ

mの厚さで薄切し、コーティングガラスに切片をのせる。脱パラフィン後、内因性ペロオキシダーゼ処理を5分反応させる。pH9.0のクエン酸緩衝液を用いて熱処理を99 30分間行う。1次抗体は、EGFR specific 抗体のE746-A750del (200 × , #2085S; Cell Signaling)とL858R mutant specific (200 × , #3197S; Cell Signaling)を用いて4で1晩反応させる。2次抗体は、ChemMate ENVISION kit (DAKO)を用いて室温で30分反応させる。DABにて5分間発色し、対比染色はヘマトキシリンで核染色する。細胞サンプルは基本的に組織サンプルと同様のプロトコルを用いるが、1次抗体は室温で30分間の反応とする。

DNA 遺伝子変異解析:PNA-LNA PCR clamp 法

8μm×5枚の組織片あるいはアルコール固定された細胞サンプルからQIAamp DNA Micro kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いてDNAを抽出する。Invitrogen Inc (Carlsbad, CA)によって合成されたPCR primersとFASMEC (Kanagawa, Japan)から購入したLNA mutant probesをそれぞれSDS-7500 System (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて反応させる。エクソン19(delE746-A750)とエクソン21(L858R)の遺伝子変異は、陽性コントロールと同じピークを示した症例とする。

### 4. 研究成果

(1) EGFR 遺伝子変異特異的抗体を用いた染色結果

EGFR 遺伝子変異特異的抗体は組織および細胞材料共に、良好な染色性を示した。我々は133症例について染色標本を陽性(score 2+)、陰性(score 0)および判定不能(score 1+)のようにスコア化した結果(図1)、score 2+が37患者(27.8%)、score 0が85患者(63.9%)でscore 1+の判定不能が11患者(8.3%)であった。37陽性患者において、17患者(45.9%)がE746-A750del抗体陽性で、20患者(54.1%)がL858R Mutant Specific抗体陽性であった。判定不能であった11患者は、5患者(45.5%)がE746-A750del抗体に、6患者(54.5%)がL858R Mutant Specific抗体であった。さらに、判定不能であった11患者は、細胞材料が11患者中6患者(54.5%)みられ、切除および生検材料に比べやや高い比率を示した。

(2) DNA を用いた EGFR 遺伝子変異検索

次に我々はDNA検査をベースとしたEGFR遺伝子変異の検索を行った。免疫染色陽性であった37患者は35患者(94.6%)にDNA検査においても変異を認めた。一方、免疫染色陰性であった85患者は77患者(90.6%)にDNA検査においても変異を認めなかった。判定不能とした11患者は、DNA検査において8患者(72.7%)が遺伝子変異陽性であった。判定不能とした11患者を除くEGFR遺伝子変異特

異的抗体は、感度 81.4%、特性 97.5%、陽性的中率 94.6%、陰性的中率 90.6%であった。

(3) 肺癌治療前患者の T790M の検出  
133 患者において耐性遺伝子である T790M が認められた患者は 1 名(0.75%)のみだった。この患者は免疫染色および DNA 検査で L858R の遺伝子変異を示していた。

(4) ゲフィチニブを投与された 42 患者の臨床的特徴  
ゲフィチニブ/エルロチニブを投与された 42 患者において、平均年齢 70 歳 (range, 33-82) で 26 患者が女性、28 患者が非喫煙者であった。17 患者がエクソン 19 の遺伝子変異で、15 患者がエクソン 21 の遺伝子変異だった。EGFR-TKI 治療がなされた患者の 164.5 日 (10-637) の観察期間において、EGFR 遺伝子変異抗体陽性患者は陰性患者に比べ、再発期間の延長を認めた(P = 0.002) (図 2)。

これらの結果より、我々は免疫染色における EGFR 遺伝子変異抗体陽性患者は、EGFR-TKI 治療を迅速に投与できることを提案し、EGFR 遺伝子変異抗体を用いた免疫染色は、患者治療に役立つ新しい迅速な検出方法である (図 3)。

