

REVIEW ARTICLE

肺癌の分子生物学

豊岡伸一<sup>1</sup>・光富徹哉<sup>2</sup>・宗 淳一<sup>1</sup>・  
山本寛齊<sup>3</sup>・三好新一郎<sup>1</sup>

Molecular Biology of Lung Cancer

Shinichi Toyooka<sup>1</sup>; Tetsuya Mitsudomi<sup>2</sup>; Junichi Soh<sup>1</sup>;  
Hiromasa Yamamoto<sup>3</sup>; Shinichiro Miyoshi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cancer and Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan; <sup>2</sup>Department of Thoracic Surgery, Aichi Cancer Center, Japan; <sup>3</sup>Department of Thoracic Surgery, National Hospital Organization, Yamaguchi-Ube Medical Center, Japan.

**ABSTRACT** — Recent advances in biotechnology have made it possible to explore the molecular pathogenesis of human lung cancer. Since the 1980s, various alterations, including mutations in the *P53* and *KRAS* genes, allelic alterations like loss of heterozygosity, and DNA methylation of tumor-related genes have been extensively studied. In 2004, epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene mutation was discovered in non-small cell lung cancer (NSCLC) as an alteration that causes oncogene addiction. *EGFR* mutation is also significantly associated with sensitivity to *EGFR*-tyrosine kinase inhibitors (TKI), which has encouraged intensive studies not only on the *EGFR* gene but also on the *EGFR* family and its downstream genes. Furthermore, *EML4-ALK* fusion genes have been found in NSCLC, and as in *EGFR*-TKIs, an *ALK* inhibitor shows a drastic response in NSCLC with the *EML4-ALK* fusion gene. These discoveries demonstrate that basic research can develop novel therapeutic strategies to improve the prognosis of lung cancer. In this review, we summarize the crucial findings of molecular pathogenesis in lung cancer, especially NSCLC, and show the possible future direction of related molecular biological research.

(*JJLC*. 2010;50:329-341)

**KEY WORDS** — Lung cancer, Non-small cell lung cancer, Molecular biology

Reprints: Shinichi Toyooka, Department of Cancer and Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan (e-mail: toyooka@md.okayama-u.ac.jp).

Received February 26, 2010; accepted June 18, 2010.

**要旨** — 遺伝子工学の発達は肺癌の分子生物学的異常の解明を可能にしてきた。主だった異常として1980年代から2000年にかけて *P53*, *KRAS* 遺伝子変異から染色体の loss of heterozygosity, 癌関連遺伝子の DNA のメチル化などが精力的に研究された。2004年には非小細胞肺癌、特に腺癌において、oncogene addiction を引き起こす上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 遺伝子変異が発見され、*EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の感受性と強く関連することから *EGFR* 並びに、他の *EGFR* ファミリー遺伝子の下流に位置する遺伝子について多くの知見が得ら

れた。また2007年には *EML4-ALK* 融合遺伝子の存在が非小細胞肺癌で発見され、*EGFR*-TKIと同様、この遺伝子転座を有している肺癌には *ALK* 阻害剤が著効することが明らかになりつつある。これらの発見は、分子生物学の成果が直接、臨床腫瘍学の発展や肺癌患者の生存率の向上に直結することを如実に示している。本稿では進歩著しい肺癌、特に非小細胞肺癌における分子生物学の現在までの知見や今後の可能性について概説する。

**索引用語** — 肺癌, 非小細胞肺癌, 分子生物学

<sup>1</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍・胸部外科; <sup>2</sup>愛知県がんセンター中央病院胸部外科; <sup>3</sup>独立行政法人国立病院機構山口宇部医療センター呼吸器外科。

別刷請求先: 豊岡伸一, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

腫瘍・胸部外科, 〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1 (e-mail: toyooka@md.okayama-u.ac.jp).

