

REVIEW ARTICLE

原発性非小細胞肺癌における Wnt シグナルと EGFR シグナルの同期的異常

鈴木 実¹・重松久之²・中島崇裕¹・本橋新一郎¹・
関根康雄¹・渋谷 潔¹・飯笹俊彦¹・廣島健三³・
中谷行雄³・藤沢武彦¹・吉野一郎¹

Synchronous Alterations of Wnt and EGFR Signaling Pathways Through Aberrant Methylation and Mutation in Non-small Cell Lung Cancer

Makoto Suzuki¹; Hisayuki Shigematsu²; Takahiro Nakajima¹; Shinichiro Motohashi¹; Yasuo Sekine¹; Kiyoshi Shibuya¹; Toshihiko Iizasa¹; Kenzo Hiroshima³; Yukio Nakatani³; Takehiko Fujisawa¹; Ichiro Yoshino¹

¹Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, Japan; ²Department of Chest Surgery, NHO Okayama Medical Center, Japan; ³Department of Basic Pathology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** The Wnt and EGFR signaling pathways play crucial roles in the pathogenesis of a variety of malignant tumors. While the details of each cascade are understood, very little is known about their collective effects in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods.** A total of 238 NSCLC samples were examined for methylation of Wnt antagonists (sFRP-1, sFRP-2, sFRP-5, Wif-1, Dkk-3) and for EGFR and KRAS mutations. Protein expression levels of β -catenin were assayed in 91 of the 238 NSCLCs. **Results.** We found that (a) aberrant methylation of Wnt antagonists is common in NSCLCs; (b) methylation of sFRP-2 is more prevalent in females, non-smokers, and adenocarcinoma cases; (c) there is a positive correlation between activated EGFR mutation and nuclear accumulation of β -catenin; (d) KRAS mutation and aberrant methylation of Wnt antagonists are positively correlated; and (e) EGFR mutation is significantly associated with a good prognosis in tumors lacking methylated Wnt antagonist genes. **Conclusion.** These results contribute to a better understanding of the cross-talk between the Wnt and EGFR signaling pathways, and help foster development of chemotherapeutic treatments in NSCLCs.

(JLCC. 2009;49:416-421)

KEY WORDS — Lung cancer, Aberrant methylation, EGFR, Wnt

Reprints: Makoto Suzuki, Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan (e-mail: smakoto@faculty.chiba-u.jp).

要旨 — **目的.** 非小細胞肺癌において Wnt シグナルと EGFR シグナルの異常亢進について包括的に検討した。**対象と方法.** 238 例の非小細胞肺癌手術症例で Wnt シグナル関連遺伝子 (sFRP-1, sFRP-2, sFRP-5, Wif-1, Dkk-3) の異常メチル化と EGFR・KRAS 変異を調べた。うち 91 例で β カテニンの免疫組織学的検討を行った。**結果.** 腫瘍特異的な Wnt シグナル関連遺伝子異常メチル化を高頻度に認めた (13~52%)。sFRP-2 異常メチル化は女

性、非喫煙者、腺癌に高頻度に認めた。Dkk-3 異常メチル化は腺癌症例で予後不良因子となった。EGFR 変異と β カテニン核内異常集積に相関を認めた。KRAS 変異と Wnt シグナル関連遺伝子異常メチル化に相関を認めた。Wnt シグナル関連遺伝子異常メチル化のない症例では EGFR 変異は予後良好因子となった。**結論.** 上記所見は Wnt シグナルと EGFR シグナルの同期的異常の存在を示唆し、本研究は非小細胞肺癌治療の基礎的データとな

¹千葉大学呼吸器外科；²岡山医療センター胸部外科；³千葉大学診断病理。

別刷請求先：鈴木 実，千葉大学呼吸器外科，〒260-8670 千葉

市中央区亥鼻 1-8-1 (e-mail: smakoto@faculty.chiba-u.jp)。

※第 48 回日本肺癌学会総会シンポジウム「ゲフィチニブ」。

ることが期待される。

索引用語——肺癌，異常メチル化，EGFR，Wnt

はじめに

非小細胞肺癌の術後 adjuvant, 再発治療における化学療法を選択する際、個々の癌特性に応じた個別化医療の必要性がいわれている。進行肺癌においては EGFR 変異と gefitinib, ERCC1 発現とシスプラチンなどの一対一対応での治療が有効であるとする報告がある。^{1,2} しかしながら、現状ではこれらの関係を考慮した治療が必ずしも予後改善に貢献していない。これは一つには癌特性（個性）を決定する変化が単一ではないことに起因すると考えられる。

