

## 75. 肺癌の腫瘍内不均一性を規定する染色体不安定性の解明

岡本 龍郎

大分大学 医学部 呼吸器・乳腺外科学講座

Key words : 肺癌, 腫瘍内不均一性, 進化的発育, EGFR 遺伝子変異

### 緒言

癌は通常、単一クローンから増殖するとされるが、固形癌の多くは発育の過程で遺伝子の動的変化をもたらす形質を獲得する。この形質変化が、腫瘍内の細胞間における遺伝子不均一性を生み出し、同一腫瘍内に多様な性質をもつサブクローンの発育を促す（腫瘍内不均一性）。このような過程を経て、宿主個体内の別の環境で増殖することが可能となり（転移の成立）、また、感受性薬剤に対する耐性細胞を生み出す原因となる。したがって、肺癌における腫瘍内不均一性の機序を解明することは、肺癌の治療抵抗性を理解し、それを克服するうえで非常に重要である。

*EGFR* 遺伝子変異を有する肺癌は日本人に発生する肺腺癌の約半数におよぶ。*EGFR* 変異肺癌の多くは、癌の発育段階初期のうち CT 画像でスリガラス状陰影 (GGO) を呈し、癌の発育に伴い、充実性陰影が混在し (mixed GGO)、浸潤を伴うようになる。*EGFR* 変異肺癌は発癌初期では低悪性であるが、癌の進化的発育過程において、生物学的に高悪性の性質に変化 (悪性転化) することが示唆される。

今回の研究では、ドライバー遺伝子変異を有する肺癌の代表格である *EGFR* 遺伝子変異肺腺癌における腫瘍内不均一性の機序解明として、1. *EGFR* 変異肺癌における腫瘍内不均一性に関与する因子の探索と解析、2. *EGFR* 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の探索と解析、の両面から研究を進めた。

過去の研究として、*EGFR* L858R 陽性肺腺癌に対して、L858R 変異蛋白特異的抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、不均一に染色された腫瘍部で、陽性部と陰性部で各々網羅的遺伝子解析を施行した。その結果、CNV 解析で、*EGFR*、*CCNE1*、*MDM2* 各遺伝子コピー数の腫瘍内不均一性を認めた。L858R 蛋白の不均一発現は *EGFR* コピー数の差によると考えられた。また、*CCNE1*、*MDM2* のコピー数変化に伴い、細胞分裂やアポトーシスの頻度といった細胞活性に差が認められた [1, 2]。今回さらに、L858R 蛋白発現増加部において、*EGFR* 遺伝子コピー数変化と同様の変化を示した *MDM2* 遺伝子に着目し、*EGFR* 変異陽性肺癌における *MDM2* 遺伝子発現の意義に関する検討を行った。術前 CT 画像における *EGFR* 変異陽性肺癌の進化的発育を示唆する所見から、肺癌を発育段階別に分け、*EGFR* 遺伝子変異別に発育の特徴を調べた。さらにこれらの知見を参考に、次世代シーケンスによる遺伝子変異および遺伝子コピー数変化の解析を行っている。

### 方法

#### 1. *EGFR* 変異陽性肺癌の腫瘍内不均一性の解析

*EGFR* 変異陽性肺癌における *MDM2* 遺伝子発現の意義の検討  
2012 年以降に手術が行われた肺腺癌 (*EGFR* 遺伝子変異陽性 100 例、陰性 20 例) における *MDM2* mRNA 発現を定量的 PCR 法にて解析した。内因性コントロールとして  $\beta$ -actin を用いた。*MDM2* mRNA 発現量と臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。



