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

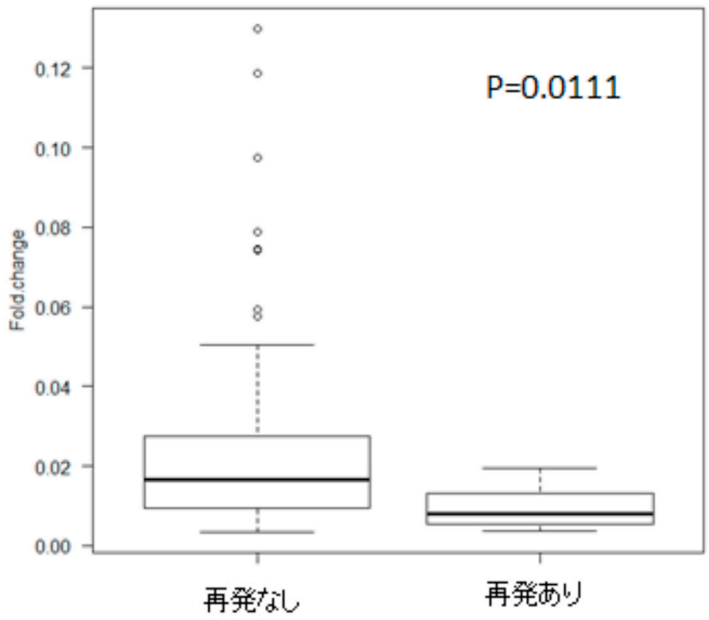
【目的】固形癌の多くは発育の過程で遺伝子の動的変化をもたらす形質を獲得する。この形質変化が、腫瘍内の細胞間における遺伝子不均一性を生み出し、同一腫瘍内に多様な性質をもつサブクローンの発育を促す（腫瘍内不均一性）。また、*EGFR* 遺伝子変異を有する肺癌は日本人に発生する肺腺癌の約半数におよぶ。EGFR 変異肺癌は発癌初期では低悪性であるが、癌の進化的発育過程において高悪性の性質に変化することが示唆される。

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。

【方法】1. EGFR 変異陽性肺癌の腫瘍内不均一性の解析：EGFR L858R 蛋白の不均一発現部において、*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。2. EGFR 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の検討：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。同症例の *EGFR* 遺伝子変異方および臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。

【結果】1. 再発を認めた肺癌と再発を認めていない肺癌の両群で *MDM2* 遺伝子発現を比較したところ、再発ありの肺癌において有意に *MDM2* 遺伝子発現が低値であった（図）。MDM2 低発現群と高発現群に分けて検討したところ、MDM2 低発現群で進行癌が多く、MDM2 低発現群で有意に無再発生存における予後が不良であった。CT 所見による各グループの特徴的な症例を合計 20 例選択し、次世代シーケンスパネルを用いて、進化的発育に関連する遺伝子変化を検討している。2. 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、無再発生存が良好であった。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。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。

肺癌再発の有無と MDM2mRNA 発現量との関係



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は 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 β-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。

2.　EGFR 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の検討

1）　2006～2016 年に手術が行われた肺腺癌のうち、検体が利用可能な 344 例のパラフィン包埋切片より DNA を抽出し、*EGFR* 遺伝子変異検査を施行した。*EGFR* 遺伝子変異は Exon18-21 の変異を含めた。

2）　術前の thin slice CT 画像より、GGO を含めた最大径と充実径を測定し、充実径/最大径（SMR）を計算した。SMR＝0、0＜SMR≦50、50＜SMR≦100、STR＝100 をそれぞれ pure ground glass tumors（pGGT）、GGO 優位型、Solid-part（SP）優位型、solid tumor（ST）とした。

