

肺癌の進展に関連した遺伝子の統合的解析

《研究の概要》

肺癌は本邦における悪性腫瘍の死亡数の第1位を占め、外科治療・化学療法の発達にもかかわらず予後不良である。肺癌は組織像により、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌、小細胞癌の4基本型に分類されるが、これまでの知見により肺癌の発生・進展過程は均一なものではなく、4基本型の中でも形態—遺伝子異常—表現形質から特徴付けられるさまざまな亜型の存在する可能性が示唆されている。本研究では、近年増加の著しい腺癌を中心に、上皮成長因子受容体 epidermal growth factor (EGFR), MET, KRAS, EML4-ALK などの遺伝子異常と thyroid transcription factor (TTF) -1 を初めとする表現形質の面から、肺癌の発生・進展過程の多様性を明らかにすべく解析を進めた。

MET はチロシンキナーゼ型受容体であり、EGFR とともに多くの癌で過剰発現、活性化、遺伝子異常が報告されている。肺腺癌の MET、EGFR、KRAS の遺伝子異常を調べたところ、これら3遺伝子の異常は相互排他的であった。逆に細胞形質の面からは、EGFR 変異、MET 増幅を有する肺腺癌は、ともに EGFR と MET の高活性化、気管支上皮の分化形質や上皮性マーカー E-cadherin の高発現などで類似し、浸潤・転移に関連した分子の遺伝子発現プロファイルにおいても共通点がみられた。一方、気管支上皮の分化形質や E-cadherin の発現の低い肺腺癌では、EGFR 変異や MET 増幅はみられず、EGFR 変異あるいは MET 増幅を有する肺腺癌とは異なる発癌経路を経ている可能性が示唆された。

EML4-ALK は自治医科大学の間野教授のグループによって発見された新規融合遺伝子である (Soda et al. Nature 448:561-6, 2007)。高感度免疫染色法と multiplex RT-PCR を組み合わせることにより、EML4-ALK の検出系を確立するとともに、新たな EML4-ALK の variant と新たな融合遺伝子 KIF5B-ALK を発見した。ALK 融合遺伝子肺癌は肺腺癌の 4.3%にみられ、組織学的には、腺房型亜型、低分化度のものが多く、全例 TTF-1 陽性で cell lineage の観点からは肺胞上皮への分化を示すこと、重喫煙者はほとんどないなどの特徴を有していた。EML4-ALK は、EGFR 変異および KRAS 変異とは重複がないことから、EGFR あるいは KRAS 変異を有する肺腺癌とは異なる発癌過程をとると推定される。

近年、炎症を背景とした発癌について注目が集まっている。肺癌についても、特発性間質性肺炎を背景とした肺癌は他の肺癌と異なる発癌過程を経ていることが予想されている。特発性間質性肺炎を背景とした肺癌の特徴を明らかにするため、遺伝子発現、遺伝子異常、分化形質発現などについて検討し、ケモカインやサイトカインのリガンドや受容体の発現亢進、細胞周期を負に調節する因子の発現低下を見出した。

石川雄一 財団法人癌研究会 EML4-ALK 転座肺癌の検討
病理部部長
深山正久 東京大学医学部 炎症を背景とする肺癌の検討
人体病理学・病理診断学教授

I. 研究目的

肺癌は本邦における悪性腫瘍の死亡数の第1位を占め、外科治療・化学療法の発達にもかかわらず、いまだ肺癌患者全体の5年生存率は20%以下であり、予後不良な癌の代表例である。肺癌は組織像により、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌、小細胞癌の4基本型に分類されるが、これまでの知見により、肺癌の発生・進展過程は均一なものではなく、4基本型の中でも、形態—遺伝子異常—表現形質から特徴付けられるさまざまな亜型の存在する可能性が示唆されている。腺癌については、組織学的に腺房型、乳頭型、肺胞上皮癌、粘液産生充実癌、混合型の亜型に分類されるが(表1)、病理医間、施設間での診断基準の違いがあり、分子情報を含めた新しい分類が望まれている。