Wnt シグナル伝達経路は発生学的に重要であり、形態形成・組織保持に重要な役割を演じている。Wnt シグナルは β カテニンを介する canonical 経路と、PCP 経路 (Wnt/JNK 経路), Ca^{2+} 経路の3つが知られているが、特に肺癌との関連が知られているのは canonical 経路である。³ 本経路では、分泌タンパクである Wnt 粒子は細胞外に分泌され、受容体 Frizzled に結合することにより Wnt シグナルを細胞内に伝える。このシグナルは Dsh (dishevelled) を介して β カテニンのリン酸化抑制を引き起こし、脱リン酸化された β カテニンは安定化、核内移行して標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。その結果、細胞の増殖・分化・極性の変化などのさまざまな生体変化が引き起こされる。肺癌を含む種々の悪性腫瘍において、本経路が異常亢進していることが判明している。⁴

Wnt シグナル伝達経路は各ステップで多様な制御を受けている。細胞外での調節機構として、Dkk (Dickkopf), FRP (Frizzled-related protein), Wif (Wnt-inhibitory factor) など直接 Wnt に結合して機能を阻害する分泌性インヒビターの存在が知られている。これらインヒビターが肺癌その他の悪性腫瘍で、主として異常メチル化により不活性化していることが知られている。⁵⁻⁸

一方、EGFR シグナル伝達経路は EGFR 変異, KRAS 変異などによる異常亢進が非小細胞肺癌でよく知られている。⁹ 特に EGFR 変異は分子標的薬である EGFR インヒビター (gefitinib) との治療相関が報告され、注目を集めている。

このように、Wnt シグナルと EGFR シグナルは非小細胞肺癌をはじめ種々の悪性腫瘍で重要な役割を果たしている。非小細胞肺癌においてそれぞれのシグナル異常は詳細に検討されているものの、包括的に検討した報告は

ない。今回われわれはこの2つの経路異常を異常メチル化と突然変異の観点から包括的に調べることによって、非小細胞肺癌の分子生物学的特性を明らかにすることを目標に検討を行った。

対象と方法

症例

1995年から2000年に千葉大学医学部附属病院で切除術を受けた238例の非小細胞肺癌症例に対し、分子生物学的検討を行い、うち91例に対し免疫組織化学的検討を行った。本研究は千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査の承認を受けた(生命倫理審査受付番号48および49)。

DNA抽出と異常メチル化の検討

-80°Cで保存された切除サンプルからDNAを抽出した。¹⁰ 各DNA 1 μ gを用いて bisulfite 処理を行い methylation-specific PCR (MSP)を行った。¹¹ 陽性コントロール、陰性コントロールはそれぞれ100%, 0%メチル化コントロールDNAとして、CpGenome™ Universal Methylated (または Unmethylated) DNA (Chemicon, Millipore) 1 μ gを bisulfite 処理したものを使用した。

突然変異検索

EGFRとKRAS変異について直接塩基配列決定法で検討した。プライマーはTable 1に示す。PCRプロダクトを Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ)で処理して、Applied Biosystems (PerkinElmer Corp., Foster City, CA)で配列決定した。⁹

免疫組織化学

β カテニンマウスモノクローナル抗体 (clone 14, BD Transduction Labs, Lexington, KY)を用いて免疫染色を行った。400倍希釈で12時間インキュベートした。 β カテニンは気管支上皮細胞の細胞膜が陽性に染色され、それを内部コントロールとした。細胞質または核内染色を染色陽性と判定、陽性細胞を25%未満, 25~75%, 75%より多い、のカテゴリーに、染色強度を弱, 中等度, 強のカテゴリーに分け、それらの組み合わせから、強陽性, 弱陽性, 陰性の3つのカテゴリーで蛋白発現を評価した。¹²⁻¹⁴

統計解析

Fisher's exact test と Mann-Whitney U test を2群比較に用いた。生存率比較はKaplan-Meier法を用い log-rank test で有意差検定を行った。また Cox proportional