受付日: 2010年2月26日, 採択日: 2010年6月18日。

はじめに

肺癌は本邦並びに世界的にも癌死の第1位である(がんの統計'09の部位別がん死亡数(2007年)([http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/backnumber/2009\\_jp.html](http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/backnumber/2009_jp.html))).<sup>1,2</sup> 肺癌の治療成績改善を目指し、基礎研究から臨床研究まで多くの研究が行われてきた。特に基礎研究の成果は肺癌の分子生物学の理解を深めるとともに治療成績の劇的な向上につながる可能性がある。その例として、進行非小細胞肺癌では、epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異がある肺癌ではEGFR チロシナーゼ阻害剤により、生存中央値で約24ヶ月以上の予後が期待できるようになり、<sup>3</sup> また、vascular endothelial growth factor (VEGF) 阻害剤であるベバシズマブの登場で生存中央値が12ヶ月を超えた。<sup>4</sup> このように癌の分子生物学的特徴に基づいた治療戦略は今後の肺癌治療に大きな役割を担うことになると考えられる。本稿では分子生物学の観点から肺癌、特に非小細胞肺癌の腫瘍学についてまとめた。

癌の本質的特徴と分子異常

Hanahan と Weinberg は、「癌の特徴」として、1. 自動増殖能の獲得、2. 増殖抑制信号の無視、3. アポトーシスからの回避、4. 持続的な血管新生能、5. 無制限の複製能、6. 組織への浸潤と転移、の6つをあげている。<sup>5</sup> 肺癌の分子生物学的異常についても「癌の特徴」と分子異常を関連させると知識を整理しやすい (Figure 1)。

ヒトの遺伝子の中にはその機能により癌遺伝子、癌抑制遺伝子と分類されるものがある。遺伝子の異常は癌で高頻度に認められるがその異常として塩基配列が変化することによる genetic 異常と、塩基配列変化を伴わない epigenetic 異常がある。肺癌における主な遺伝子異常とその頻度を Table 1 に示した。

1. genetic 異常

遺伝子の塩基配列の変化を伴う異常である。変異のタイプとしては塩基が置き換わる点変異、新しい塩基の挿入や既存塩基の欠失などがある。また、比較的広い範囲の塩基配列の欠失と増幅、染色体の数自体が変化する染