近年 EGFR 阻害剤が一部の症例で著効を示すこと、EGFR 阻害剤の効果と EGFR 変異に強い相関があることが明らかとなり注目を集めている。本邦では EGFR の変異は肺腺癌の30-50%にみられ、女性、非喫煙者の腺癌に多い。一方古典的癌遺伝子の KRAS 変異は、本邦の腺癌の5-15%に認められ、EGFR 変異とは相互排他的 mutually exclusive な関係にある。組織形態と発現形質の面では、EGFR 変異を有する肺腺癌は、肺胞上皮癌様あるいは乳頭状の組織亜型が多く、終末細気管支とII型肺胞上皮の分化を制御する転写因子である thyroid transcription factor (TTF) -1 を発現している。一方、KRAS 変異を有する肺腺癌は、粘液癌で cytokeratin 20 陽性のものが多いという特徴を有している。さらに EGFR 変異、KRAS 変異を有する肺癌は、それぞれ変異 EGFR, 変異 KRAS に“oncogene addiction”と呼ばれる状態にあり、それぞれ EGFR, KRAS を薬剤あるいは遺伝子的に抑制することによりアポトーシスを起こす。EGFR 変異、KRAS 変異を有する肺腺癌では、癌の発生あるいは進展の初期にこれらの遺伝子異常を獲得しており、その後に獲得する遺伝子異常にかかわらず、EGFR 変異、KRAS 変異がそれぞれの癌細胞の生存に必須であると推定されている。以上のようなことから、現在肺癌においても、白血病や悪性リンパ腫と同様、遺伝子異常、発現形質、細胞組織形態を有機的に結びつけた、しかも治療方針とも密接に関連した、統合的な分類が可能ではないかと考えられている(図1)。本研究では、近年増加の著しい腺癌を中心に、現在注目されている癌遺伝子である MET と EML4-ALK に焦点をあて、それぞれ EGFR, KRAS などの遺伝子異常と関連性、TTF-1 を初めとする表現形質、阻害剤に対する感受性などの面から、多面的に肺癌の発生・進展過程の多様性を明らかにすべく解析を進めた。

近年、炎症を背景とした発癌について注目が集まっている。大腸癌を例にとると、炎症

性腸疾患（inflammatory bowel disease, IBD）の代表疾患である潰瘍性大腸炎では、大腸癌の発生頻度の高いことが知られている。通常の大腸癌の adenoma-carcinoma sequence と異なり潰瘍性大腸炎を背景とする大腸癌 colitic cancer では、dysplasia-carcinoma sequence という経路をとる。興味深いことに、通常の大腸癌と潰瘍性大腸炎を背景とする大腸癌では、年齢、好発部位などの臨床病理学的な違いがあるほか、分子病理学的にも、APC, TP53 などの遺伝子異常の起きる時期に違いがあることが知られている。肺癌については、特発性肺線維症/特発性間質性肺炎において肺癌の発生が高いとの報告がこれまでにある。潰瘍性大腸炎を背景とする大腸癌との類似性から、間質性肺炎を背景とした肺癌についても他の肺癌と異なる発癌過程を経ていることが予想される。そこで特発性間質性肺炎を背景とした肺癌の発癌初期におきる発現形質の変化について検索するとともに、特発性間質性肺炎を背景とした肺癌の遺伝子発現、遺伝子異常、分化形質発現などについて、その特徴を調べた。

肺腺癌の組織分類	
•	腺房型
•	乳頭型
•	肺胞上皮癌
•	粘液産生充実型
•	混合型

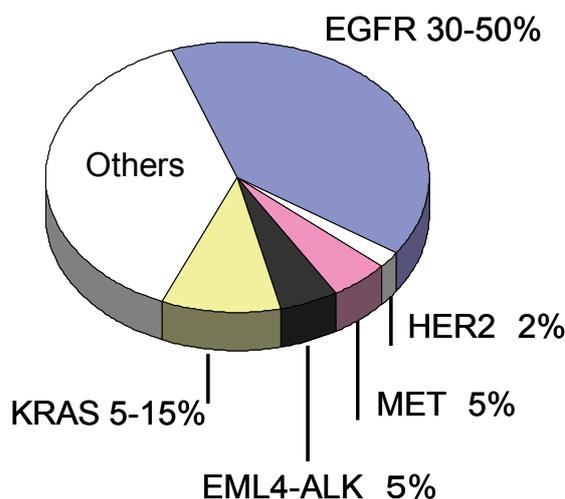


表1 肺腺癌の組織分類
(肺癌取り扱い規約改定第6版 2003 より)

図1 遺伝子異常による肺腺癌の分類
(Shigematsu et al. Cancer Res 2005;
Mitsudomi et al. J Thorac Oncol 2009
を参考に一部改変)

II. 研究方法と成果

II-1 肺腺癌細胞における MET, EGFR 遺伝子異常の検討

MET 遺伝子は 7 番染色体長腕 7q31.2 にあって受容体型のチロシンキナーゼをコードする遺伝子である。肺癌、胃癌、大腸癌、頭頸部癌、卵巣癌などの多くの癌で過剰発現、活性化、遺伝子異常が報告されている。MET の遺伝子異常は、遺伝子増幅、点変異、短い欠失などがあり、遺伝子異常によってリガンド非依存性に恒常的な活性化をもたらされる。

肺癌における MET の発現をみた報告はいくつかあったが、EGFR 変異との関連性についての検討はなかった。

外科的に切除された肺腺癌組織を用いて検討したところ、MET の発現は 74.6% (97/130 例)、高発現は 36.1% (47/130 例)に認められた。またリン酸化 MET に対する抗体を用いて MET の活性化状態を検討した結果、リン酸化 MET は 21.5% (28/130 例)で陽性であり、リン酸化 MET 陽性例は MET を高発現する症例で有意に多かった。リガンドの HGF は 31.5% (41/130 例)で陽性であった。MET を高発現する症例、リン酸化 MET 陽性例は、組織学的に高分化型で乳頭状亜型のものが多く、従来 EGFR 変異のある肺腺癌で報告されている組織学的特徴と共通点があった (Nakamura et al. Cancer Sci 2007)。以上のような経緯をふまえて、MET と EGFR の遺伝子異常の関連性、MET の遺伝子異常を有する肺腺癌と EGFR 変異を有する肺腺癌の特徴を明らかにするために以下の研究を進めた。