3）　同症例の *EGFR* 遺伝子変異方および臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。

4）　CT 所見による各グループの特徴的な症例を合計 20 例選択し、次世代シーケンスパネルを用いて、進化的発育に関連する遺伝子変化を検討する。

結果および考察

1. EGFR 変異陽性肺癌における *MDM2* 遺伝子発現の意義

最終的に、EGFR 変異陽性肺癌 79 例および陰性肺癌 16 例が解析可能であった。EGFR 変異陽性肺腺癌と陰性肺腺癌で、*MDM2* 遺伝子の発現量を比較したが、発現量に明らかな差を認めなかった。次に、再発を認めた肺癌と再発を認めていない肺癌の両群で *MDM2* 遺伝子発現を比較したところ、再発ありの肺癌において有意に *MDM2* 遺伝子発現が低値であった（図 1）。さらに、無再発生存期間を用いた ROS curve より求めたカットオフ値（0.006）により、MDM2 低発現群と高発現群に分けて、2 群での臨床病理学的因子および無再発生存期間の比較を行った。その結果、EGFR 変異陽性肺癌では、MDM2 低発現群で進行癌が多く、MDM2 低発現群で有意に無再発生存における予後が不良であった（図 2）。

MDM2 は、がん抑制遺伝子 *p53* を不活化している E3 ユビキチン合成酵素であり、p53 の働きを抑制することで、がんの発育を促進すると考えられている。以前の我々の研究では *EGFRL858R* 遺伝子発現の増強部において、*EGFR* 遺伝子コピー数増加と共に *MDM2* 遺伝子コピー数増加が認められたこともあり、*MDM2* 遺伝子発現の増加に伴い、肺癌の悪性度も増大することが予想されたが、今回の検討では逆の結果となった。しかしながら、以前の研究において、*MDM2* コピー数増加を認めた部位は、同時にアポトーシスを示す細胞の増加も認めており、一概に MDM2 発現の増加が癌の悪性度増大に寄与するとは限らないことも示唆された。

非小細胞肺癌において、*p53* 遺伝子変異が約 60%に認められるとの報告があり、*p53* 変異の有無が MDM2 発現と予後との関係に影響している可能性があるため、今後は *p53* 変異の検討を合わせて行う必要がある。また、MDM2 蛋白発現が非小細胞肺癌の予後良好と関係したとの報告もあり［3］、EGFR 変異陽性肺癌における MDM2 発現の意義に関して、今後のさらなる検討が待たれる。

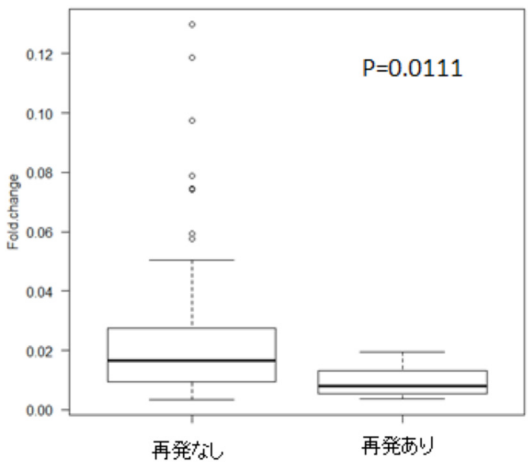


図 1.　再発の有無と MDM2mRNA 発現量との関係
統計処理は、t 検定で実施した。

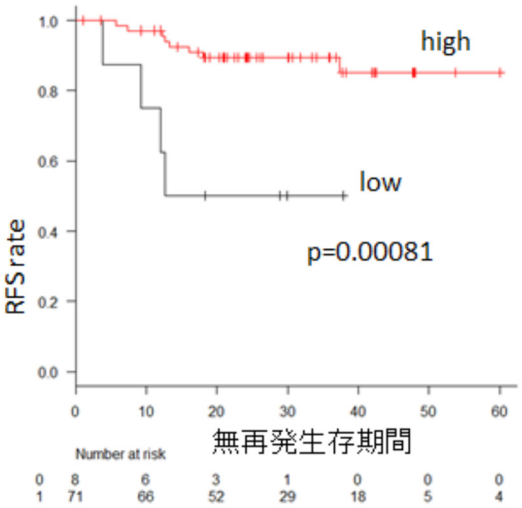


図 2. MDM2 mRNA 発現量別の無再発生存期間
統計処理は、ログランク検定で実施した。

2. EGFR 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の検討

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

表2. 無病生存に関係する因子（Cox生存解析）

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