

ゲノム異常解析から見た肺腺がんの分類

柴田龍弘¹

要旨—— **目的, 研究方法.** 肺がんは未だに予後不良な腫瘍の一つであり, しかもその発生は本邦を含め世界的に増加傾向にある. 肺がんは病理組織学的に多彩な組織像を呈することが知られているが, その本態であるゲノム異常については未だ全貌は明らかではない. 肺腺がん切除標本における染色体構造異常をゲノム全体に亘って網羅的に解析するために, 臨床検体からマイクロダイセクションによりがん細胞のみを選別し, 800 個のがん関連遺伝子を搭載したアレイを用いたアレイ CGH 解析を行った. **結果.** 肺腺がん 55 症例を解析し, 高頻度増幅やホモ欠失領域を含め, 多数のゲノム異常を検出した. ゲノム異常の組み合わせにより肺腺がんを 3 つに分類したところ, 喫煙歴, 性別, EGFR (上皮増殖因子受容体) 遺伝子異常の頻度と相関した. また EGFR 遺伝子異常の有無と相関するようなゲノム異常を同定できた. **結論.** 肺腺がんには, 性別や喫煙歴と相関するような複数の分子発がん過程が並列して存在していることが示唆された. がんのゲノムプロファイリングにより, 新しい発がん過程の多様性が明らかになり, 新しい予後マーカーや治療標的の同定に有用であると考えられた. (肺癌. 2007;47:905-908)

索引用語—— 肺腺がん, アレイ CGH, 上皮増殖因子受容体, ゲノムプロファイリング

Molecular Classification of Lung Adenocarcinoma by Genetic Alteration Profiling

Tatsuhiko Shibata¹

ABSTRACT—— **Objective and Methods.** Lung cancer is one of the most lethal and increasing cancer world-wide. Lung cancer is composed of a wide range of distinct histological subtypes (small cell lung carcinoma, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma), however, the overall genetic alterations of these tumors remain unclear. To analyze the genetic alterations of lung adenocarcinoma in a genome-wide way, we employed laser-capture microdissection of cancer cells and array CGH focusing on 800 chromosomal loci containing cancer related gene. **Results.** We analyzed 55 primary lung adenocarcinoma cases. We identified a large number of chromosomal numerical alterations including frequent amplifications on 7p12, 11q13, 12q14-15 and 17q12 and 2 homozygous deletions on 9p21 and 1 on 8p23. Unsupervised hierarchical clustering analysis of multiple alterations revealed 3 sub-groups of lung adenocarcinoma that were characterized by the accumulation of distinct genetic alterations and associated with smoking history, gender and the frequency of EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) mutation. The mutation status of EGFR was significantly associated with specific genetic alterations. **Conclusion.** Our results suggest that there exist multiple molecular-carcinogenesis pathways in lung adenocarcinoma which may associate with smoking habits and gender. Genetic cancer profiling will reveal previously uncharacterized genetic heterogeneity of cancer and be beneficial in estimating patients' prognosis and discovering novel cancer related genes including therapeutic targets. (JLCC. 2007;47:905-908)

¹国立がんセンター研究所ゲノム構造解析プロジェクト.
別刷請求先: 柴田龍弘, 国立がんセンター研究所ゲノム構造解析プロジェクト, 〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1.

¹Cancer Genomics Project, National Cancer Center Research Institute, Japan.

Reprints: Tatsuhiko Shibata, Cancer Genomics Project, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan.

© 2007 The Japan Lung Cancer Society

KEY WORDS — Lung adenocarcinoma, Array-based comparative genomic hybridization, Epidermal growth factor receptor, Genetic profiling

背景と目的

肺がんは、他臓器のがんと比較しても、非常に多彩な病理組織像を示すことが知られている。¹ これまでの多くの研究の結果、肺がんは複数の genetic あるいは epigenetic な異常の蓄積を伴って発生すると考えられているが、その多彩な組織像の背景にあるゲノム異常の全体像については未だ明らかになっていない。近年の網羅的な遺伝子発現解析の結果、病理組織学的に分類された肺腫瘍（腺がん、扁平上皮がん、内分泌性腫瘍など）が、必ずしも分化度に依存しない発現形質の相違からさらに亜分類され、それが生命予後などの臨床像とよく相関す

ることが報告されている。^{2,4} これらの知見は、病理形態像による分類はがん細胞の形質（あるいは間質を含めたがん組織全体）を総合的に理解しているものであり、その中には、おそらく特徴的なゲノム異常により規定された、より詳細な生物学的態度に寄与する複数の分子経路の組み合わせが並列して存在していることを示唆している。また一方で肺腺がんにおける EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）遺伝子異常の同定と EGFR 阻害剤に対する反応性との相関が報告され、^{5,7} 特定のゲノム異常による腫瘍の層別化がオーダーメイド医療の一つの基盤として臨床的にも重要な役割を果たしうることが示されている。我々の研究グループでは、多数の臨床