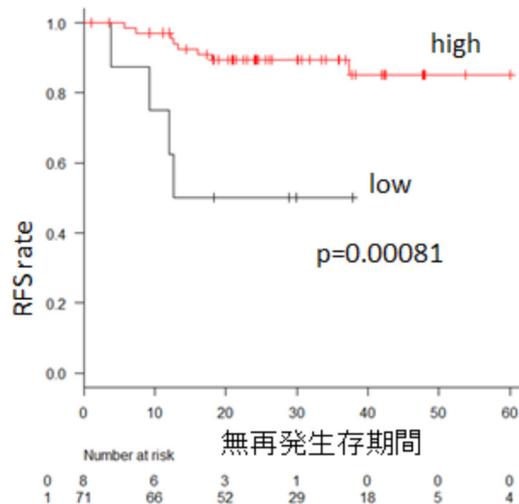


図2. MDM2 mRNA 発現量別の無再発生存期間  
統計処理は、ログランク検定で実施した。

## 2. EGFR 変異肺癌における進化的発育に関する因子の検討

EGFR 遺伝子変異型の内訳は、野生型/Exon (Ex) 18 G719/Ex19 del/Ex20 ins/Ex21 L858R/Ex21L861Q/L858R+T790M がそれぞれ 177/7/78/1/77/2/2 例であった。GGO の有無と臨床病理学的因子の関係は $\chi^2$ 検定にて、無再発生存に関する検討は Cox 比例ハザードモデルを用いた。EGFR 変異陽性肺癌は陰性肺癌より GGO を有する腫瘍の割合が多かった (49.1% vs. 29.9%,  $p=0.0004$ )。GGO 優位型と SP 優位型の割合には差がなかった

( $p=0.60$ )。変異タイプ別の解析では、Ex21L858R 陽性肺癌は Ex19del 陽性肺癌より GGO を有する腫瘍の割合が多く (59.3% vs. 38.5%,  $p=0.011$ ) (表 1)、無再発生存が良好であった。GGO を有する肺癌は EGFR 変異有無およびタイプにかかわらず無再発生存期間に差を認めなかった (表 2)。今回の検討では、肺癌手術症例において、EGFR exon 21 変異型腺癌は exon19 変異型および野生型腺癌に比べ GGO を有するものが多く、早期に切除される割合が高いことが示唆された。現在までの報告でも、Exon 21 変異型腫瘍で他の変異型や野生型に比べ腫瘍における GGO 割合が多かったとする報告がある [4]。今後は、次世代シーケンスパネルにより、肺腺癌の進化的発育に関係する因子を検討する予定である。

表 1. GGO 成分の有無と臨床因子との関係

因子	分類	GGOあり (135)	GGOなし (209)	p
年齢	< 70	79	111	0.33
	≥ 70	56	98	
性別	女	81	34	0.014
	男	54	21	
EGFR遺伝子変異	なし	53	124	0.003
	あり	82	85	
EGFR変異 (n=159)	Exon 19 del	30	48	0.008
	L858R	46	31	

表2. 無病生存に関する因子 (Cox生存解析)

因子	分類	HR	95% C.I.	p
年齢	< 75	1		
	≥ 75	1.20	0.66 – 2.18	0.55
性別	女	1		
	男	2.01	1.09 – 3.69	0.025
EGFR変異	なし	1		
	あり	0.99	0.80 – 1.23	0.95
EGFR変異種類 (n=159)	Exon 19 del	1		
	L858R	0.24	0.07 – 0.83	0.025
GGOの有無	なし	1		
	あり	0.17	0.07 – 0.44	0.0002
GGOの割合 (n=135)	GGO優位	1		
	SP優位	5.9	0.66 – 53.1	0.11

### 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大分大学医学部呼吸器・乳腺外科学講座の杉尾賢二、橋本崇史および九州大学大学院消化器・総合外科学の小副川敦である。

### 文 献

- 1) Hashimoto T, Osoegawa A, Takumi Y, Abe M, Kobayashi R, Miyawaki M, Takeuchi H, Okamoto T, Sugio K. Intratumoral heterogeneity of copy number variation in lung cancer harboring L858R via immunohistochemical heterogeneous staining. *Lung Cancer*. 2018 ;124:241-247. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.08.013
- 2) Osoegawa A, Hashimoto T, Takumi Y, Abe M, Yamada T, Kobayashi R, Miyawaki M, Takeuchi H, Okamoto T, Sugio K. Acquired resistance to an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) in an uncommon G719S EGFR mutation. *Invest New Drugs*. 2018;36:999-1005. DOI: 10.1007/s10637-018-0592-y
- 3) Higashiyama M(1), Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, Takami K, Nakayama T, Nishisho I. MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer*. 1997;75:1302-8. DOI: 10.1038/bjc.1997.221
- 4) Suh YJ, Lee HJ, Kim YJ, Kim KG, Kim H, Jeon YK, Kim YT. Computed tomography characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutation: A propensity score matching study. *Lung Cancer*. 2018;123:52-59. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.06.030