(A) 肺腺癌細胞株のパネルを用いた検討

まず肺癌細胞 40 株 (腺癌 35 株、大細胞癌 4 株、腺扁平上皮癌 1 株) のパネルを用いて、EGFR, MET の遺伝子異常、発現、活性化について調べた。KRAS 変異についても検討し EGFR, MET の遺伝子異常との関係をみた。検討に用いた細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC), Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB), RIKEN Cell Bank などから入手した。

MET 遺伝子の増幅は 3 株 (H1648, H1993, L27), MET 変異は 2 株 (H596, H1838)、EGFR 遺伝子の増幅は 3 株 (H661, H1838, HCC827), EGFR 変異は 6 株 (HCC827, HCC4006, PC3, PC14, H1650, H1975)、KRAS 変異は 11 株 (A549, H23, H358, H441, H460, H650, H2009, HLC-1, Lu65, RELF-LC-Ad1, RELF-LC-Ad2)で認められた。EGFR 変異、KRAS 変異、MET 増幅は相互排他的であった。MET の恒常的活性化は 11 株に認められ、MET 増幅を示す 3 株全例、EGFR 変異を示す 6 株のうち 4 株を含んでいた。EGFR の恒常的活性化は、MET 増幅を示す 3 株全例、EGFR 変異を示す 6 株全例を含む 17 株に認められた。MET の恒常的活性化を示す 11 株は、すべて EGFR についても恒常的に活性化しており、MET と EGFR の恒常的活性化に広範な重複があることが判明した。

MET と EGFR の恒常的活性化を示す肺腺癌細胞は、まとまった一群を形成する可能性がある。EGFR 変異を有する肺腺癌は、TTF-1 陽性の terminal bronchial unit (TRU) の cell lineage を示すことが提唱されている (Yatabe and Mitsudomi, Pathol Int, 2007)。しかし、今回検討したところ、EGFR と MET の恒常的活性化を示す 11 株のうち 4 株は TTF-1 陰性であった。そこで気管支上皮細胞の分化マーカーとして、Cytokeratin 7 (CK7) と MUC1 の発現を加えて解析したところ、TTF-1、CK7、MUC1 の発現パターンから、気管支上皮型 (bronchial epithelial type あるいは Group I, n=22) と非気管支上皮型 (non-bronchial epithelial type あるいは Group II, n=18) に分類可能であった。MET 増幅

を示す 3 株、EGFR 変異を示す 6 株、MET の恒常的活性化を示す 11 株はすべて気管支上皮型に属していた。

さらに気管支上皮型 (bronchial epithelial type あるいは Group I) と非気管支上皮型 (non-bronchial epithelial type あるいは Group II) の生物学的な違いを明らかにするために、(1) チロシンキナーゼ型受容体、(2) 接着分子、(3) プロテアーゼ、(4) 細胞外基質、(5) 細胞骨格制御因子 (Rho, Rac, Cdc42) (6) エイコサノイド合成酵素の遺伝子発現との相関をみた。気管支上皮型において高発現する遺伝子には、(1) チロシンキナーゼ型受容体では MET、Her3、(2) 細胞接着分子では Integrin β 6、E-cadherin、P-cadherin、(3) プロテアーゼで uPA、(4) 細胞外基質では laminin 5 (α 3, β 3, γ 2)、(5) 細胞骨格制御因子では Rac2、(6) エイコサノイド合成酵素では Cox-2 であった。逆に非気管支上皮型で高発現する遺伝子としては、細胞外基質の laminin α 1 のほか、中間径フィラメントの vimentin があつた。

(B) 肺腺癌組織の遺伝子発現データを用いた解析

腺癌症例 442 例の遺伝子発現プロファイルデータ (Shedden et al. Nat Med 2008) を用い Group I, II に特徴的な遺伝子によってクラスター解析を行ったところ、細胞株と同様、Group I, II に相当する 2 群に分類された。肺腺癌組織では、さらに Group I の subtype として、分化マーカーの発現は高いが u-PA, COX-2, laminin gamma2 など浸潤関連の遺伝子発現の低い群 (Group IA) と分化マーカーの発現は中等度で u-PA, COX-2, laminin gamma2 など浸潤関連の遺伝子発現の高い群 (Group IB) が認められた。Group IB, Group II に相当する肺腺癌症例は、Group IA の症例よりも有意に予後不良であり組織学的に低分化であつた。