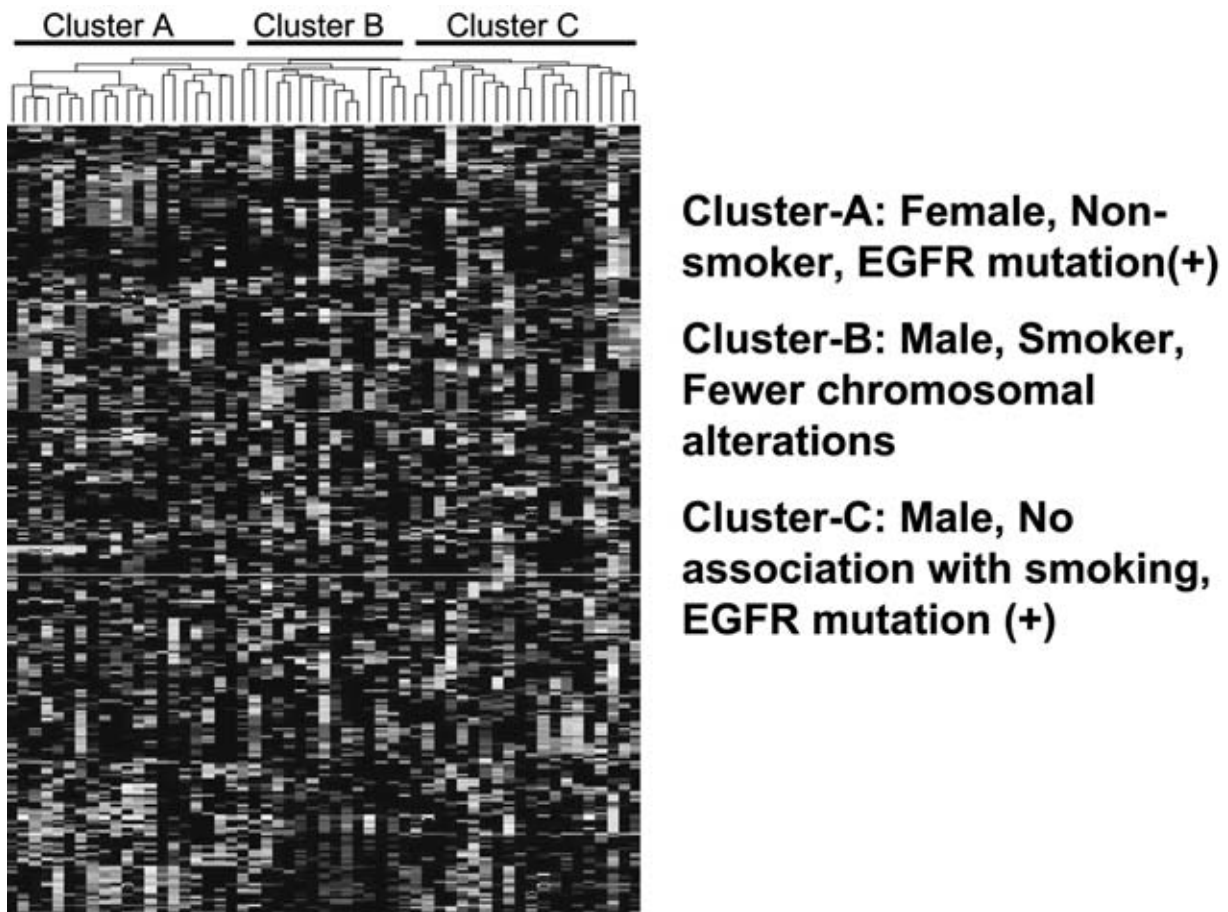


Figure 1. Unsupervised genetic profiling of lung adenocarcinoma. Fifty-five lung adenocarcinomas were clustered hierarchically on the basis of copy number changes. Lost (green) or gained (red) loci are indicated. Overall patterns of standardized gene copy numbers and the cluster tree of individual tumors are shown. Tumors were clustered in 3 sub-groups (Clusters A, B and C).