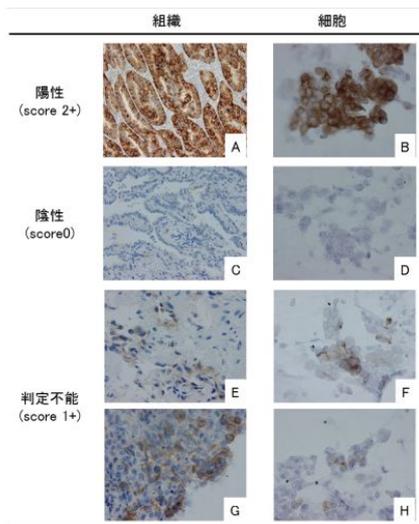


図 1. 免疫組織 / 細胞化学の所見

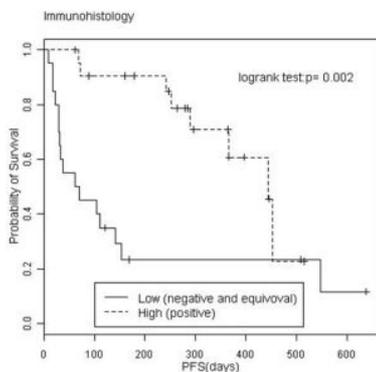


図 2. EGFR-TKI 治療の効果

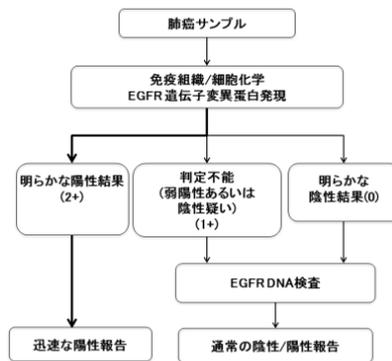


図 3. 免疫組織 / 細胞化学を用いたアルゴリズム

## 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 14 件)

Kanda R, Kawahara A, Watari K, Murakami Y, Sonoda K, Maeda M, Fujita H, Kage M, Uramoto H, Costa C, Kuwano M, Ono M. Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin 1/Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer Res.* 査読有, 73 巻, 2013, 6243-53.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4502.  
Yamashita F, Azuma K, Yoshida T, Yamada K, Kawahara A, Hattori S, Takeoka H, Zaizen Y, Kawayama T, Kage M, Hoshino T. Prognostic Value of EGFR Mutation and ERCC1 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Platinum-Based Chemotherapy. *PLoS One.* 査読有, 8 巻, 2013, e71356.

DOI: 10.1371/journal.pone.0071356.  
Yoshida T, Yamada K, Azuma K, Kawahara A, Abe H, Hattori S, Yamashita F, Zaizen Y, Kage M, Hoshino T.

Comparison of adverse events and efficacy between gefitinib and erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis. *Med Oncol.* 査読有, 30 巻, 2013, 349.

DOI: 10.1007/s12032-012-0349-y.  
福満千容, 河原明彦, 山口知彦, 安倍秀幸, 多比良朋希, 高瀬頼妃呼, 秋葉 純, 鹿毛政義. 液状細胞診にて診断した気管支腺原発の粘表皮癌の 1 例. *日本臨床細胞学雑誌.* 査読有, 52 巻, 2013, 473-477.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5795/jjssc.52.473>

Kawahara A, Taira T, Azuma K, Tominaga M, Hattori S, Kawahara M, Abe H, Yamaguchi T, Akiba J, Takamori S, Hayashi A, Kage M. A diagnostic algorithm using EGFR mutation-specific antibodies for rapid response EGFR-TKI treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 査読有, 78 巻, 2012, 39-44.  
DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.07.002.