Table 1. Methylation and Mutation Profile of Non-small Cell Lung Cancers

Factor	Clinical characteristics		Methylation				Mutation		
	(Number)	Number (%)	sFRP-1	sFRP-2	sFRP-5	Wif-1	Dkk-3	EGFR	KRAS
Gender	Male (168)		57 (34)	77 (46)	55 (33)	50 (30)	22 (13)	26 (15)	11 (7)
	Female (70)		24 (34)	46 (66)*	23 (33)	16 (23)	10 (14)	34 (49)*	4 (6)
Age	≤65 (116)		42 (36)	63 (54)	40 (34)	36 (31)	12 (10)	34 (29)	7 (6)
	>65 (122)		39 (32)	60 (49)	38 (31)	30 (25)	20 (16)	26 (21)	8 (7)
Smoking	Smoker (171)		57 (33)	78 (46)	53 (31)	52 (30)	23 (13)	21 (12)	11 (6)
	Never (67)		24 (36)	45 (67)*	25 (37)	14 (21)	9 (13)	39 (58)*	4 (6)
Histology	Adenocarcinoma (135)		44 (33)	80 (59) [†]	43 (32)	30 (22)	22 (16)	56 (41) [†]	14 (10) [†]
	Squamous cell carcinoma (87)		28 (32)	32 (37)	30 (34)	28 (32)	7 (8)	1 (1)	1 (1)
	Large cell carcinoma (13)		8 (62)	8 (62)	5 (38)	7 (54)	2 (15)	0 (0)	0 (0)
	Adenosquamous carcinoma (3)		1 (33)	3 (100)	0 (0)	1 (33)	1 (33)	3 (100)	0 (0)
p-Stage	I (85)		22 (26)	43 (51)	31 (36)	25 (29)	12 (14)	26 (31)	2 (2)
	II, III, IV (153)		59 (39)	80 (52)	47 (31)	41 (27)	20 (13)	34 (22)	13 (8)

Parenttheses in each column indicate percentage of methylation or mutation.

*The frequency of the group is significantly higher ($P<0.05$) than the other group. [†]The frequency of the group is significantly higher ($P<0.05$) than the squamous cell carcinoma group.

hazards regression model で多変量解析を行った。

各サンプルにおける異常メチル化の頻度を methylation index (MI) として表した。すなわち、MI=(異常メチル化を示した遺伝子数/異常メチル化を調べた遺伝子数)とした。P値0.05未満を有意差ありと判定した。

結果

Wnt インヒビターの異常メチル化

各異常の頻度を Table 1 に示す。非癌部肺組織における各遺伝子の異常メチル化は sFRP-1: 6 例(3%), sFRP-2: 13 例(7%), sFRP-5: 14 例(8%), Wif-1: 2 例(1%), Dkk-3: 2 例(1%)であった。腫瘍組織異常メチル化頻度と比較すると、すべて $P<0.0001$ であり、これらの遺伝子の異常メチル化は腫瘍組織特異的な変化であるといえた。

次に臨床因子との関連を検討した。sFRP-2 遺伝子メチル化は女性 ($P=0.0067$)、非喫煙者 ($P=0.0038$)、腺癌症例 ($P=0.0015$) で高頻度に認めた。MI 値が 0 (どの遺伝子も異常メチル化を認めない症例) は 65 例、0.2 は 65 例、0.4 は 50 例、0.6 は 26 例、0.8 は 21 例、1 は 11 例に認めた。

興味深いことに、今回調べた一つ一つの遺伝子の異常メチル化は、その遺伝子を除いた MI と有意な正の相関を示した ($P<0.001$)。たとえば sFRP-1 異常メチル化陽性群は、sFRP-1 を除いた他の遺伝子メチル化のトータルの頻度 (MI without sFRP-1) が陰性群のそれより高くなっているということである。この事実は、Wnt インヒビターの異常メチル化は同期的に起きていることを示唆する。

β カテニンのタンパク発現

肺癌組織において、20 例(22%)が強陽性、51 例(56%)が弱陽性、20 例(22%)が陰性であった (Figure 1)。強陽性例では核も染色されていた。この β カテニン核内移動は、Wnt シグナルの最終ステップの一つであり、特に重要である。なお臨床因子との関連を調べたが有意な相関は見られなかった。