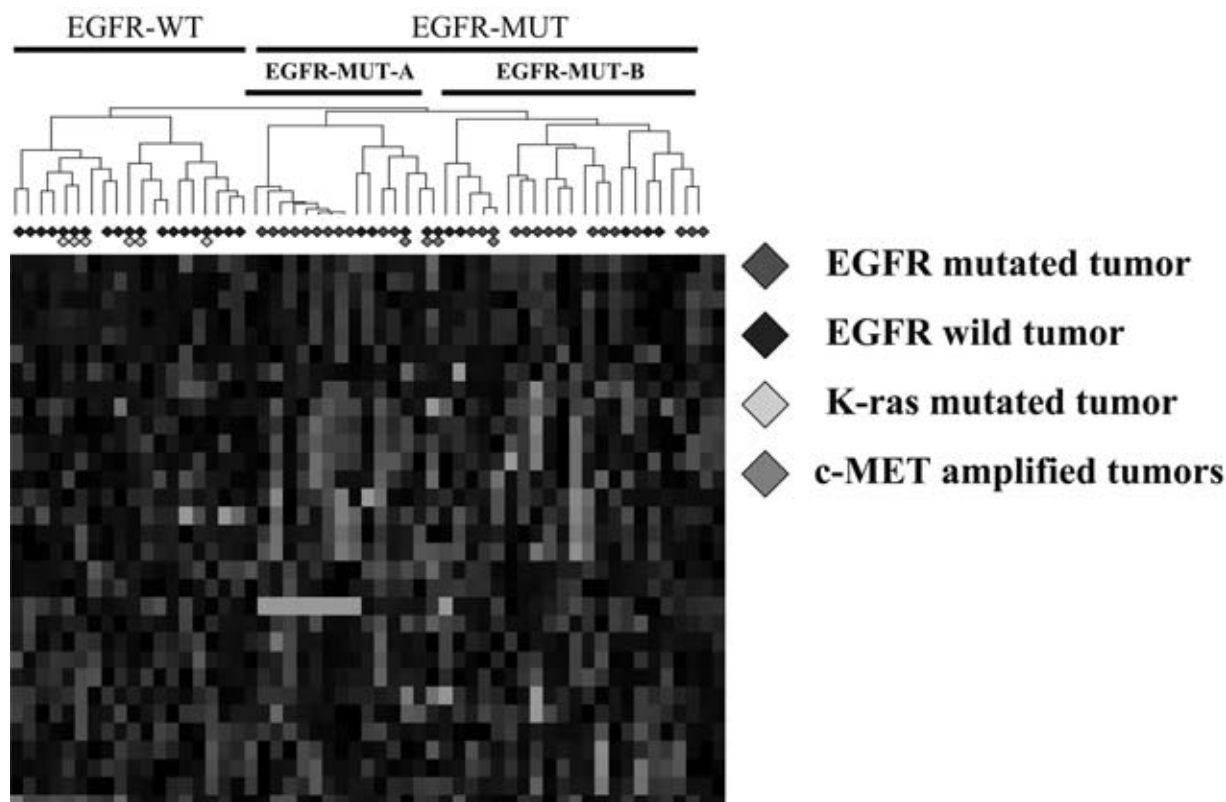


Figure 2. Supervised genetic profiling of EGFR mutation related loci. Hierarchical clustering determined copy number change patterns against 46 loci that were identified using the training-testing, cross-validation analysis. Lost (green) or gained (red) loci were indicated in individual tumors. Tumors are classified into 2 branches (EGFR-WT and EGFR-MUT). All EGFR mutated tumors (red spot) are clustered in the EGFR-MUT branch. Most tumors without EGFR mutations (blue spot) are clustered with the EGFR-WT branch, although some are clustered with the EGFR-MUT branch. Six tumors carrying K-ras mutations (yellow spot) are clustered with the EGFR-WT branch and 4 MET-amplified tumors (green spot) are clustered with the EGFR-MUT branch. The EGFR-MUT branch is subdivided into 2 sub-groups (EGFR-MUT-A, and EGFR-MUT-B) with distinctive genetic changes.

検体を用いた網羅的ゲノム異常解析を行い、肺がんの各組織型をゲノム異常の視点から分類し、その分類を臨床病理像あるいは遺伝子発現形質と比較することで、多様な表現形質の背景にある発がんの分子機構について理解を深めるとともに、肺がんにおける重要な遺伝子異常の同定を進めている。^{8,9} 今回は肺腺がんにおけるゲノム異常解析の結果について報告する。

対象と研究方法

1. 対象：国立がんセンター中央病院にて切除された55症例の肺腺がん臨床検体を用いた。全症例からレーザーマイクロダイセクションによりがん細胞を選別し、PCR (polymerase chain reaction)法にてDNAを増幅した。
2. アレイ CGH (comparative genomic hybridization) 法：がん関連遺伝子 800 個を搭載した MCG Cancer Ar-

ray 800 を用いた。¹⁰ がん細胞ならびに非腫瘍部肺組織 DNA をそれぞれ Cy3, Cy5 蛍光色素で標識後、アレイにハイブリダイズさせた。スキャナーにて蛍光強度を測定し、解析に用いた。

3. 遺伝子異常解析：EGFR (エキソン 18, 19, 21), K-RAS (エキソン 2, 3), HER2 (エキソン 20, 21), MET (エキソン 10, 14, 16, 17, 18, 19, 20) 遺伝子について PCR ダイレクトシーケンス法により遺伝子変異の同定を行った。

結果ならびに考察

肺腺がん 55 症例について、がん関連遺伝子 800 個を含む BAC array を用いて、各遺伝子座のコピー数異常について網羅的に検索した結果、高頻度の欠失や高度増幅を認める染色体領域を広く同定することができた。40% 以上の症例で染色体欠失のあった領域を 32 カ所同定した。

とりわけ p53 遺伝子の存在する 17 番染色体短腕 (17p13) や p16 遺伝子の存在する 9 番染色体短腕 (9p21) 領域は高頻度に異常を認めた。ホモ欠失領域として 9 番染色体短腕 (9p21) ならびに 8 番染色体短腕 (8p23) を同定した。また 50% 以上の症例で染色体重複を認めた領域を 19 カ所同定した。複数症例で高度の染色体増幅が見られた領域としては、12 番染色体長腕 (12q14), 7 番染色体短腕 (7p12, EGFR 遺伝子), 11 番染色体長腕 (11q13), 17 番染色体長腕 (17q12) などが同定できた。肺腺がんにおける既知の遺伝子異常として、EGFR, K-RAS, HER2 遺伝子の変異を今回解析した症例で調べた結果、EGFR 遺伝子異常は 26 例 (47%), K-RAS 遺伝子異常は 6 例 (11%) に認められた。HER2 遺伝子変異は検出されなかった。また EGFR 遺伝子異常は有意に非喫煙者に見られ ($P < 0.001$), EGFR と K-RAS 遺伝子変異を両方持つ腫瘍はなかった。

さらに検出した染色体構造異常の組み合わせにより、肺腺がんをゲノム異常の視点から分類することを試みた。2 次元階層クラスター解析を用いて、ゲノム異常に基づく分類を行ったところ、肺腺がんは大きく 3 つのグループに分類できた (クラスター A, B, C)。クラスター B は他の 2 つと比較して、有意に染色体構造異常の頻度が少なかった。またそれぞれのクラスターには共通して見られる異常に加えて、特徴的な染色体異常が多数見られ、異なった遺伝子異常の組み合わせが、各クラスターの発がん過程に寄与していると考えられた。この分類は患者性別 ($P < 0.01$) や喫煙歴 ($P < 0.001$)、さらに EGFR 遺伝子異常の頻度 ($P = 0.01$) と有意に相関した (Figure 1) が、組織学的分化度、ステージ分類、術後無再発期間とは有意な相関を示さなかった。今回の解析結果は既知のがん関連遺伝子の異常に着目した分類ではあるが、肺腺がんの発生には複数の遺伝子異常の蓄積過程が存在し、それぞれの発がん過程は性別や喫煙と言った臨床的背景と相関していることを示唆していると考えられる。

次に EGFR 遺伝子の有無と相関するゲノム異常についても解析を進めた。複数のアルゴリズムを用いた機械学習法により、EGFR 遺伝子異常の有無を一番正確に判定できるゲノム異常の組み合わせを抽出した。その結果、EGFR 遺伝子異常の有無と強く相関するようなゲノム異常が明らかになった。また非常に興味深いことに、EGFR 遺伝子変異はないもののそれ以外の異常は EGFR 異常を持つ腫瘍と類似している一群の腺がんが見いだされ、それらの腫瘍には MET 遺伝子の増幅が多く認められた (Figure 2)。今回の症例には MET 遺伝子の変異は検出されなかった。最近 EGFR 阻害剤耐性肺腺がん MET 遺伝子の増幅が報告された。¹¹ 我々の結果からも、MET

遺伝子の増幅は、肺腺がんにおいて EGFR 遺伝子異常と同様の意味を持つことが推測される。

REFERENCES

1. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. Histological typing of lung and pleural tumours. *World Health Organization International Histological Classification of Tumours*. New York: Springer-Verlag; 1999:5-26.
2. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002;8:816-824.
3. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13790-13795.
4. Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, et al. Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles. *Lancet*. 2004;363:775-781.
5. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139.
6. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-1500.
7. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13306-13311.
8. Shibata T, Uryu S, Kokubu A, Hosoda F, Ohki M, Sakiyama T, et al. Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6177-6185.
9. Peng WX, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of high-grade neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer Sci*. 2005;96:661-667.
10. Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, et al. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2004;64:3741-3747.
11. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316:1039-1043.