

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590454

研究課題名(和文) 原発性肺がんの発生・進展に関連する新規責任遺伝子の検索

研究課題名(英文) Identification of unknown responsibility gene that related to the initiation of primary lung cancer

研究代表者

鹿 智恵 (Lu, Tomoe)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10408453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肺がんの発生と関連する責任遺伝子の局在を突き止める目的で肺腺がん、扁平上皮がんおよび神経内分泌性腫瘍合計306例を対象とし、8pにある19のDNAマーカーを用いPCR法によりマイクロサテライト不安定性MSI解析を行った。その結果、8p23.2、8p23.1、8p22および8p21におけるMSI頻度は、それぞれ20%、51%、24%と15%であり、8p23.1におけるMSI頻度は他の領域より有意に高いことが判明した。特にD8S1819においてのMSIは何れの組織型においても高頻度であったことから、肺がんの発生と関連する責任遺伝子が8p23.1に存在している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we employed 19 informative microsatellite markers at 8p21-23.2 to compare the frequency of microsatellite instability (MSI) in 183 cases of adenocarcinoma (ADC), 81 cases of squamous cell carcinoma (SqCC), and 42 cases of neuroendocrine tumor (NET), which including 21 cases of large cell neuroendocrine carcinoma and 21 cases of small cell carcinoma in a PCR-based microallelotyping analysis. The frequency of MSI at 8p23.2, 8p23.1, 8p22 and 8p21 was 20%, 51%, 24% and 15% in 306 cases of primary lung cancer, respectively. MSI at 8p23.1 was significantly more frequent than other regions in any histologic types of lung cancer ( $P<0.05$ ). More specifically, the frequency of MSI at marker D8S1819 was significantly higher than others. On the other hand, MSI at markers D8S264 and D8S1109 were showed more frequent in both ADC and NET, but not SqCC. These findings suggesting that multiple candidate TSGs reside on the 8p23 are early events during the carcinogenesis in the lung.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺癌 染色体変化

## 1. 研究開始当初の背景

### ➤ 肺がんの疫学：

原発性肺がんは 1996 年から男女合計で胃がんを抜いて、日本のがん死亡原因の 1 位となった。以後もこの状況は改善されず、肺がんは一貫して、罹患数と死亡数が増加している。その主たる要因は、人口高齢化の影響であり、高齢者肺がんがますます増える傾向にある。このような状況下において、肺がん対策が日本のがん死亡対策のなかで最重要課題となっている。一方、喫煙対策が充実している欧米諸国では、すでに肺がんは著明な減少傾向が続いている。

### ➤ 肺がんの組織型：

肺がんは、組織学的には肺腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんおよび小細胞がんに分けられる。臨床では、治療を目的として、非小細胞がんと小細胞がんが大別されている。二者の間には臨床的だけでなく遺伝学的にも明らかな相違点がある事も実証されている。日本では、約 70% は腺がん、欧米より高い傾向がみられる。発癌の危険因子のうち、最も影響が大きいのが喫煙であるが、腺がんは喫煙との関係は薄いとされており、禁煙による効果は期待ができない。このことは、肺がん全体を減少させるためには、腺がんの発生機序を解明し、その予防策をたてることが必要であることを示唆している。

### ➤ 肺がんの遺伝子異常：

肺がんの発生は、他の臓器のがんと同様に多種類の遺伝子変化が多段階的に関与すると認識されている。特に、がん抑制遺伝子の不活化は肺がんの発生過程において極めて重要であると推測されている。しかし、発がんの責任遺伝子は未だに明らかにされていない。2007 年に、肺がん原因遺伝子の一つは、2 番染色体短腕にある二つの遺伝子の逆位 inv(2)(p21p23) により形成された異常遺伝子 *EML4-ALK* 融合型遺伝子であることが報告された。この遺伝子は非小細胞がんの 5% において確認されたに過ぎず、染色体の変化に関連するその他の新規の異常遺伝子の存在が十分に考え得る。