河原明彦, 山口知彦, 安倍秀幸, 多比良朋希, 吉田友子, 内藤嘉紀, 秋葉 純, 鹿毛政義. 乳癌肺転移との鑑別を要した EGFR 遺伝子変異を伴う原発性肺癌の 1 例. *日本臨床細胞学会雑誌*. 査読有, 51 巻, 2012, 120-124.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5795/jjssc.51.120>

Kinoshita T, Azuma K, Sasada T, Okamoto M, Hattori S, Imamura Y, Yamada K, Tajiri M, Yoshida T, Zaizen Y, Kawahara A, Fujimoto K, Hoshino T. Chemotherapy for non-small cell lung cancer complicated by idiopathic interstitial pneumonia. *Oncol Lett*. 査読有, 4 巻, 2012, 477-482.  
DOI: 10.3892/ol.2012.753

Zaizen Y, Azuma K, Kurata S, Sadashima E, Hattori S, Sasada T, Imamura Y, Kaida H, Kawahara A, Kinoshita T, Ishibashi M, Hoshino T. Prognostic significance of total lesion glycolysis in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Eur J Radiol*. 査読有, 81 巻, 2012, 4179-84.  
DOI: 10.1016/j.ejrad.2012.07.009.

Tabara K, Kanda R, Sonoda K, Kubo T, Murakami Y, Kawahara A, Azuma K, Abe H, Kage M, Yoshinaga A, Tahira T, Hayashi K, Arao T, Nishio K, Rosell R, Kuwano M, Ono M. Loss of Activating EGFR Mutant Gene Contributes to Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer Cells. *PLoS One*. 査読有, 7 巻, 2012, e41017.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0041017.

Azuma K, Kawahara A, Hattori S, Taira T, Tsurutani J, Watari K, Shibata T, Murakami Y, Takamori S, Ono M, Izumi H, Kage M, Yanagawa T, Nakagawa K, Hoshino T, Kuwano M. NDRG1/Cap43/Drg-1 may Predict Tumor Angiogenesis and Poor Outcome in Patients with Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 査読有, 7 巻, 2012, 779-789.  
DOI: 10.1097/JTO.0b013e31824c92b4.

Terazaki Y, Yoshiyama K, Matsueda S, Watanabe N, Kawahara A, Naito Y, Suekane S, Komatsu N, Ioji T, Yamada A, Mine T, Terasaki M, Itoh K, Takamori S, Sasada T. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in refractory small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 査読有, 103 巻, 2012, 638-44.

DOI:

0.1111/j.1349-7006.2012.02202.x.

Azuma K, Okamoto I, Kawahara A, Taira T, Nakashima K, Hattori S, Kinoshita T, Takeda M, Nakagawa K, Takamori S, Kuwano M, Ono M, Kage M. Association of the Expression of Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Protein as Determined with Mutation-Specific Antibodies in Non-small Cell Lung Cancer with Progression-Free Survival after Gefitinib Treatment. *J Thorac Oncol*. 査読有, 7 巻, 2012, 122-127.

DOI: 10.1097/JTO.0b013e31822eeba2.

Kawahara A, Azuma K, Sumi A, Taira T, Nakashima K, Aikawa E, Abe H, Yamaguchi T, Takamori S, Akiba J, Kage M. Identification of non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations in malignant effusion and cerebrospinal fluid: Rapid and sensitive detection of exon 19 deletion E746-A750 and exon 21 L858R mutation by immunocytochemistry. *Lung Cancer*. 査読有, 74 巻, 2011, 35-40.

DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.02.002.

Aikawa E, Kawahara A, Hattori S, Yamaguchi T, Abe H, Taira T, Azuma K, Kage M. Comparison of the expression levels of napsin A, thyroid transcription factor-1, and p63 in nonsmall cell lung cancer using cytocentrifuged bronchial brushings. *Cancer Cytopathol*. 査読有, 119 巻, 2011, 335-45.

DOI: 10.1002/cncy.20162.