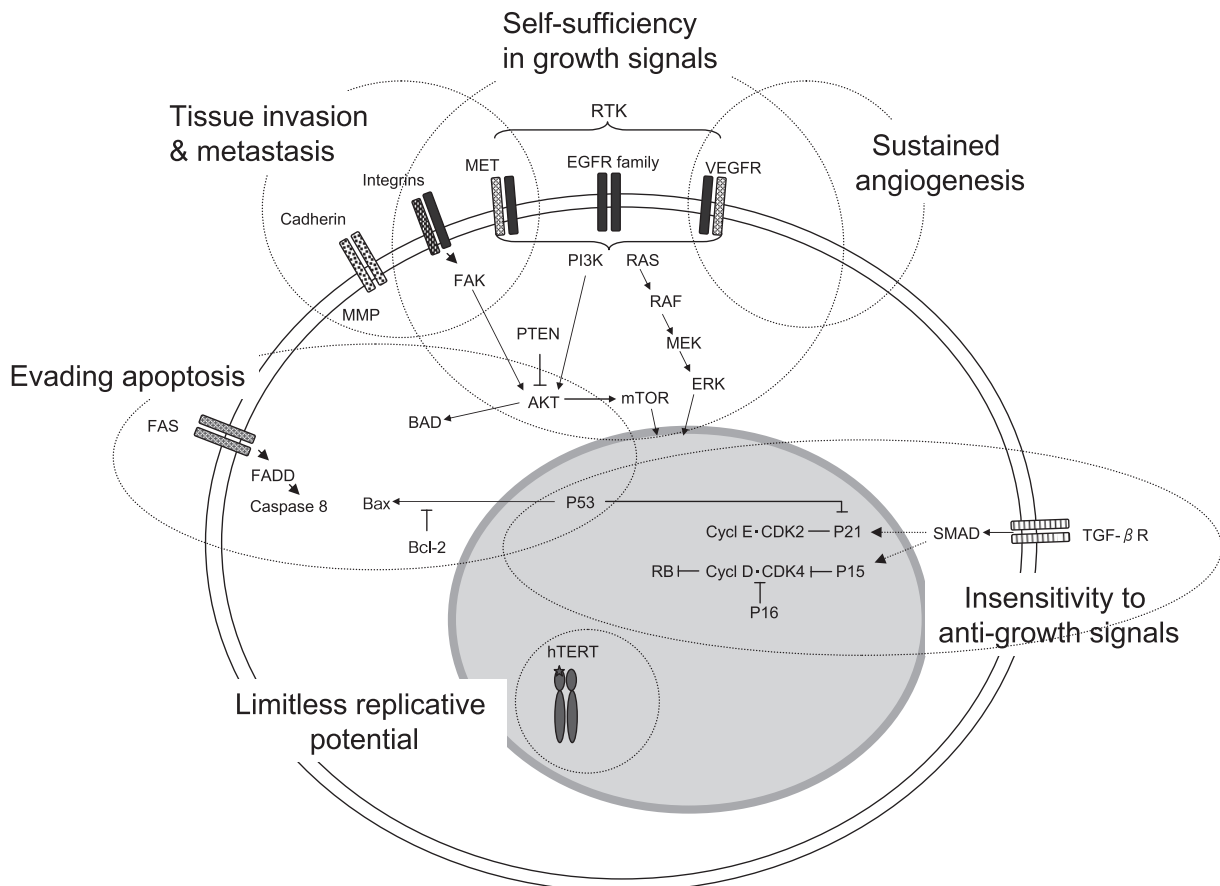


Figure 1. Molecular pathogenesis of lung cancer based on hallmarks of cancer. This schema showed the relationship between hallmarks of cancer and molecular alteration in lung cancer.

**Table 1.** Genetic Alteration and Its Frequency (%) in Lung Cancer

Gene	Chromosome	Function	Mechanism of alteration	NSCLC	SCLC
Oncogene					
MYCL	1p34.2	transcriptional factor	exp, amp	<5	30
MYCN	2p24.1	transcriptional factor	exp, amp	<5	10
ALK	2p23	receptor tyrosine kinase	trans		
PIK3CA	3q26.3	PI3 kinase subunit	mut	<5	
$\Delta$ NP63	3q27-29	P53 homolog	amp	$\leq$ 50 (squamous)	
c-kit	4q11-12	receptor tyrosine kinase	exp	<5	50
FGFR4	5q35.3	receptor tyrosine kinase	mut	<5 (adeno)	
EGFR/ERBB1	7p12	receptor tyrosine kinase	mut, amp, exp	50 (adeno)	<5
BRAF	7q34	Ser/Thr kinase	mut		
MYCC	8q24	transcriptional factor	exp, amp	30	30
CCND1	11q13	cell cycle modulator	exp	50	
KRAS	12p12	GTP binding protein	mut, amp	20 (adeno)	<5
HER2/ERBB2	17q11	receptor tyrosine kinase	exp, amp, mut	25-60 (adeno)	<5
MET	7q31	receptor tyrosine kinase	exp, amp, mut	2-21	
Bcl-2	18q21	anti-apoptosis	exp	20	60
EML4-ALK	2p	fusion tyrosine kinase	trans	5 (adeno)	
Tumor suppressor gene					
LRP-DIT	2q21	lipoprotein receptor	del	40	<5
FHIT	3p14.2	dinucleotide triphosphatase	del, me	40-70	50-80
RASSF1A	3p21.3	signal transduction ?	del, me	30-40	70-100
NPRL2, BLU	3p21.3		del, mut	} <10	
FUS1, HYAL1	3p21.3		del, mut		
FUS2, SEMA3B	3p21.3		del, mut		
P16 (INK4a)	9p21	cyclin-dependent kinase inhibitor	del, mut, me	60	<10
P14 (ARF)	9p21	cyclin-dependent kinase inhibitor	me	8	
PPP1R3	7q31	Ser/Thr phosphatase	mut	15	
PTEN	10q23	tyrosine phosphatase	del, mut	<10	10
DMBT1	10q25-26		del		40
100					
PPP2R1B	11q23	Ser/Thr phosphatase	mut	15	
TSLC1	11q23	adhesion molecule	me	85	
P27KIP1	12p13		exp	70	
RB	13q14	cell cycle regulator	del, mut	20-30	80-100
P53	17q13	cell cycle regulator	del, mut	60	80-100
SMAD2	18q21	TGF- $\beta$ signal transduction	mut	<10	
SMAD4	18q21	TGF- $\beta$ signal transduction	mut	<10	
LKB1/STK11	19p13	Ser/Thr phosphatase	del, mut	10	

NSCLC: non-small cell lung cancer, SCLC: small cell lung cancer, del: deletion, me: methylation, mut: mutation, exp: alteration of expression, amp: gene amplification, trans: translocation, adeno: adenocarcinoma.