### ➤ 我々のこれまでの解析結果：

マイクロサテライト解析法は、染色体にある既知のマイクロサテライトマーカーにて新規の責任遺伝子をスクリーニングする方法として以前から知られている。

我々は、この方法を用いて、数多くの悪性腫瘍を解析し、がんの発生・転移に最も関連する染色体領域が、8p と 13q であることを報告した (Lu et al., *Prostate Cancer and Prostatic Disease* 11: 357-361, 2008; Lu et al., *World J Gastroenterology* 13: 1090-1097, 2007; Lu et al., *Liver International* 27: 782-790, 2007; Lu et al., *Genes, Chromosomes & Cancer* 45: 509-515, 2006; Lu et al., *Prostate* 66: 405-412, 2006)。確立された手法で各組織型の肺がんを網羅的に解析することで、組織型毎に新規の責任遺伝子を見出す可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、原発性肺がんを対象とし、予備実験で突き止めた幾つかの候補染色体領域にある既知のマイクロサテライトマーカーを用い、網羅的にマイクロサテライト解析を行い、原発性肺がんの発生・進展と最も関連する染色体領域を同定し、最終的には候補領域に存在する責任遺伝子を探し出すことを目的とする。

そのために、まず外科手術により得られた比較的早期段階の原発性肺がんおよび病理解剖により得られた遠隔転移を伴う進行型肺がんを解析対象とし、8p を中心とするいくつかの染色体領域に存在するヘテロ接合型のマイクロサテライトマーカーを用い、染色体の不安定性 MSI (microsatellite instability) 解析を行う。MSI 頻度と病理組織学的ならびに臨床病理学的所見の関連性を比較検討し、各組織型の肺がんの発生・進展と最も関連性がある候補領域を探し出す。

次に、高頻度に MSI を認めた候補領域に存在する既知の遺伝子を選び出し、PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) 法および Direct Sequence 法により遺伝子解析を行う。遺伝子の塩基配列の変異と肺がんとの関連性を検討することで、候補責任遺伝子を探し出すことを目指す。更に、候補遺伝子の機能に関連するタンパク質の発現や mRNA の発現を検討する。このように染色体の変化に基づき選出された候補遺伝子の構造的・機能的異常の有無を同時に解析することにより、各組織型の肺がんの発生・進展に関連する責任遺伝子を突き止める。

## 3. 研究の方法

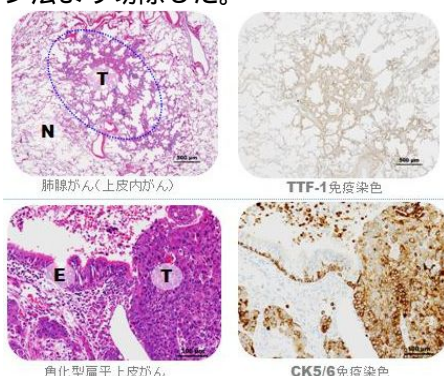
### ➤ 組織標本の収集と組織型分類の再評価

2009年から2014年まで、本学において外科手術より得られた通常のホルマリン固定・パラフィン包埋した原発性肺がんを解析対象とし、合計306症例の584病変を無作為に収集した。その内訳は気管支肺胞上皮がんBACを含む肺腺がん183例(369病変)、扁平上皮がん81例(157病変)、神経内分泌性大細胞がん21例(31病変)および小細胞がん21例(27病変)である。

2015年3月にWHO Classification of Tumors of The Lung, Pleura, Thymus and Heart 4<sup>th</sup> Editionが刊行されたことを受け、すべての症例に対して、新WHO組織分類に準拠した新しい組織型・亜型分類を行った。具体的に、肺腺がんの組織標本に対して、EVG染色およびTTF-1免疫染色を行い、その結果を基にして肺腺がんを上皮内がん、微少浸潤がんおよび置換性・乳頭状・腺房型・充実性浸潤性肺腺がんなど新しい組織亜型分類を行った。一方、肺扁平上皮がんの組織標本に対して、CK5/6、p40 ( p63 ) およびTTF-1の免疫染色を施行し、非角化型と角化型扁平上皮がんに再分類した。また、新基準に従い、従来の神経内分泌性大細胞がんと小細胞がんは、それらの組織学的特徴からカルチノイド腫瘍と併せて神経内分泌性腫瘍NET (neuroendocrine tumor) に統合した。