(C) 肺腺癌細胞の薬剤感受性、3次元培養での組織形態についての解析

MET と EGFR の遺伝子異常、またそれに基づいた分類 (気管支上皮型と非気管支上皮型、あるいは Group I と Group II) の生物学的意義を調べるため、分子標的薬剤である EGFR 阻害剤 (gefitinib) と MET 阻害剤 (PHA665752) に対する感受性を肺癌細胞 40 株のパネルで検討した。96 well plate に癌細胞を播き込み、最終濃度 1 nM-10 μ M の範囲でそれぞれの阻害剤を添加し、細胞増殖の抑制を Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて吸光プレートリーダーにて定量した。MET 阻害剤に対しては、高感受性 2 株、中等度感受性 5 株あり、他は抵抗性であつた。EGFR 阻害剤に対しては、高感受性 5 株、中等度感受性 7 株あり、他は抵抗性を示した。MET 阻害剤と EGFR 阻害剤の感受性株には 2 株を除き重複はなかつた。MET 増幅株 3 株は MET 阻害剤感受性、EGFR 変異株 5 株中 H1650 と H1975 を除く 3 株は EGFR 阻害剤感受性であつた。KRAS 変異株のうち MET 阻害剤、EGFR 阻害剤に中等度感受性のものがそれぞれ 2, 4 株あり、他は抵抗性であつた。MET 高活性化、MET 増幅陰性の細胞株の多くは MET 阻害剤抵抗性であつた。また前述した分

類（気管支上皮型と非気管支上皮型、あるいは Group I と Group II)についてみると、EGFR あるいは MET の阻害剤に対して感受性のある細胞のほとんどは、気管支上皮型（あるいは Group I）に属していた。

上皮成長因子受容体（以下 EGFR）変異を有する肺腺癌は、乳頭状あるいは肺胞上皮癌様の組織像と相関することが示されている。このような遺伝子-形態相関についての系統的な解析を肺癌細胞 40 株のパネルを用いて行った。癌細胞をマトリゲル上で培養し、3 日後、Bissellらの分類（Mol Oncol 2007）にならい round or mass、grape-like、stellate の 3 型に分類した。肺癌細胞 40 株はマトリゲル上での集塊の形態により、round or mass (n=30), grape-like (n=4), and stellate (n=6)に分類可能であった。E-cadherin-high の細胞 26 株中 25 株は round or mass の形態を示したが、これに対し E-cadherin-low の細胞 14 株は、round or mass (n=5), grape-like (n=3), and stellate (n=6)などの集塊を形成した。EGFR, MET, HER2 の変異あるいは増幅を示す細胞株(n=13)は、1 株の例外を除き round or mass の集塊を形成した。KRAS 変異の細胞株では一定の傾向はなかった。以上、マトリゲル上での肺癌細胞の形態と EGFR, MET, HER2 の遺伝子異常、E-cadherin 発現との間には関連性が認められたが、KRAS 変異については一定の傾向は認められなかった。

線維芽細胞が癌細胞の浸潤性に与える影響をみるために、肺由来の線維芽細胞 HFLIII を加えた 3 次元共培養を行い、癌細胞の形態変化（浸潤性誘導の有無、浸潤形態）を観察した。癌細胞の浸潤形態は、Friedlらの分類に従って individual あるいは collective とした（Friedl and Wolf, Nat Rev Cancer 2003）。40 細胞のほとんどの細胞において、2-7 日の観察期間の間に線維芽細胞による浸潤性の誘導が認められた。遺伝子異常との関連性をみるために、EGFR 変異を示す 6 細胞株と KRAS 変異を有する 11 細胞株について比較検討したところ、KRAS 変異を有する細胞において individual な浸潤形態がより明瞭に誘導された。

II - 2 EML4-ALK 転座肺癌の検討

本研究実施中の 2007 年 8 月、非小細胞肺癌の新規融合癌遺伝子である echinoderm microtubule associated protein like 4 - anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) が報告された（Soda et al. Nature 448:561-6, 2007）。これは、自治医科大学ゲノム機能研究部の間野教授のグループ（本研究の申請者仁木利郎、共同研究者の石川雄一も参加）が行ったわが国発のオリジナルな研究である。この研究成果は「Nature Medicine」の「2007 年の最も重要な 10 の発見」に選ばれており、優先度の高い研究テーマと言える。そこで石川雄一の研究室では、間野教授との共同研究により以下の研究を進めた。

(A) EML4-ALK 融合遺伝子の発癌性

EML4-ALK 融合遺伝子を導入した transgenic (Tg)マウスを作製して、その発癌性を検討した。2 型肺胞上皮特異的に発現する surfactant protein C gene (SPC)遺伝子プロモーター下流に EML4-ALK cDNA を結合した断片を C57BL6J マウス卵に注入し、Tg マウスを