染色体異数性、染色体の特定の領域が他の領域に移動する転座などが知られている。肺癌における遺伝子の変異として代表的なものとしては後述する *P53*, *KRAS*, *LKB1/STK11*, *EGFR* 遺伝子変異などが報告されている。<sup>6-10</sup>

## 2. epigenetic 異常

epigenetic 異常では DNA 自体の変化は来さないが、DNA 塩基のメチル化、ヒストンのアセチル化など DNA 修飾の異常により、遺伝子発現の異常が起こる。<sup>11,12</sup> メチル化に関してはプロモーター領域に多い CpG 配列における C(シトシン)のメチル化の状態が遺伝子の発現を

調節している。癌において、癌抑制遺伝子のプロモーターのメチル化による発現消失が癌化に関連することが 1990 年の後半から盛んに研究されるようになり、<sup>13</sup> 肺癌では *P16*, *RASSF1A*, レチノイン酸受容体  $\beta$  (*RAR\beta*) をはじめ多くの癌抑制遺伝子のメチル化が知られている。<sup>14,15</sup> なお、1980 年代では癌において *RAS* 癌遺伝子が正常細胞よりメチル化の程度が低いことが報告されている。<sup>16</sup>

## 肺癌の遺伝子異常

肺癌で異常を認める遺伝子の中で代表的な遺伝子について述べる。

### 1. 癌遺伝子

#### EGFR

2004年以來、分子標的治療薬と受容体型チロシンキナーゼであるEGFRファミリー遺伝子並びにその下流のシグナル伝達機構が注目されている。<sup>9,10</sup> EGFR遺伝子は細胞膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体をコードしている。増殖因子（リガンド）が結合するとEGFR自身やHER2などEGFRファミリー受容体とホモ/ヘテロダイマーを形成し、細胞増殖や細胞生存のシグナル伝達などに関与している（Figure 1）。<sup>17</sup> EGFRタンパクのチロシンキナーゼをコードするエクソンのうち最初の4つであるエクソン18～21に変異が起ると、リガンドの存在によらないEGFRの活性化が起り、癌化に至ると考えられている。<sup>9,10</sup> 特にエクソン19の欠失変異とエクソン21のコドン858のロイシンからアルギニンへの置換を来す変異（L858R変異）を有する肺癌の約80%の症例が、ゲフィチニブ、エルロチニブなどのEGFRチロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI)）が奏効する。EGFR遺伝子変異は肺腺癌、非喫煙者、女性、東洋人に高頻度であることが知られており、本邦の肺腺癌では約40%に変異がある。<sup>18</sup> 一方、EGFR変異の中でエクソン20の挿入変異、コドン790のスレオニンからメチオニンへの点変異（T790M）はEGFR-TKIに対する耐性変異である。T790M変異は、エクソン19欠失変異、L858R変異を有するもEGFR-TKIに耐性が生じた症例の約50%に認められ、2次変異または治療前からのマイナークローン由来の変異と考えられている。<sup>19-21</sup>

EGFRファミリー遺伝子の異常としてHER2遺伝子異常が肺腺癌の約2%に存在する。<sup>22</sup> EGFR変異と同じく非喫煙者、腺癌、東アジア人に多く、ほとんどがエクソン20の挿入変異である。また、HER2の遺伝子増幅は肺癌でしばしば認められるが、本邦の肺癌では約6%に増幅を認め、乳癌ほど頻度は高くない。<sup>23,24</sup>

#### MET

METはhepatocyte growth factor (HGF)をリガンドとするチロシンキナーゼ受容体である。細胞増殖とともに浸潤転移に関係するといわれている。EGFR-TKIに耐性を獲得した肺癌のうち、約20%の症例でMET遺伝子の2次的な遺伝子増幅を認めており増幅が獲得耐性の一因と考えられている。<sup>25</sup> 未治療肺癌の約2%に増幅を認める。また遺伝子変異、スプライシング異常による発現異常も報告されている。<sup>26</sup> 最近ではMET阻害剤が開発

されており、MET増幅によるEGFR-TKI耐性症例ではEGFR-TKIとMET阻害剤併用で抗腫瘍効果を示すことが報告された。<sup>25</sup> なお、EGFR-TKI耐性の新しい機序としてHGFの関連が強く示唆されることが報告された。<sup>27</sup> MET遺伝子増幅によるEGFR-TKIの耐性獲得においても、治療前にもともとごくわずかに存在するMET増幅クローンがEGFR-TKI治療中で選択されて耐性となることが、最近明らかにされた。<sup>28</sup> この過程でHGFの一過性の処理はMET遺伝子増幅を促進するという。