#### ➤ 核酸サンプルの収集

下図のように、外科手術より得られた比較的早期段階の肺がん症例の未染色の組織標本から、腫瘍組織(T)とその周囲の正常肺胞組織(N)または扁平上皮がんの前がん病変と思われる非腫瘍性気管支粘膜上皮細胞(E)をマイクロダイセクション法より切除した。



採取された組織からDNAとRNAの抽出を行った。DNAサンプルは染色体変化の解析や候補遺伝子塩基配列の解析などに用いた。RNAサンプルは候補遺伝子の機能に関連する解析に用いた。また、候補遺伝子の

機能解析に関連するタンパク質の発現を検討するため、免疫染色用のパラフィン連続切片を同時に作製した。

#### ➤ マーカーの選定

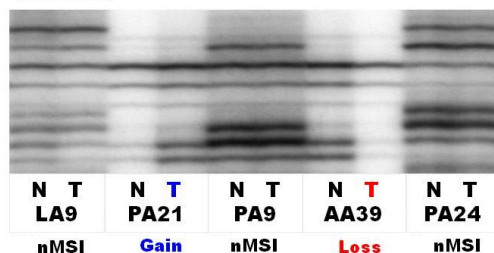
予備実験の段階で、すでに一部の肺がん症例を用い、8pと4pを中心とする幾つかの染色体領域にあるマイクロサテライトマーカーから、日本人もしくは東アジア人の患者において、ヘテロ接合型のDNAマーカーを選出した。本研究では欧米人より日本人患者においてinformative markerが少ないことを明らかにした。例えば、8pにある63個のDNA多型マーカーのうち、19個のマーカーが、ヘテロ接合型であった。このゲノムの特徴を利用して、より効率よく候補領域を突き止めることが期待される。

#### ➤ マイクロサテライト解析

<sup>32</sup>Pで標識したdCTPを用いPCR反応後、8%アクリルアミドゲルで3~4時間電気泳動を行った。泳動後のゲルを急速に乾燥させ、Hyperfilm MP (Amersham Biosciences Corp.)とカセットの中にセットした。-80℃に24~72時間露光した後フィルムを現像し、オートラジオグラフィーを作成した。

下図のように、正常組織Nと比べ、腫瘍組織TにおいてPCR産物が明らかに減少した症例をヘテロ接合性の消失LOH (loss of heterozygosity)と判定し、一方増えた症例を増幅(Gain)と判定した。何れも染色体の不安定性MSIと定義した。

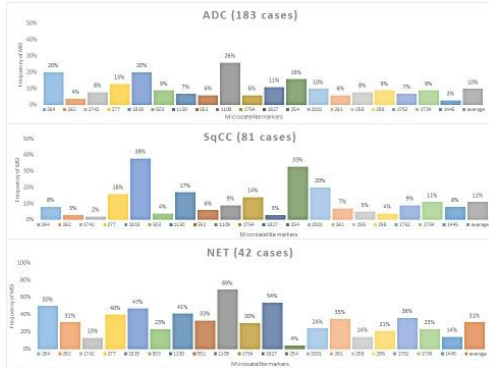
#### D8S552



#### ➤ 候補遺伝子の解析

上記のマイクロサテライト解析の結果に基づき、候補領域8pから既知のがん抑制遺伝子DLC-1、DBC-2、MTUS-1などを含むいくつかの候補遺伝子を選び出し、通常のPCR-SSCP法およびDirect Sequence法により、それぞれの遺伝子における変異の有無を検索した。