EGFR および KRAS 変異について

238 例中 60 例に EGFR 変異を、15 例に KRAS 変異を認めた。EGFR 変異は女性、非喫煙者、腺癌症例に有意であった (ともに $P<0.0001$)。KRAS 変異は腺癌 14 例、扁平上皮癌 1 例 ($P=0.006$) に認めた。EGFR、KRAS 変異をともに認める症例はなかった。

Wnt シグナルと EGFR シグナルの関係について

肺癌組織において、β カテニン強陽性症例は高率に EGFR 変異を認めた (12/23 vs. 8/68, $P=0.0002$) (Figure 2A)。KRAS 変異は sFRP-1 メチル化陽性例 (10/81 vs. 5/157, $P=0.0096$)、sFRP-2 メチル化陽性例 (12/123 vs. 3/115, $P=0.031$)、sFRP-5 メチル化陽性例 (9/78 vs. 6/160, $P=0.042$)、Dkk-3 メチル化陽性例 (5/32 vs. 10/206, $P=0.036$) で有意に高頻度であった。また Wnt インヒビター遺伝子のいずれかの異常メチル化を認める症例 162 例中 15 例に KRAS 変異を認めるも、いずれの異常メチル化も認めない 65 例中には KRAS 変異は認めなかった (Figure 2B)。KRAS 変異症例の MI は 0.267 ± 0.135 (N=15)、KRAS 変異なし症例の MI は 0.153 ± 0.143 (N=223) と、KRAS 変異と MI は正の相関を認めた ($P=0.003$, Figure 2C)。

次に Wnt インヒビターの異常メチル化と EGFR 変異

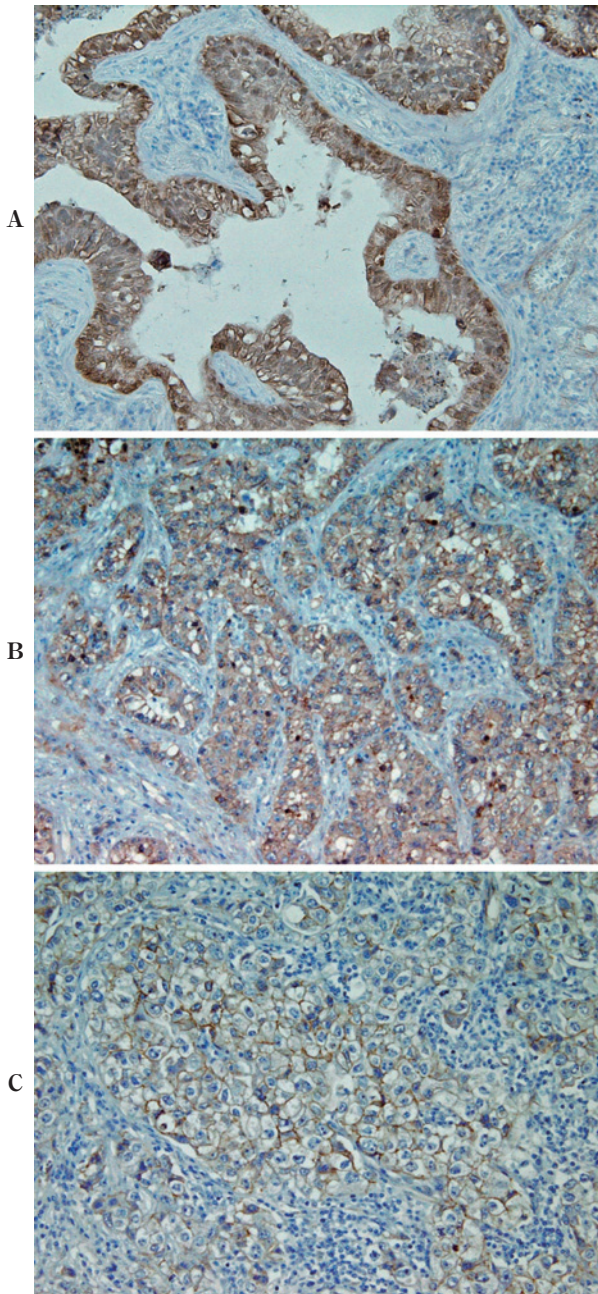


Figure 1. Immunohistochemical staining patterns for β -catenin in resected NSCLCs. **A**, adenocarcinoma with a high score (cytoplasmic and/or nuclear immunostaining in >75% of tumor cells and strong staining intensity). **B**, adenocarcinoma with a moderate score (cytoplasmic and/or nuclear immunostaining in 25-75% of tumor cells and moderate staining intensity). **C**, adenocarcinoma with a low score (cytoplasmic and/or nuclear immunostaining in <25% of tumor cells and weak staining intensity).