#### PI3K-AKT-mTOR

この経路はEGFRからのシグナルのうち主に、抗アポトーシスに関係する。

phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks)は脂質キナーゼであり、触媒サブユニットと調節（補助）サブユニットから成るヘテロダイマーとして存在する。PI3Kは細胞増殖、アポトーシスなどの重要な調節因子である。<sup>29,30</sup> PI3Kは3つのクラスに分けられるが、Class I PI3Kはフォスファチジルイノシトールのイノシトール環のD-3位をリン酸化する酵素であり、最終的に後述のAKTを含む下流シグナルを活性化する。Class I PI3KはさらにIAとIBに分類され、Class IA PI3Kが最も詳細に研究されている。PIK3CAはClass IA PI3K $\alpha$ の触媒サブユニットp110 $\alpha$ をコードする遺伝子である。PIK3CAの変異は大腸癌や乳癌では頻度が高いが、非小細胞肺癌では1～2%程度の頻度である。<sup>31</sup> 一方、遺伝子増幅は約30%の扁平上皮癌、6%の腺癌で認められる<sup>31</sup> AKTは、PI3Kの下流に位置するセリン/スレオニンキナーゼである。<sup>29</sup> AKT遺伝子の変異は稀であるが、<sup>32</sup> 抗アポトーシスに関係する重要な遺伝子である。<sup>33</sup> また、EGFR-TKIに効果を有する症例でAKTのリン酸化の亢進が報告されており、<sup>34</sup> その後、EGFR変異によりAKTの活性化が起きやすいことが判明した。<sup>9</sup> mammalian target of rapamycin (mTOR)もまたセリン/スレオニンキナーゼであり、rapamycinの細胞内標的として同定された。<sup>35</sup> AKTによるリン酸化により活性化されるタンパクであり、細胞増殖を刺激する役割を果たしているが、癌の機構のみならず治療の観点からも注目されている。いくつかの阻害剤が開発されており、臨床応用が期待されている。<sup>36</sup>

#### RAS-RAF-MEK

KRASは、GTP結合タンパクである。<sup>37</sup> KRAS遺伝子の活性変異はEGFR遺伝子変異とは対照的に喫煙歴を有する肺腺癌に多く存在する。<sup>22</sup> 変異部位はコドン12、13、61にみられるが、90%以上の変異はコドン12に起こる。<sup>7</sup> また本邦でのKRAS変異の頻度は10%強であるのに対し、欧米人では20～30%に認められる。<sup>22</sup> 最近の研究ではKRAS変異を有する場合、KRAS遺伝子増幅を伴っていることがあり、肺癌の予後不良因子であること

もわかってきた。<sup>38</sup> KRAS 変異のある肺癌は EGFR-TKI 治療に抵抗性であるとされるが、EGFR 変異のない肺癌の中での KRAS 遺伝子変異の有無は生存期間などに関連しておらず、<sup>39</sup> KRAS 変異の意義というよりも単に EGFR 変異が存在しないことを反映していると考えられる。<sup>20</sup>

BRAF は KRAS の下流に位置するセリン/スレオニンキナーゼである。肺癌での遺伝子変異の頻度は約 1% である。<sup>22</sup> さらに RAF の下流には MEK1 遺伝子が存在しており、変異は 1% 程度である。<sup>40</sup> EGFR, KRAS, BRAF, MEK1 の変異はお互いに排他的な関係にある。<sup>40</sup> リン酸化された ERK の下流には MYC, FOS などの転写因子が存在しており、細胞増殖に関与している。<sup>41</sup> なお肺癌における異常が知られている MYC ファミリー遺伝子には MYCC, MYCL, MYNC があり、主に遺伝子増幅の異常が報告されている (Table 1)。

#### thyroid transcription factor 1 (TTF1)

TTF1 は肺腺癌、特に bronchoalveolar cell carcinoma 成分を伴う高分化腺癌では約 90% に発現を認める。<sup>42</sup> 最近、TTF1 遺伝子増幅が約 30% の肺腺癌でみつかっており、系統特異的な細胞生存に関わる癌遺伝子 (lineage survival oncogene) としての意義が注目されている。TTF1 増幅を認める肺癌は予後不良である可能性が報告されている。<sup>43</sup>