#### 4. 研究成果



- まず、肺腺がんに対して 8p を解析した結果、非がん部組織と比べて、がん細胞において 19 のマーカーのうち、少なくとも 1 つ以上にマイクロサテライト不安定性 MSI を認めたのは、183 症例中 106 例 (58%) と高頻度であった。染色体領域別では、8p23.2、8p23.1、8p22 および 8p21 における MSI 頻度は、それぞれ 20%、51%、24% と 15% であり、8p23.1 における MSI 頻度は、他の領域より有意に高いことが判明した。組織亜型別では、上皮内がん、微少浸潤がんおよび置換性・腺房型・乳頭状・充実性増殖優位型浸潤性肺腺がんにおける MSI 頻度は、それぞれ 39%、32% および 73%、61%、63%、60% であった。上皮内がんや微少浸潤がん に比べ、浸潤性肺腺がんにおける MSI 頻度は有意に高かった ( $P < 0.05$ )。この結果から、8p23 領域の染色体不安定性は、肺腺がんの発生のみならず、その後の進行過程においても関連している可能性が示唆された。特に 8p23.2 領域にある *D8S264*、8p23.1 領域にある *D8S1819*、*D8S1109* および 8p22 領域にある *D8S254* における MSI 頻度が、それぞれの平均値プラス標準偏差より有意に高い結果から、これらの DNA マーカーの近傍に肺腺がんの発生・進展に関連する責任遺伝子の存在が示唆された。この結果は既に第 105 回日本病理学会で報告し、学術論文として発表する予定である。
- 一方、扁平上皮がんに対して 8p を解析した結果、非腫瘍性細胞と比べ、腫瘍細胞において 19 のマーカーのうち、少なくとも 1 つ以上に MSI を認めたのは、81 例中 50 例 (62%) と高頻度であった。特に 8p23.1 にある *D8S1819* および 8p22 にある *D8S254* における MSI 頻度は、それぞれの平均値プラス標準偏差より高い傾向を示しており、統計学的に有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。また、扁平上皮がんの発生過程における 8p の染色体変化に関して、非角化型と角化型扁平上皮がんの間に類似点が多いことが判明した。この結

果は、既に第 105 回日本病理学会で報告した。

- また、神経内分泌性腫瘍 NET を対象とし同様の手法で 8p について解析した結果、肺腺がんの結果と類似点が多いことが判明した。そして、神経内分泌性大細胞がん と小細胞がんの間に類似点が多いことが確認された。NET における 8p の MSI 頻度の平均値 (31%) は、腺がん (10%) あるいは扁平上皮がんの平均値 (11%) よりも、有意に高いことが判明した。この結果は、第 75 回日本癌学会総会で発表する予定である。
- 上記の解析結果に基づき、候補領域の 8p から選り出した *DLC1*、*DBC2*、*MTUS1* など幾つかの候補遺伝子の解析を行った。具体的には、まず Database に登録された遺伝子情報を参照し、各遺伝子のコード領域に対するプライマーを設定した。一部の症例を対象とし、通常の PCR-SSCP 法や Direct Sequence 法により、それぞれの遺伝子の塩基配列を網羅的に検索した。その結果、いずれの遺伝子においても有意な突然変異は認められなかった。この結果から、これらの候補遺伝子が塩基配列の変化により直接的に肺がんの発生・進展に關与する可能性が低いことが考えられた。例外として、*MTUS1* には合計 6 個の塩基配列の多型性変化が検出された。また、予備実験で作製していた *MTUS1* に対するポリクローナル抗体を用い、81 例の扁平上皮がんにおける *MTUS1* タンパク質の発現様式を免疫組織化学的手法により検討した。その結果、他の臓器の悪性腫瘍と同様に、およそ 75% の症例においてその発現が明らかに減少していることを明らかにした。肺がんの発生過程と *MTUS1* との関連性について引き続き検討中である。

#### 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)

研究代表者:

[学会発表](計 20 件)

Tomoe Lu et al. Microsatellite instability at 8p associated with initiation of squamous cell carcinoma in the lung 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 12 日、仙台

鹿 智恵 他 肺腺癌の発生・進行過程と 8 番染色体短腕のマイクロサテライト不安定性との関連性について 第 105 回



日本病理学会総会 2016 年 5 月 12 日、  
仙台

Tomoe Lu et al. CK5/6, p40, and TTF-1,  
a useful combined test to distinguish  
between lung adenocarcinoma and  
squamous cell carcinoma. 74th Annual  
Meeting of the Japanese Cancer  
Association October 8-10, 2015 Nagoya  
鹿 智恵 他 肺腺癌と扁平上皮癌にお  
ける TTF-1 タンパクの発現と意義 第  
104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30  
日～5 月 2 日、名古屋