作成した。EML4-ALK Tg マウスは生後わずか数週間で両肺に数百個の肺腺癌腫瘍を形成し、さらに系時的に腫瘍の拡大・進展が観察された。また、ALK チロシンキナーゼ阻害剤による Tg マウス肺癌の治療実験の結果、阻害剤は劇的に奏効し、すべての腫瘍は瘢痕と思われる陰影を残して消失した。ヒトにおいても、効果があると期待される (Soda et al. PNAS 2008)。

(B) 融合遺伝子のさらなる variant の検出

EML4-ALK 融合遺伝子は、EML4 遺伝子の切断部位の違いにより、2 種類の variant のあることが当初報告されていた (Soda et al. Nature 2007)。multiplex PCR 法と高感度免疫染色法を用いることにより、EML4-ALK 融合遺伝子の新たな variant の検出を行うとともに、EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌の頻度と臨床病理学的特徴を明らかにした。

1997 年 5 月から 2004 年 2 月までに癌研究所附属病院にて外科的に切除された肺癌 363 例 (組織型の内訳は、腺癌 253 例、腺扁平上皮癌 7 例、扁平上皮癌 72 例、大細胞癌 4 例、多形癌 2 例、小細胞癌 22 例) を検索に用いた。凍結検体より RNA を抽出し、cDNA を合成後、ALK 遺伝子の exon 20 と理論上 in-frame で融合することが予想される 6 つの exon (exon 2, 6, 13, 18, 20, 21) に上流 primer を設定し multiplex RT-PCR 法にて EML4-ALK 融合遺伝子を検出した。

検索した腺癌 253 例のうち 11 例において EML4-ALK 融合遺伝子を検出した。9 例はこれまで報告のあった variant 1-3 (それぞれ EML4 の exon 13, exon 20, exon 6 が ALK の exon 20 と融合)、2 例は新たな variant 4,5 (それぞれ EML4 の exon 14, exon 5 が ALK の exon 20 と融合)であった (Takeuchi et al. Clin Cancer Res 2008)。

多くの施設ではホルマリン固定、パラフィン包埋した病理組織検体が診断の主体であることから、ホルマリン固定、パラフィン包埋した病理切片で ALK の発現を検出する高感度免疫染色法を開発した (intercalated antibody-enhanced polymer method, iAEP 法)。この方法により、上記 multiplex RT-PCR 法にて検出した EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌は、すべて ALK 陽性であった。iAEP 法を用いて肺腺癌をスクリーニングし、新たな EML4-ALK 融合遺伝子 variant を 2 つ (variant 6, 7) と新たな融合遺伝子 KIF5B-ALK 4 例を発見した (Takeuchi et al. Clin Cancer Res 2009)。

(C) ヒト EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌の臨床病理学的特徴

ALK 融合遺伝子陽性肺癌の特徴を明らかにするため、さまざまな臨床病理的事項について、EML4-ALK 陽性肺癌と EML4-ALK 陰性肺癌を比較した。

EML4-ALK 陽性肺癌は、腺癌の 4.3% (11/253 例) に認められた。腺癌以外の組織型には 1 例もみられなかった。EML4-ALK 陽性例は 50 歳以下の患者の割合が高く (36%、4/11 例)、EML4-ALK 陰性例 (5%、12/242 例) との間には有意差を認めた ($P=0.00038$)。平均年齢も EML4-ALK 陽性例は陰性例に比し有意に若かった (平均年齢 56 ± 11 vs. 64 ± 9)。性差はなかった。喫煙との関連性については、重喫煙者は 1 例のみで、ほとんどが非喫煙者ないし軽度喫煙者であることなどが判明した。組織学的には腺房型亜型が多く、分化度の低い傾向にある特徴を有していた (Inamura et al. J Thorac Oncol 2008, Inamura et al. Mod Pathol 2009)。

Thyroid transcription factor (TTF) -1 は、終末細気管支とⅡ型肺胞上皮の分化を制御する転写因子である。EGFR 変異陽性の肺腺癌は、ほとんどが TTF-1 陽性で cell-lineage の点から terminal respiratory type (TRU) type とすることが提唱されている(Yatabe and Mitsudomi Pathol Int 2007)。また EGFR 変異と KRAS 変異は、同一腫瘍内に重複して検出されることは稀であり、相互排他的な関係にあることが明らかになっている。今回の検討では、EML4-ALK 陽性肺癌は全例 TTF-1 陽性であり cell lineage の観点からは、肺胞上皮への分化を示していた。EGFR 変異の有無の判明している 80 例、KRAS 変異の有無の判明している 68 例について、EML4-ALK との関係を検討したところ、ALK 融合遺伝子肺癌には EGFR 変異、KRAS 変異は 1 例もなく、EGFR 変異を有する発癌経路の異なる肺癌である可能性が示唆された。

Ⅱ-3 炎症を背景とする肺癌の検討

(A) 特発性肺線維症/特発性間質性肺炎 (idiopathic pulmonary fibrosis IPF/usual interstitial pneumonia UIP)において、PCR にて EBV を約半数の症例で検出したとの報告もある(Stewart et al. Am J Respir Crit Care Med 1999)。その報告では、病変部の上皮細胞に Epstein-Barr ウイルス(EBV)が感染しており、腫瘍発生に寄与する可能性が示唆される。これまで腫瘍発生に EBV が関与していると広く知られている上皮性腫瘍としては上咽頭癌やEBV関連胃癌がある。これらの腫瘍はEBV由来のRNAであるEBERをin-situ hybridization (ISH)法にて検出することができる。2005年6月から2008年10月の期間に東京大学医学部附属病院にて外科的に切除された肺癌検体より組織マイクロアレイを作製し、EBER に対する ISH 法にて検討した。症例の内訳は、肺腺癌 168 例、肺扁平上皮癌 39 例、肺小細胞癌 4 例と混合型小細胞癌 2 例、大細胞神経内分泌癌 4 例、多型癌 7 例である。そのうち扁平上皮癌 4 例、腺癌 1 例の背景肺に IPF/UIP pattern を認めた。検討の結果、腫瘍細胞とその周囲のリンパ球ともに陽性になる症例はなかった。東京大学附属病院症例では EB ウイルスの関与はないことが明らかになった。

(B) 特発性肺線維症/特発性間質性肺炎を背景にした肺癌では、末梢性の扁平上皮癌が多い。特発性肺線維症/特発性間質性肺炎の組織を調べると末梢肺組織に扁平上皮化生が高頻度で認められ、ときに異型を伴った異形成病変も観察される。このようなことから、中枢型の太い気管支に発生する扁平上皮癌と同様、扁平上皮化生が特発性肺線維症/特発性間質性肺炎を背景とする肺扁平上皮癌の前駆病変と現在考えられている。そこで特発性肺線維症/特発性間質性肺炎における扁平上皮化生に焦点をあてて、肺扁平上皮癌の発生、分化にかかわる分子の発現を検討した。

1. Aldo-keto reductase (AKR) 1B10 の発現についての検討

AKR1B10 は、本研究の共同研究者の深山が、東京大学先端科学技術センターの油谷浩幸教授との共同研究で発見した、肺扁平上皮癌と喫煙者肺腺癌のバイオマーカーである。肺癌を伴う IPF/UIP 13 症例、肺癌を伴わない IPF/UIP 13 症例、IPF/UIP のない肺 30 症例について、抗 AKR1B10 抗体 (油谷浩幸教授の研究室にて作製) を用いて免疫組織学的に検討した。AKR1B10 の発現は、扁平上皮癌の癌細胞と扁平上皮化生巣にのみ認められ

た。AKR1B10 は、肺癌を伴う IPF/UIP の扁平上皮化生巣では 67% (24/36)、肺癌を伴わない IPF/UIP の扁平上皮化生巣では 37% (16/44)に認められ、両者の間に有意差を認めた ($P<.01$)。また細胞増殖のマーカーである Ki-67 labeling index は、AKR1B10 陽性の扁平上皮化生で 25.7 ± 5.4 であり、AKR1B10 陰性の扁平上皮化生の Ki-67 labeling index 12.7 ± 3.5 との間に有意差を認めた (Li et al. Pathol Res Pract 2008)。

2. p63 の発現についての検討

p63 は癌抑制遺伝子 p53 との相同性を示す分子として発見された。癌抑制遺伝子である p53 と異なり、p63 の遺伝子変異はまれであるが、p63 のノックアウトマウスの解析により、p63 が重層扁平上皮の分化に必須であることが明らかとなっている。IPF/UIP11 症例の扁平上皮化生巣 24 病変について p63 の発現を免疫染色でみたところ、扁平上皮化生巣の全例において扁平上皮化生の部分に一致して p63 の発現が確認された。次に、扁平上皮化生巣の形成における p63 の意義について検討するため、不死化した気管支上皮細胞 BEAS-2B 細胞の培養系 (Lechner et al. 1982)を用いて検討した。BEAS-2B 細胞は American Type Culture Collection (ATCC)から購入した。BEAS-2B 細胞を Bronchial Epithelial Cell Growth Medium にて培養し、最終濃度 4-400pM の Recombinant Human TGF β 1 (R&D Systems)を添加することにより、用量依存性、時間依存性に、jag1, involucrin, cytokeratin 6, cytokeratin 14 とともに p63 の誘導が認められた。この誘導系において、siRNA により p63 の誘導を抑制すると jag1 の誘導は抑制されたが、involucrin, cytokeratin 6, cytokeratin 14 の誘導には影響がみられなかった (Murata et al. Exp Mol Pathol 2007)。

(C) 炎症を背景とする肺癌の特徴を明らかにするため、遺伝子発現プロファイル解析を行った。肺癌組織から RNA を抽出し Affymetrix 社の DNA チップ、特にエクソンアレイにて解析した。対象としては、2005 年以降、東京大学附属病院にて外科的に切除された肺扁平上皮癌 12 例、肺腺癌 24 例を検討に用いた。肺扁平上皮癌 12 例のうち、特発性肺線維症/特発性間質性肺炎の症例が 1 例、肺気腫や他の間質性肺炎が疑われる症例が 3 例あった。これら肺線維症 4 例と他の 8 例の遺伝子発現プロファイルを比較するためクラスタ解析を施行した。

解析の結果、肺線維症群で特に発現の亢進している遺伝子群はリンパ球系表面抗原やケモカインやサイトカインのリガンドや受容体 (CD19, CD27, IL1RL1, IL8RA など)であった。肺線維症という炎症を背景にした病変の浸潤リンパ球を見ている可能性があるが、ケモカインやサイトカインのリガンドや受容体が腫瘍で発現している可能性も想定された。また逆に発現の低下している遺伝子群には細胞周期を負に調節する因子 (CDKN2A, CDKN3) がみられた。

III. 考察

従来の肺癌は組織像により、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌、小細胞癌の 4 基本型に分類され、さらにそれぞれがいくつかの亜型に分類されてきた。腺癌については、WHO 分類、規約分類ともに、腺房型、乳頭型、肺胞上皮癌、粘液産生充実型、混合型に分類されてい

る。しかし、現在の肺癌の治療体系はあくまで病期分類（ステージ）に基づいており、組織分類の臨床的意義は明確ではない。これに対し、現在、白血病や悪性リンパ腫と同様、遺伝子異常の基づいて肺腺癌を分類することが提唱されている。注目すべきは、（１）これら遺伝子異常の間に重複が稀であること、（２）発現形質、細胞組織形態との間に一定の相関があること、（３）それぞれに対する分子標的に対する阻害剤や siRNA により治療効果を期待できることである。腺癌の発生・進展の観点からみると、EGFR, HER2, MET, EML4-ALK, KRAS の異常を有する癌は、発癌経路に違いのあることが推定され興味深い。

本研究では、最近注目を集めている MET と新規癌遺伝子 EML4-ALK に焦点をあてて、EGFR, KRAS との関連性、細胞組織形態、表現形質、薬剤感受性について詳細な検討を行った。MET 増幅を有する細胞と EGFR 変異を有する細胞には、MET と EGFR の活性化、気管支上皮の分化形質の発現、E-cadherin の発現、さらには浸潤に関連した分子 Integrin β 6、P-cadherin、u-PA、laminin 5 などの発現において共通性があることが判明した。これに対し、（１）MET 増幅や EGFR 変異がなく、MET と EGFR の活性化レベルが低い、（２）気管支上皮の分化形質の発現が低い、（３）E-cadherin の低発現と vimentin の高発現という特徴を有する肺腺癌の一群（Group II）のあることが明らかとなった。現在のところ、この一群を特徴付ける遺伝子変異はなくその発癌・進展経路は明らかでないが、今回みた肺腺癌細胞株の中で KRAS 変異もつものの一部は Group II に属しており、少なくとも Group II の一部は KRAS 変異を経た発癌・進展経路が推定される。

最近、EGFR 阻害剤の耐性獲得には MET 遺伝子の増幅が関与していることが明らかとなった(Engelman et al. Science 2007)。通常 MET 増幅と EGFR 変異の共存する癌は稀であるが、EGFR 阻害剤による治療により選択圧が加わった結果と解釈することが可能と思われる。今後、どのような状況で図 1 のように分類された肺腺癌の中で遺伝子異常の重複が起きうるものか、あるいは表現形質や生物学的特性の変化がおきるものか、などのついては、今後さらなる検討をしてゆく必要がある。

EML4-ALK については、いくつかの新たな variant の存在が明らかとなった。多数の症例を用いた検討により、本邦におけるすべての variant を含めた EML4-ALK 肺腺癌の頻度は切除肺腺癌の 5%前後と考えられる。まだ報告数は少ないが、いくつかの国外からの報告例から推定すると、米国、欧州、中国などでもほぼ同様の頻度と思われる (Koivunen et al. Clin Cancer Res 2008; Boland et al. Hum Pathol 2009; Wong et al. Cancer 2009)。また EGFR, KRAS との重複がないことから、図 1 のような関係にあることが判明した。形態—遺伝子相関の観点からは、EML4-ALK 融合遺伝子を有する肺腺癌は極めて特徴的な組織形態をとること、TTF-1 を発現することなども明らかとなった。治療面では、すでにいくつかの製薬会社が ALK キナーゼ阻害剤を開発し、臨床試験が進行している。EML4-ALK 融合遺伝子を有する肺腺癌症例に対し、ALK キナーゼ阻害剤が劇的な効果をもたらしたことが学会では発表されており、今後の症例集積が待たれる。

特発性間質性肺炎を背景とした肺癌については、ケモカインやサイトカインのリガンドや受容体の発現亢進、細胞周期を負に調節する因子の発現低下などの特徴を見出した。特発性間質性肺炎を背景とした肺癌には喫煙者が多く、組織型については扁平上皮癌が多い。今後、さらに遺伝子変異、増幅などの遺伝子異常についても解析を進め、特発性間質性肺炎を背景とした肺癌の特徴を、遺伝子異常、発現形質、生物学的特性の面から明らかにし

たい。

IV. 研究成果の発表

- 1) Wang T, Niki T, Goto A, Ota S, Morikawa T, Nakamura Y, Ohara E, Ishikawa S, Aburatani H, Nakajima J, Fukayama M. Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cells A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Cancer Sci* 2007;98:506-11.
- 2) Nakamura Y, Niki T, Goto A, Morikawa T, Miyazawa K, Nakajima J, Fukayama M. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci.* 2007;98:1006-13.
- 3) Murata K, Ota S, Niki T, Goto A, Li C-P, Ruriko UMR, Ishikawa S, Aburatani H, Kuriyama T, Fukayama M. p63 – key molecule in early phase of epithelial abnormality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 2007;83:367-76.
- 4) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561-6.
- 5) Sano A, Kage H, Sugimoto K, Kitagawa H, Aki N, Goto A, Fukayama M, Nakajima J, Takamoto S, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. A second-generation profiling system for quantitative methylation analysis of multiple gene promoters: application to lung cancer. *Oncogene* 2007;26:6518-25.
- 6) Inamura K, Shimoji T, Ninomiya H, Hiramatsu M, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Noda T, Fukayama M, Ishikawa Y. A metastatic signature in entire lung adenocarcinomas irrespective of morphological heterogeneity. *Hum Pathol* 38(5):702-9, 2007
- 7) Horiike A, Kimura H, Nishio K, Ohyanagi F, Satoh Y, Okumura S, Ishikawa Y, Nakagawa K, Horai T, Nishio M. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer. *Chest* 131:1628-34, 2007
- 8) Inamura K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Hiramatsu M, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa Y. Up-regulation of PTEN at the transcriptional level is an adverse prognostic factor in female lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 57: 201-206, 2007.
- 9) Inamura K, Togashi Y, Okui M, Ninomiya H, Hiramatsu M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Shimoji T, Noda T, Ishikawa Y. HOXB2 as a novel prognostic indicator for Stage I lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2: 802-7, 2007
- 10) Inamura K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Hiramatsu M, Satoh Y, Okumura S,

Nakagawa K, Ishikawa Y. let-7 microRNA expression is reduced in bronchioloalveolar carcinoma, a non-invasive carcinoma, and is not correlated with prognosis. *Lung Cancer*. 58:392-6, 2007.

11) Li CP, Goto A, Watanabe A, Murata K, Ota S, Niki T, Aburatani H, Fukayama M. AKR1B10 in usual interstitial pneumonia: Expression in squamous metaplasia in association with smoking and lung cancer. *Pathol Res Pract*. 2008;204:295-304.

12) Nakamura Y, Matsubara D, Goto A, Ota S, Oguni S, Ishikawa S, Aburatani H, Miyazawa K, Fukayama M, Niki T. Constitutive activation of c-Met is correlated with c-Met overexpression and dependent on cell-matrix adhesion in lung adenocarcinoma cell lines. *Cancer Sci* 2008;99:14-22.

13) Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, Haruta H, Hamada T, Yamashita Y, Ishikawa Y, Sugiyama Y, Mano H. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:19893-7.

14) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H, Ishikawa Y. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*, 3: 13-7, 2008.

15) Shimmyo T, Okada A, Hashimoto T, Kobayashi Y, Miyagi Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Osada H, Tsuchiya E. Etiologic value of p53 mutation spectra and differences with histology in lung cancers. *Cancer Sci*. 99: 287-95, 2008.

16) Matsubara D, Morikawa T, Goto A, Nakajima J, Fukayama M, Niki T. Subepithelial myofibroblast in lung adenocarcinoma: a histologic indicator of excellent prognosis. *Mod Pathol* 2009;22:776-85.

17) Ninomiya H, Hiramatsu M, Inamura K, Nomura K, Okui M, Miyoshi T, Okumura S, Satoh Y, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Miyata S, Tsuchiya E, Fukayama M, Ishikawa Y. Correlation between morphology and EGFR mutations in lung adenocarcinomas. Significance of the micropapillary pattern and the hobnail cell type. *Lung Cancer* 63(2):235-40, 2009.

18) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinin identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*, 15(9):3143-9, 2009.

19) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Lim Choi Y, Mano H, Ishikawa Y. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 22: 508-515, 2009

- 20) Matsubara S, Ishikawa S, Oguni S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
Classification of lung adenocarcinoma cell lines by integrated information of epidermal growth factor receptor and MET abnormalities and gene expression pattern
(submitted)
- 21) Matsubara S, Ishikawa S, Oguni S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
Predictors of sensitivities to MET inhibitor PHA665752 in lung adenocarcinoma cell lines. (in preparation)
- 22) Matsubara S, Ishikawa S, Oguni S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T. Lung adenocarcinoma cell lines show genetic-morphologic correlations in three-dimensional culture. (in preparation)