#### mutant allele specific imbalance (MASI)

癌遺伝子は前述のように、遺伝子変異や染色体異数性、特に遺伝子コピー数増加により活性化される。癌抑制遺伝子の不活化には両親から受け継がれた染色体の両方が不活化することが必要だが (homozygous alteration)、癌遺伝子の活性化には片方の染色体の活性化で十分である (one hit theory, heterozygous alteration) ことが知られている。しかしながら、約 20% の癌遺伝子変異は homozygous な変異であり、癌遺伝子の変異とコピー数増加の両方を伴う症例では変異アレルが野生アレルより優位となる不均衡が生じており、変異アレル優位な不均衡、MASI という概念が、癌遺伝子の新しい活性化機構として注目されている (Figure 2)。<sup>38</sup> MASI の機構としては、遺伝子コピー数を伴うものと伴わないものの 2 種類がある。遺伝子コピー数増加を伴う場合は変異アレルのみが特異的増幅することにより MASI が生じており、遺伝子コピー数増加を伴わない場合は変異アレルの倍数化と野生型アレルの欠失により MASI が生じており、後者は uniparental disomy (UPD) といわれる。興味深いことに EGFR および KRAS 遺伝子変異では、ともに高頻度に (約 60%) MASI を認めるが、EGFR 遺伝子変異では変異アレル特異的な遺伝子コピー数増加による MASI が主な機構であるのに対し、KRAS 遺伝子変異では UPD による

MASI が主な機構となっている。<sup>38</sup>

#### EML4-ALK

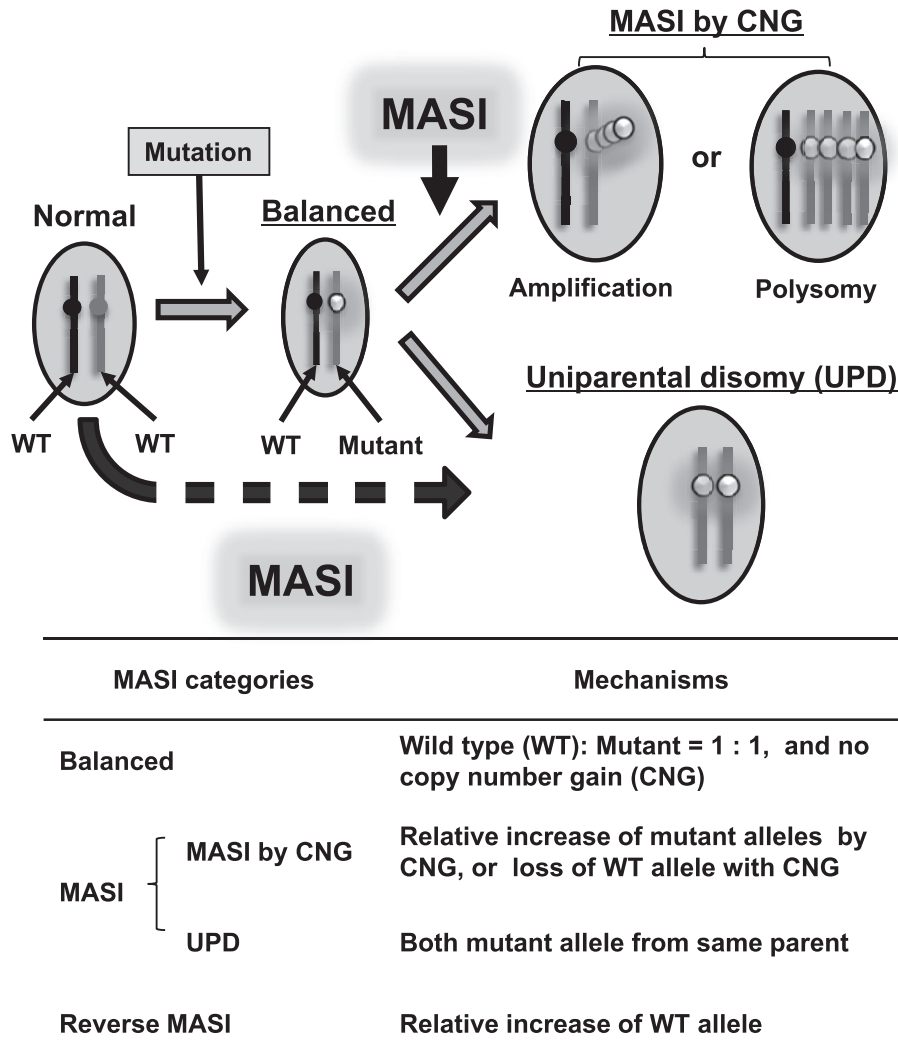
EML4-ALK 融合遺伝子は遺伝子転座によって活性化される癌遺伝子として発見された。<sup>44</sup> 転座により生じる多くの融合遺伝子は血液腫瘍で認められる。固形癌では一部の前立腺癌、甲状腺乳頭癌などで存在するが、一般的には稀である。<sup>45</sup> echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) 遺伝子と anaplastic lymphoma kinase (ALK) 遺伝子とも第 2 番染色体短腕に存在している。ALK はチロシンキナーゼドメインを有する膜貫通型タンパクであり、非ホジキンリンパ腫において NPM (nucleophosmin) 遺伝子と転座を生じることが報告され、<sup>46</sup> 以来血液腫瘍において tropomyosin 3 や TRK-fused gene など 10 種以上の遺伝子と転座を生じることが報告されている。<sup>47</sup> 肺癌では新しく KIF5B-ALK 融合遺伝子の存在が報告されている。<sup>48</sup> 全ての ALK 遺伝子転座は、転座のパートナー遺伝子に関わらず、細胞内チロシンキナーゼドメイン部分で生じており、遺伝子転座によって恒常的に 2 量体化されることで活性化され、発癌に関与していると考えられている。<sup>47</sup> 肺癌における EML4-ALK の転座においても ALK チロシンキナーゼの恒常的な活性化を生じている。<sup>44</sup> また、EML4 遺伝子の転座部位によって、これまで少なくとも 6 種類の variants が報告されている。<sup>49</sup> 臨床的に、EML4-ALK 融合遺伝子は、①非小細胞肺癌特異的な遺伝子異常であること、②肺腺癌の約 4%、50 歳以下の若年者肺腺癌の約 30% に認められ、前述の EGFR や KRAS 遺伝子変異とは排他的な関係にあること、<sup>49,50</sup> ③組織学的には acinar, cribriform, signet ring cell type などに多いこと、④ EML4-ALK 融合遺伝子を有する肺癌に対して ALK-TKI が著効すること、<sup>44,51</sup> などから肺腺癌の新たなサブグループとして注目されている。

## 2. 癌抑制遺伝子

肺癌において古くから知られている重要な癌抑制遺伝子として、異常の頻度が高い P53, RB とその役割についてまとめる (Figure 3)。

#### P16<sup>INK4a</sup>-RB

p16<sup>INK4a</sup> から cyclin D1 を経て RB に至る経路は細胞周期を制御している。<sup>52</sup> この分子群のいずれかに異常がある癌は 80% 以上ともいわれており、肺癌でも高頻度に異常が認められる。RB は核タンパク質で G0/G1 期を制御することで増殖抑制能を有している。<sup>53</sup> 非小細胞肺癌の 20~30%、小細胞肺癌の 90% 以上に異常がみられる。<sup>54</sup> p16<sup>INK4a</sup> はサイクリン依存型キナーゼ (cyclin dependent kinase: CDK) に結合して細胞周期を負に制御する CDK インヒビターの 1 つである。<sup>52</sup> P16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の不活化メカニズムには遺伝子欠失、変異、メチル化



**Figure 2.** Mutant allele specific imbalance (MASI). Three major patterns are observed: 1) Balanced, having a mutant allele (mA): wild type allele (wA) ratio (mA/wA) of about 1 without copy number gain (CNG) (i.e. -MASI not present); 2) MASI by CNG, either complete (wA lost) or partial (wA present); and 3) uniparental disomy (UPD; MASI without CNG), due to complete loss of wA and selective retention/duplication of mA, respectively. A fourth rare pattern, reverse MASI, is defined as wild type allele specific imbalance.