の予後に与える影響について検討した。興味深いことに、Wnt 抑制遺伝子の異常メチル化のない症例 65 例では、

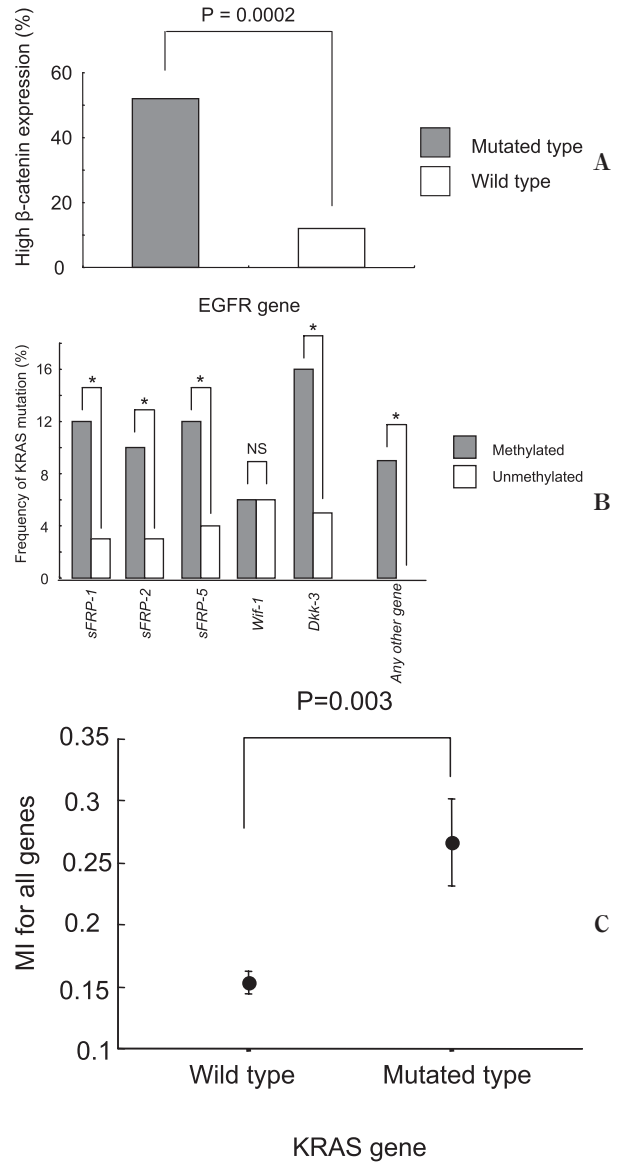


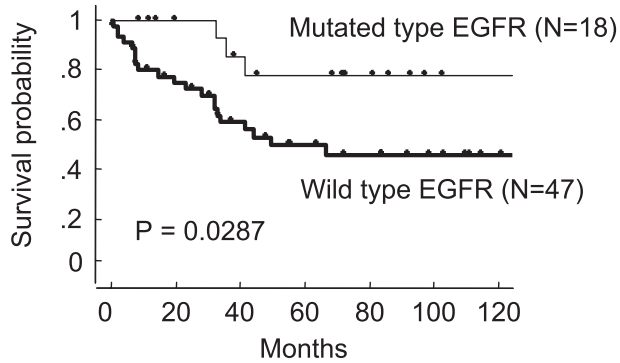
Figure 2. Correlation between Wnt and EGFR signaling. **A**, correlation between nuclear accumulation of β -catenin and EGFR mutations. **B**, correlation between the methylation of Wnt antagonists and KRAS mutations. **C**, correlation between methylation index and KRAS mutations. Error bar; mean \pm 1 standard error.

EGFR 変異症例が有意に予後良好であった。すなわち、log-rank test では、 $P=0.0287$ (Figure 3), Cox proportional hazards regression model では、ハザード比 0.27 で $P=0.041$ で独立した予後良好因子であった。

考 察

シグナルの多様性を規定する他の要因として、クロストークの存在があげられる (Figure 4)。Wnt シグナルと

EGFR シグナルのクロストークについては、いくつかの固形腫瘍で報告がある。たとえば、A431 というヒト扁平上皮癌細胞では、EGF と EGFR が β カテニンを誘導することが示された。¹⁵ 一方、Wnt シグナルが EGFR シグナルを活性化するという報告もある。^{16,17} われわれの実験結果では、非小細胞肺癌において EGFR 変異と β カテ



No Wnt antagonist methylation

Figure 3. Kaplan-Meier survival curves. Survival of patients with unmethylated Wnt antagonist genes as a function of EGFR mutation status. The 5-year overall survival rates of mutation (+) and mutation (-) cases were 77.9% and 50.0%, respectively.

ニン核内集積は相関することが示された。なお、未発表データではあるが、EGFR 蛋白発現と β カテニン核内集積の間には相関は認められなかった。また EGFR 変異には field effect の存在が知られており、発癌の比較的早期に起こりうる変化の可能性が指摘されている。¹⁸ 以上から、今後の機能解析などは必要であるが、非小細胞肺癌において、EGFR 変異が β カテニン核内集積の一つの原因をなしている可能性が示唆される。

EGFR 変異の予後に与える影響については、変異陽性が予後良好とする報告が多いものの、まだ議論の余地がある。本研究では、Wnt インヒビター遺伝子の異常メチル化のない群を EGFR 変異の有無でさらに 2 群に分けた。その結果、EGFR 変異陽性症例が予後良好であった。このように、ある分子生物学的側面で症例を分けると EGFR 変異の有無での悪性度が異なってくるという現象は興味深いと思われる。今後、このような分子生物学的側面と EGFR インヒビター (gefitinib など) との関係を見ることは重要であると考えられる。

本研究で KRAS 変異と Wnt インヒビター遺伝子異常メチル化が相関していることを示した。大腸癌細胞で Wnt シグナルを介して KRAS が VEGF を活性化しているという報告がある。¹⁹ また腸管腫瘍細胞において KRAS 活性化が β カテニンのリン酸化を誘導するという報告がある。²⁰ これらの報告は KRAS と Wnt シグナ