[学会発表](計14件)

Mayumi Ono, Rina Kanda, Kosuke Watari, Kahori Sonoda, Masashi, Maeda, Yuichi Murakami, Akihiko Kawahara, Masayoshi Kage, Hidetaka Uramoto, Michihiko Kuwano. Integrin beta1/Src/Akt-driven Bypass Signaling Pathway confers EGFR-TKI Resistance in Lung Cancer Cells. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2013.10.3. (Yokohama) Akihiko Kawahara, Tomoki Taira, Tomohiko Yamaguchi, Hideyuki Abe,

Tomoko Yoshida, Yorihiro Takase, Chihiro Fukumitsu, Jun Akiba, Kage Masayoshi. A case of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma with signet-ring cells. The 12<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Meeting for Diagnostic Cytopathology. 2013.9.7. (韓国)

神田利奈, 渡 公祐, 河原明彦, 鹿毛政義, 浦本秀隆, 岡本 勇, 中川和彦, 桑野信彦, 小野真弓. Integrin 1/Akt 経路活性化を介した肺癌における新規エーロチニブ耐性獲得メカニズム. 第 17 回日本がん分子標的治療学会. 2013年6月13日. (京都)

福満千容, 河原明彦, 多比良朋希, 山口知彦, 安倍秀幸, 吉田友子, 高瀬頼妃呼, 秋葉 純, 谷川 健, 鹿毛政義. 液状気管支細胞診を用いた肺癌診断. 第 54 回日本臨床細胞学会総会. 2013年6月2日. (東京)

河原明彦. LBCを用いた気管支擦過細胞診の現状. 肺癌治療における細胞診の役割. 中四国実践セミナー. 2013年3月9日. (愛媛)

河原明彦, 多比良朋希, 山口知彦, 安倍秀幸, 吉田友子, 高瀬頼妃呼, 福満千容, 秋葉 純, 鹿毛政義. シンポジウム. 液状検体における細胞診の役割と遺伝子診断. 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2012年11月10日. (新潟)

福満千容, 河原明彦, 山口知彦, 安倍秀幸, 多比良朋希, 吉田友子, 高瀬頼妃呼, 秋葉 純, 鹿毛政義. 液状細胞診にて診断した気管支原発粘表皮癌の 1 例. 第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2012年11月10日. (新潟)

Kawahara Akihiko. Identification of non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations in malignant effusion and cerebrospinal fluid. 37<sup>th</sup> European Congress of Cytology. 2012.9.30. Croatia, Dubrovnik.

Tomohiro Shibata, Kosuke Watari, Akihiko Kawahara, Yuichi Murakami, Hiroshi Nabeshima, Koichi Azuma, Masayoshi Kage, Naofumi Mukaida, Michihiko Kuwano, Takashi Takahashi, Mayumi Ono. Interleukin 1 promotes lymph node metastasis by lung cancer cells through modification of tumor stroma cells. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2012.9.21. (Hokkaido)

Rina Kanda, Yuichi Murakami, Akihiko Kawahara, Koichi Azuma, Masayoshi Kage, Tomoko Tahira, Michihiko Kuwano, Mayumi Ono. A novel mechanism for acquired resistance to EGFR-TKI in

human lung cancer: loss of activating mutant EGFR gene allele. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2012.9.21. (Hokkaido)

Jun Akiba, Akihiko Kawahara, Masayoshi Kage, Hirohisa Yano. Characteristics of immunohistochemical ALK-positive lung cancer. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2012.9.19. (Hokkaido)

河原明彦, 多比良朋希, 安部秀幸, 山口知彦, 吉田友子, 秋葉 純, 鹿毛政義. ワークショップ. 肺癌患者の診断と治療における呼吸器細胞診の役割. 第 50 回日本臨床細胞学会秋期大会. 2011年10月23日. (東京)

Kawahara Akihiko, Koichi Azuma, Kuwano Michihiko, Masayoshi Kage, Mayumi Ono. Immunocytochemical diagnosis of activating EGFR mutations in NSCLC using mutation-specific antibodies. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2011.10.3. (名古屋)

河原明彦, 山口知彦, 安倍秀幸, 多比良朋希, 吉田友子, 内藤嘉紀, 秋葉 純, 鹿毛政義. 再発肺癌細胞における EGFR 遺伝子変異の免疫細胞化学による検出. 第 52 回日本臨床細胞学会総会. 2011年5月21日. (福岡)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
河原 明彦 (Kawahara, Akihiko)  
久留米大学・大学病院・臨床検査技師  
研究者番号: 00469347
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし