

肺癌の発生と進展—病理検体を用いた多面的解析*

後 藤 明 輝

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 器官病態学講座

(平成 24 年 3 月 8 日掲載決定)

Study of lung cancer development using pathology archive specimens

Akiteru Goto

Department of Cellular and Organ Pathology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words: 肺がん, ホルマリン固定パラフィン包埋検体, マイクロ RNA, 化学療法感受性, 間質浸潤

はじめに

手術,あるいは生検で切除された人体組織は通常,ホルマリン固定,パラフィン包埋,薄切,染色の過程を経ていわゆるプレパラートの病理標本となる。これを病理医が顕微鏡で観察し,病理診断が下される。この際,最終的にプレパラート上の標本となるのは切除組織のうち,ごくわずかであり(数マイクロメートルの厚みの切片),大部分はパラフィンブロックとして病院の病理部門で保存される。カルテやCT, MRIなどの画像の保存が,いわば病院の各患者に関する情報の記録と言えるのに対し,病理ブロックの保存は患者に関する病院の物質としての記憶と言えよう(図1)。では,病理ブロックを保存することの意味として,どのようなことが考えられるだろうか。

ひとつには,病理スライドの再作成に備える意味がある。良好な保存状態であってもプレパラートの病理標本は染色の劣化をまぬがれない。一方,がんや各種の疾患では,かつてのその患者の病理所見がいかなるものであったか,その後の経過の中で見直す必要が生じたり,患者が他院を受診する際,病理プレパラート



図 1.

の提供が求められることがしばしばある。こうした場合,病理ブロックから良好な染色状態の病理プレパラートを再作成することが可能である。

次に,分子医学の進歩の点からの病理ブロック保存の必要性があげられる。すなわち,数年前の手術時には明らかでなく,その後,治療選択にかかわる分子マーカーが同定されたとする。もし病理ブロックが保存されていれば,そのマーカーの評価が後から可能となる。肺がんにおける *EGFR* や *ALK* 評価などが好例であろう。

最後に,研究リソースとしての病理ブロックの重要性があげられる。

病理ブロックは他の臨床サンプルに比べ,圧倒的多数の蓄積があり,また,その臨床情報も確実性が高い。

Correspondence : Akiteru Goto, M.D., Ph.O.
Department of Cellular and Organ Pathology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel : 81-18-884-6062
Fax : 81-18-884-6441
E-mail : akigoto@med.akita-u.ac.jp

*平成 24 年 1 月 17 日 教授就任記念講演

(2)

肺癌の発生と進展—病理検体を用いた多面的解析

したがって、研究リソースとしての利点が多いが、一方でホルマリン固定などによる DNA, RNA の断片化、変性などの欠点もある。また、臨床サンプルであるのでその利用にあたって、患者承諾はもちろんであるが、倫理面での種々の配慮が求められることは言うまでもない。

本稿では、病理ブロックをもとにした研究につき、肺癌とマイクロ RNA 異常の関わりを中心として概説したい。

肺癌とマイクロ RNA 異常

肺癌の発生に関し、近年 EGFR 遺伝子異常や ALK 融合遺伝子の形成など、分子標的治療に直結する遺伝子異常が発見され、話題をよんでいる（文献 1, 2）。しかしながら、分子標的治療に直結するような遺伝子異常をもつ肺癌はごく一部である。したがって、肺癌の克服に向かっては genetic な異常をさらに同定する必要があるとともに、epigenetic な異常も探索する必要がある。肺癌の epigenetics については、喫煙と p16 プロモーター領域のメチル化の関連などがよく知られており、DNA メチル化が肺癌の発生と進展に大きな役割を果たしていることがほぼ確実である。同時に、がんの epigenetics の分野では近年、マイクロ RNA 異常が注目を浴びている（文献 3, 4）。

マイクロ RNA とは何か？ マイクロ RNA は長さ

20 数塩基長の一本鎖 RNA (non-coding RNA) であり、遺伝子発現に抑制的に働くとされる。生物の発生分化や恒常性の維持に重要であり、ヒトでは 1,000 種類以上が同定されている。

それぞれのマイクロ RNA は 3 末端側非翻訳領域の相補性にもとづき、ターゲットとなる mRNA の分解あるいは翻訳抑制をもたらす（図 2）。マイクロ RNA の発現パターンは、各臓器および組織に異なる。また、各種疾患では正常臓器、組織と発現パターンが異なっており、バイオマーカーとして、あるいは疾患の原因を探求するうえで近年大きな注目を集めている。がんの臨床、研究でもマイクロ RNA 異常は大きなテーマである。マイクロ RNA はエクソソームとしてがん細胞外にも放出され、表 1 にしめすような各種のがんに特異的なマイクロ RNA の変動が血清検体を用いても

表 1. がんと血清マイクロ RNA

がんの種類	血清マイクロ RNA
前立腺がん	Mir-141 (↑), Mir-210 (↑)
肝がん	Mir-500 (↑)
急性リンパ性白血病	Mir-92a (↓)
悪性リンパ腫 (DLBCL)	Mir-21 (↑), Mir-155 (↑), Mir-210 (↓)
乳がん	Mir-195 (↑)

DLBCL, Diffuse Large B-cell Lymphoma

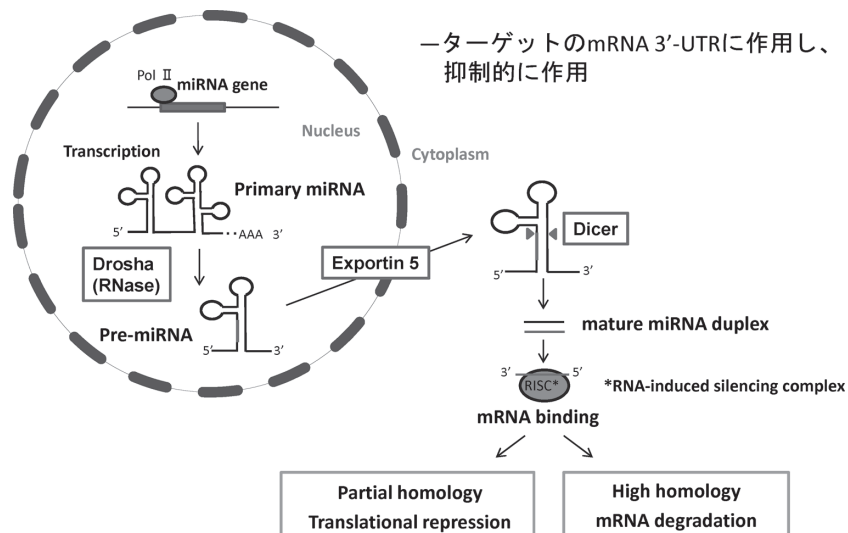


図 2.

表2. がんで異常をきたす主なマイクロRNAとそのターゲット

マイクロ RNA	ターゲット
Let-7 (↓)	Kras, HMGA2
Mir-21 (↑)	PTEN
Mir-155 (↑)	SOCS1
Mir-29 (↓)	DNMT3a, 3b

(↓) がんで発現低下傾向を示す. (↑) がんで発現亢進傾向を示す.

確認することができる。また、がんの発生、進展にもマイクロRNAが大きな役割を果たしている。その際には、マイクロRNA自体というよりは、そのターゲットを介して作用を発揮することが重要と思われる。表2でしめすとおり、がんで発現異常のみられる主なマイクロRNAでは、そのターゲットとしてがんの発生進展にかかわる遺伝子が多く含まれることは興味深い。

多数のマイクロRNAの発現パターンを同時に解析できるマイクロRNAマイクロアレイを用いた研究では、正常肺組織に対して肺がんで発現異常のみられるマイクロRNAとして43種類のマイクロRNAがあげられ、なかでもmir-155の高発現やlet-7aの低発現は症例の予後不良因子であるとされる(文献4)。さらに、非喫煙者肺がんに着目した研究では、非喫煙者に発生する肺がんで、mir-21の発現亢進が喫煙者の肺がんと比べて顕著であった(文献5)。さらに、非喫煙者の肺がんで、EGFR遺伝子変異を有するものはそうでないものに比べ、mir-21の発現が高かった。こうした結果をもとにEGFR-TKI(チロシンキナーゼ阻害剤)とmir-21阻害の併用をEGFR遺伝子変異陽性の肺腺がん細胞株にこころみところ、おのおの単独で用いるよりもアポトーシス誘導効果が増強された。

このように、マイクロRNA異常は肺がんのバイオマーカーとして、あるいは治療標的として価値を持つと考えられる。一方、マイクロRNAは20塩基長たらずの小さな分子である。そこで、ホルマリン固定などの化学的処理によってRNAの断片化、変性のみられる病理ブロックであっても十分にマイクロRNAは定量可能ではないかと着想し、病理ブロックを用いた肺がんとマイクロRNA異常の関連の研究を行った。研究は、“化学療法感受性”と“間質浸潤”に重点を置

いたものである。

肺がんの化学療法感受性とマイクロRNA

手術可能な非小細胞肺がんに対し、術後の化学療法が有効であるかどうかは議論のあるところであった。この有効性を確認すべく行われたのが、International Adjuvant Lung Cancer Trial (IALT)である。33か国、1,867例を対象とした観察の結果、5年の経過観察期間ではシスプラチンを主体とする術後補助化学療法が有効との結論を得た(文献6)。

しかるに、集団全体として有効性が証明されたとしても個別の症例の化学療法反応性が不明であることは大きな問題として残る。IALT研究では、参加した1,867例のうち、786例について研究委員会(IALT-Bio)で病理ブロックを保存しており、化学療法感受性マーカーの探索研究に試料を提供している。われわれは、特定のマイクロRNAがマーカーとなるか検討するため、IALT-Bioに研究計画を提示し、試料利用の承諾を得た。

検討対象としたマイクロRNAはmir-155, mir-21, mir-29, mir-34a, mir-34b, mir-34c, let-7aの7種類であった。それぞれ、肺がんで異常が知られている、DNAメチル化関連遺伝子の抑制に関与する、p53と関連する、などが選択の理由である。IALT-Bioで患者予後や、各症例の遺伝子異常(Kras, EGFR, p53)などは情報管理されている。これらのマイクロRNAの測定結果はIALT-Bioに送られ、そこで統計解析は施行された(文献7)。

結果はどうであったか? 残念ながら、検索した7種類のマイクロRNAのなかには、化学療法反応性のマーカーは認められなかった。一例として、mir-21と化学療法反応性の関連を表3に示す。786例のうち、腫瘍壊死などの強い症例を除外すると697例が解析対象となった。そのうち、mir-21が信頼性を持って定

表3. 肺がん症例のmiR21発現と8年生存率

	補助化学療法 (+)	補助化学療法 (-)	
miR-21 (-)	111/163 29%	98/152 35%	P=0.45
miR-21 (+)	96/161 39%	91/155 41%	P=0.84
	P=0.33	P=0.08	

(4)

肺癌の発生と進展—病理検体を用いた多面的解析

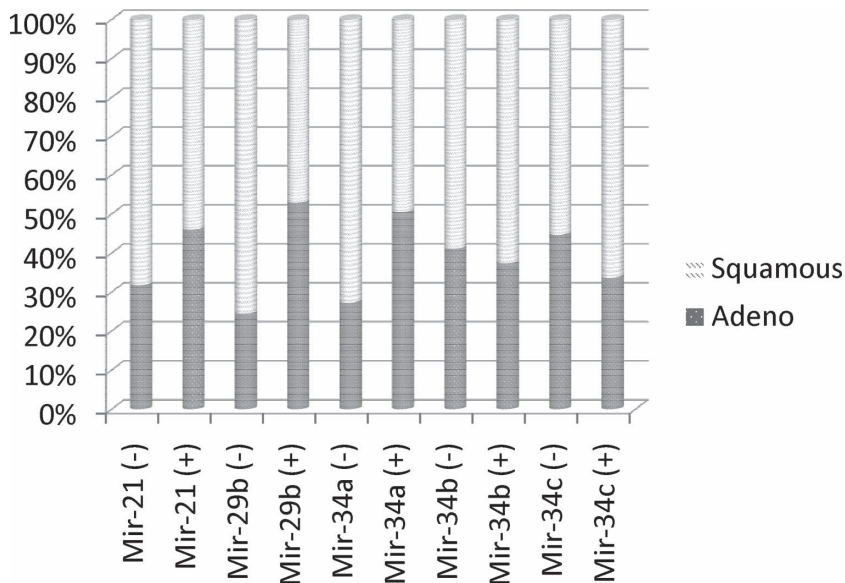


図 3.

量可能であった症例は 631 例である (90.5%)。これらの症例を mir-21 測定値の中央値で mir-21 (+) と mir-21 (-) 群に 2 分すると、表 3 のとおりとなる。補助化学療法 (+) であった症例では、mir-21 (+) と (-) の 2 群で 8 年生存率に差が無い、すなわち、mir-21 が化学療法反応性の指標にならなかったことがわかる。他のマイクロ RNA についても、同様の結果であった。

また、これらのマイクロ RNA と *Kras* などの遺伝子異常の関連も明らかではなかった。

ただし、図 3 に示すとおり、肺癌組織型 (腺がん、扁平上皮がん) により、各マイクロ RNA の発現パターンは異なることが判明した。

当初目的とした肺癌の化学療法反応性マーカーとなるマイクロ RNA を見出す、ということは達成できなかったが、700 例近い多数例の病理ブロックから安定的にマイクロ RNA を測定するという技術的成果があがった点や、マイクロ RNA と肺癌組織型との関連を見出したという点からみれば十分に意義ある研究だったと言える。

特定のマイクロ RNA が肺癌の化学療法感受性マーカーとなりうる、という仮説自体はこの研究で否定されたわけではない。1,000 を超えるマイクロ RNA のうち、7 つのマイクロ RNA がマーカーとならなかつ

たというわけであり、今後マイクロ RNA マイクロアレイを用いた網羅的検討や、組織型別のより詳細な検討でマーカーを見出す可能性は十分にあると考えている。その方向性で研究を継続する予定である。

肺腺がんの間質浸潤とマイクロ RNA

肺腺がんについて、異型腺腫様過形成 (AAH, Atypical Adenomatous Hyperplasia) から上皮内がんを経て浸潤がんへといたる進展経路が提唱されている。上皮内がんにくらべ、浸潤がんでは患者予後が悪いことは良く知られており、病理学的にはこの違いはいわゆる野口分類として反映されている (文献 8)。このように、上皮内がんから浸潤がんに至るステップは、臨床的にも、生物学的にもクリティカルと考えられる。この過程にマイクロ RNA が関与しているかを検証するため、病理検体を用いた研究を行っている。

図 4 にしめすような、上皮内がんと浸潤がん成分が混在するような肺腺がんを対象として、上皮内がん成分と浸潤がん成分を LMD (Laser Microdissection) 装置を用いて顕微鏡視下に切り分けた (図 5, 図 6)。それぞれの成分のマイクロ RNA 発現パターンをマイクロ RNA マイクロアレイ (東レ 3D—Gene) で比較した。

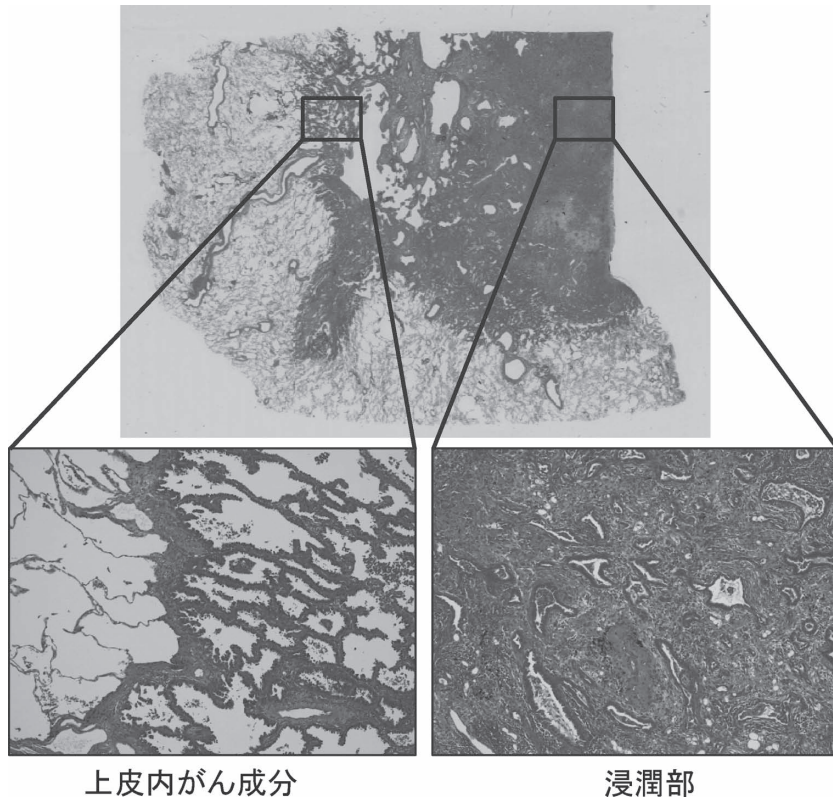


図 4.



図 5.

その結果、興味深いことが判明した。肺腺がんの臨床、研究で着目される *EGFR* 遺伝子変異を有する肺腺がん、*EGFR* 遺伝子変異を持たない肺腺がんでは、浸潤にともなって変動するマイクロ RNA のパターン

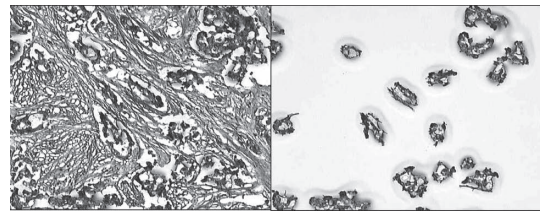


図 6.

が異なるのである (図 6)。

現在、*EGFR* 遺伝子変異を持つ肺腺がんでは変動の大きかったマイクロ RNA と、*EGFR* 遺伝子変異を持たない肺腺がんでは変動の大きかったマイクロ RNA のそれぞれにつき、肺腺がん細胞株を用い、マイクロ RNA の発現抑制ないし強制発現が細胞の浸潤能にどのような変動をもたらすか、あるいは上皮間葉転換に関わるか、細胞生物学的に検討中である。

(6)

肺癌の発生と進展—病理検体を用いた多面的解析

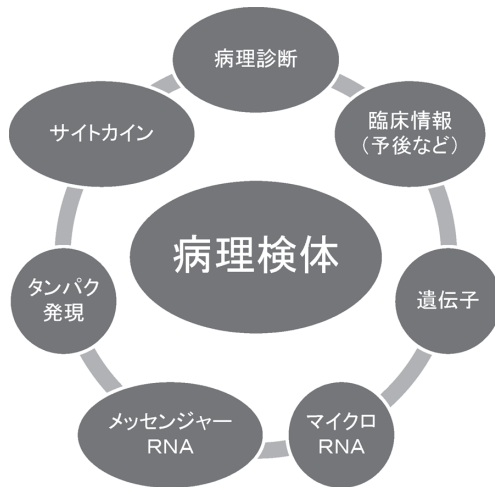


図 7.

おわりに 病理検体を用いた多面的解析にむけて

肺がんのマイクロRNA異常を中心に病理ブロックを用いた研究について述べた。病理ブロックからはそのほか、遺伝子異常、mRNA発現、タンパク発現、サイトカイン発現など様々な分子情報を得ることができる。また、病理診断や臨床情報ももちろん得ることができる。このように、病理検体から古典的な病理診断にとどまらず、多面的な情報を抽出することが今後の人体病理学の方向性であると考えている(図7)。多面的な情報の組み合わせからは、それぞれ単独では想定できなかったような意外な生物学的発見や因果関係の解明がもたらされるものと期待しつつ、研究に励んでいる。

今後、様々な病理形態学分野の新規手法をとりいれて病理ブロックを用いた研究を進展させ、その基盤となるハード、ソフトを充実させるとともに、基礎医学、臨床医学にまたがる秋田大学内の各グループの研究に協力、貢献していきたい。

文 献

- 1) Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., *et al.* (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.*, **350** (21), 2129-2139.
- 2) Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., *et al.* (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, **448** (7153), 561-566.
- 3) Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Palmisano, W.A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (1998) Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95** (20), 11891-11896.
- 4) Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., *et al.* (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, **9** (3), 189-198.
- 5) Seike, M., Goto, A., Okano, T., *et al.* (2009) MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106** (29), 12085-12090.
- 6) Arriagada, R., Bergman, B., Dunant, A., Le, Chevalier, T., Pignon, J.P. and Vansteenkiste, J. (2004) International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, **350** (4), 351-360.
- 7) Voortman, J.*, Goto, A.*, Mendiboure, J., *et al.* (*: Equal contribution) (2010) MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, **70** (21), 8288-8298.
- 8) Noguchi, M., Morikawa, A., Kawasaki, M., Matsuno, Y., Yamada, T., Hirohashi, S., Kondo, H. and Shimamoto, Y. (1995) Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*, **75** (12), 2844-2852.