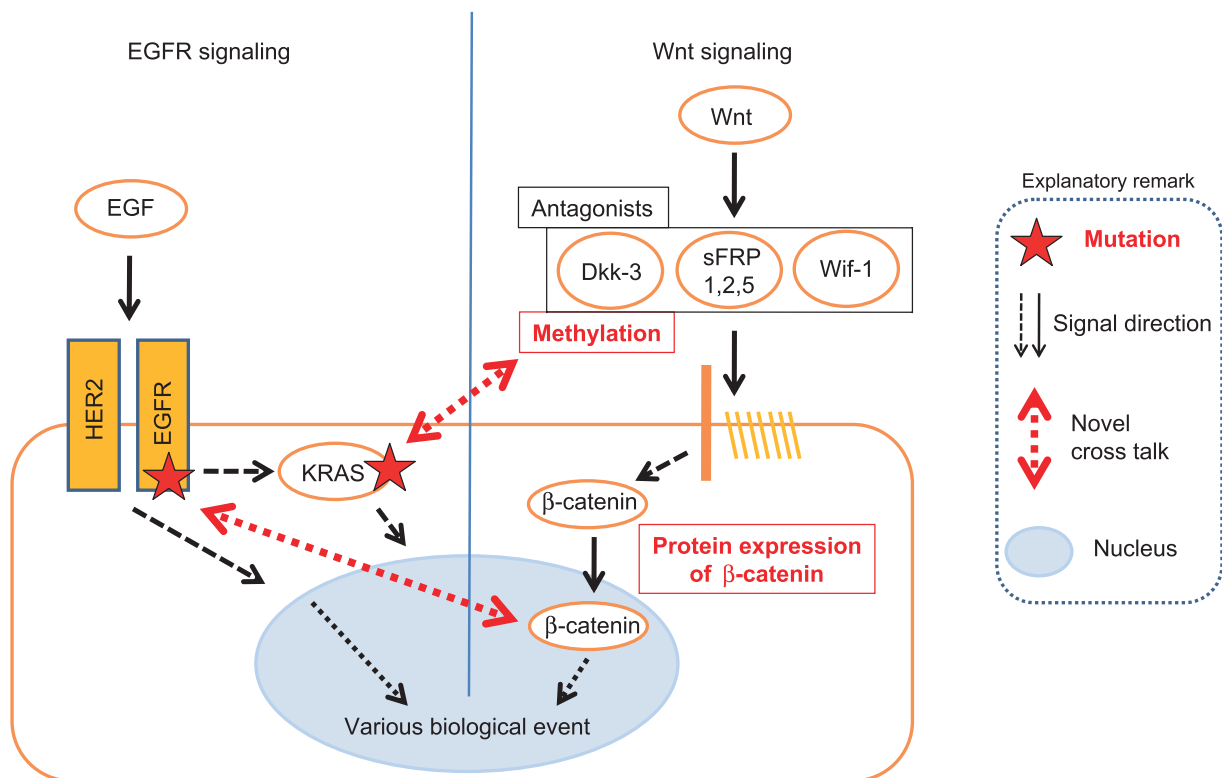


Figure 4. Schema of EGFR and Wnt signaling pathway.

ルの関係を示すものであるが、われわれの検討では、その機序は明らかではないが、KRAS 変異と Wnt インヒビター遺伝子異常メチル化の間に相互作用がある可能性を示すものである。

結論として、本研究で、1. Wnt インヒビター遺伝子異常メチル化は非小細胞肺癌で高頻度に認められた、2. 女性、非喫煙者、腺癌症例で sFRP-2 異常メチル化は高頻度に認められた、3. EGFR 変異と β カテニン核内集積の間に相関が認められた、4. KRAS 変異と Wnt インヒビター遺伝子異常メチル化の間に相関が認められた、5. Wnt インヒビター遺伝子異常メチル化がない症例では、EGFR 変異が予後良好因子となった。これらの結果は、非小細胞肺癌において Wnt シグナルと EGFR シグナルが独立した伝達経路を形成しているのではなく、相互作用的に異常亢進している可能性を示唆する。本研究は非小細胞肺癌の分子生物学的側面を明らかにするとともに、分子標的治療などの治療戦略を立てる上でも重要な所見になると考えられる。

本論文の要旨を第 48 回日本肺癌学会総会（平成 19 年 11 月名古屋）にて発表した。本論文の要旨を *Clin Cancer Res.* 2007;13:6087-6092 にて発表した。

REFERENCES

- Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med.* 2007;356:800-808.
- Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol.* 2005;23:2513-2520.
- Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep.* 2005;14:1583-1588.
- Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003; 129:199-221.
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett.* 2005;222:1-10.
- Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, Mazieres J, et al. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene.* 2004;23:6672-6676.
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res.* 2004;64: 4717-4720.
- Tang M, Torres-Lanzas J, Lopez-Rios F, Esteller M, Sanchez-Cespedes M. Wnt signaling promoter hypermethylation distinguishes lung primary adenocarcinomas from colorectal metastasis to the lung. *Int J Cancer.* 2006;119:2603-2606.
- Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Minna JD, et al. Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2006;106:2200-2207.
- Suzuki M, Toyooka S, Miyajima K, Iizasa T, Fujisawa T, Bekele NB, et al. Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2003;9: 5636-5641.
- Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Kawamoto K, Hirata H, et al. Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2006;12:2109-2116.
- Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Tokizane T, Ogishima T, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 2006;12:383-391.
- Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK, Hsiao WL. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:1401-1408.
- Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, et al. Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer.* 2002;94:752-758.
- Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 1994; 127:1375-1380.
- Civenni G, Holbro T, Hynes NE. Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* 2003;4:166-171.
- Tan X, Apte U, Micsenyi A, Kotsagrelis E, Luo JH, Ranganathan S, et al. Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology.* 2005;129:285-302.
- Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, Roth JA, Minna JD, Hong WK, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res.* 2005;65:7568-7572.
- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 2001;61:6050-6054.
- Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, et al. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology.* 2006;131:1096-1109.