鹿 智恵 他 ヒト胎児組織における  
p40 の発現と意義 第 104 回日本病理学  
会総会 2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日、名  
古屋

鹿 智恵 他 肺腺癌の組織亜型の多様  
性と PROM1 タンパク質の発現様式 第 60  
回日本病理学会 秋期特別総会 2014 年  
11 月 20-21 日、沖縄

鹿 智恵 他 肺腺癌の新組織分類  
(IASLC/ATS/ERS 分類)に基づく原発性  
肺腺癌の組織亜型の再評価 第 131 回東  
京慈恵会医科大学成医会 2014 年 10 月  
9-10 日、東京

Tomoe Lu et al. Decreased MTUS1 protein  
expression is a frequent event in  
hepatocellular carcinoma 73th Annual  
Meeting of the Japanese Cancer  
Association September 25-27, 2014  
Yokohama

鹿 智恵 他 肺扁平上皮癌の発生過程  
における PROM1 タンパク質の発現変化と  
意義 第 103 回日本病理学会総会 2014  
年 4 月 24 日、広島

鹿 智恵 他 肝細胞癌の発生・転移に  
おける MTUS1 タンパク質の発現変化と意  
義 第 103 回日本病理学会総会 2014 年  
4 月 24 日、広島

鹿 智恵 他 肝細胞がんの発生におけ  
る MTUS1 タンパク質の発現減弱の意義  
第 130 回東京慈恵会医科大学成医会  
2013 年 10 月 10-11 日、東京

Tomoe Lu et al. Decreased MTUS1 protein  
expression is associated with the  
carcinogenesis of hepatocellular  
carcinoma. 72th Annual Meeting of the  
Japanese Cancer Association poster  
October 1-3, 2013, Yokohama

鹿 智恵 他 原発性肺がんの発生にお  
ける PROM1 タンパク質の発現と意義 第  
102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 8  
日、札幌

鹿 智恵 他 肝細胞がんの発生過程に  
おける PROM1 タンパク質の発現減弱と意  
義 第 102 回日本病理学会総会 2013 年  
6 月 8 日、札幌

Tomoe Lu et al. Expression of PROM1 in  
advanced lung cancer: no difference  
could be found between primary tumor

lesions and its corresponding  
metastatic tumor lesions. Ninth  
AACR-Japanese Cancer Association  
Joint Conference: Breakthroughs in  
Basic and Translational Cancer  
Research February 21-25, 2013, Hyatt  
Regency Maui

鹿 智恵 他 肝細胞がんの発生におけ  
るがん幹細胞マーカーPROM1 タンパク質  
の発現減弱と意義 第 129 回東京慈恵会  
医科大学成医会 2012 年 10 月 11-12 日、  
東京

Tomoe Lu et al. Decreased expression of  
PROM1 protein is associated with  
carcinogenesis of hepatocellular  
carcinoma. 71th Annual Meeting of the  
Japanese Cancer Association September  
19-21, 2012 Sapporo

鹿 智恵 他 原発性肝細胞がんの発  
生・転移における PROM1 の関連性につい  
て 第 101 回日本病理学会総会 2012 年  
4 月 27 日、東京

鹿 智恵 他 各種先天性疾患の肝臓に  
おける PROM1 タンパク質の発現と意義  
第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月  
27 日、東京

鹿 智恵 他 ヒト胎児正常組織におけ  
るがん幹細胞マーカーPROM1 の発現様式  
第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月  
28 日、東京

#### [雑誌論文](計 1 件)

Hiroshi Hano, Satoshi Takasaki,  
Hirohiko Kobayashi, Tomoki Koyama,  
Tomoe Lu, Keisuke Nagatsuma. In the  
non-cirrhotic stage of nonalcoholic  
steatohepatitis, angioarchitecture of  
portal veins and lobular architecture  
are maintained. Virchows Arch 462:  
533-540, 2013

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鹿 智恵 (LU TOMOE)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：24590454