が知られている。<sup>55</sup> 肺癌において、*P16<sup>INK4a</sup>* のメチル化は、扁平上皮癌に多く、腺癌では喫煙と関係しており、小細胞肺癌にはほとんど認められない。<sup>15</sup>

**P14-MDM2-P53**

*P53* 遺伝子は最も多くの癌で異常が認められる癌抑制遺伝子である。DNA 損傷など外部からのストレスにより発現が亢進し、転写因子として *GADD45*, *P21/WAF1*, *Bax*, *P53*, *AIP1* などの遺伝子発現を誘導し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導する。喫煙者で変異の頻度が高く、塩基配列の変化もプリン塩基 (A, G) からピリミジン塩基 (T, C) (またはその逆) に変異する transversion

変異を認める。<sup>56,57</sup> 女性の喫煙者では男性の喫煙者より transversion 変異の頻度が高く、女性において喫煙による肺癌の感受性が高いことの分子生物学的な傍証の1つと考えられる。<sup>58</sup> *P53* の異常は非小細胞肺癌の約 50%、小細胞肺癌の約 80% にみられる。<sup>6,59</sup> *MDM2* は *p53* と結合し、*p53* の機能を抑制する。約 30% の肺癌で高発現している。<sup>60</sup> このため最近では *MDM2* のアンタゴニストが開発され、抗腫瘍効果が期待されている。<sup>61</sup> *p14<sup>ARF</sup>* は *p16<sup>INK4a</sup>* と同様に *CDK* インヒビターの1つである。*P16<sup>INK4a</sup>* と同じ遺伝子領域 (*ARF-INK4a* locus) から alternative splicing により発現される。*MDM2* を抑制する

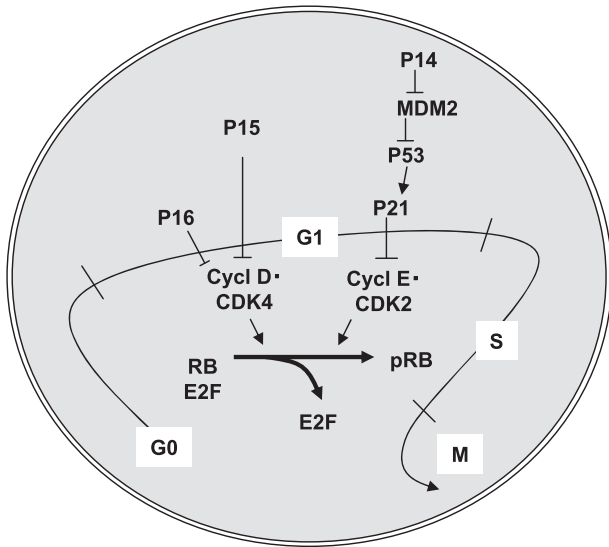


Figure 3. Cell cycle and RB and p53 pathway.

ことで p53 を安定化させる。<sup>62</sup>

#### 染色体欠失

上述の如く、癌抑制遺伝子の不活化機構として、2つある遺伝子のうち、遺伝子が何らかの機序で両方とも機能が消失することが必要とされている。<sup>63</sup> 癌ではしばしば2本の染色体のうち片方の特定の領域が欠失していることから、1つの遺伝子は欠失し、残った遺伝子は変異、メチル化などによって機能が消失することが癌の一因と考えられている。高頻度に欠失を認める領域には癌抑制遺伝子の存在が予想される。肺癌でも多くの領域で欠失を認めるが、<sup>64</sup> 中でも3番染色体短腕には両アレル共通に欠失している部分が存在しており (homozygous deletion)、腫瘍抑制遺伝子の存在が示唆されている。<sup>65,66</sup> 特に3p21.3は肺癌で高頻度にアレルの欠失を認める部位であり、癌抑制遺伝子の存在が強く示唆されている。<sup>67,68</sup> 同部位に存在する *RASSF1* 遺伝子は *RAS* 関連領域を持ち、数種の splicing variants を有する。<sup>69</sup> そのうち *RASSF1A* 遺伝子は、プロモーター領域のメチル化により、30~40%の非小細胞肺癌、70~100%の小細胞肺癌で発現が抑制されている。<sup>70</sup> 3p14.2の癌抑制遺伝子候補として *FHIT* 遺伝子がある。非小細胞肺癌の40~70%、小細胞肺癌の50~80%に遺伝子発現の異常がみられ、<sup>71,72</sup> メチル化も不活化の1つの機序として報告されている。<sup>73</sup>

### 3. その他の異常

#### 不死化

不死化は癌細胞の特徴である。通常テロメアは染色体末端の特徴的な繰り返し配列 (TTAGGG) を持つ DNA と、様々なタンパク質からなり、細胞分裂における染色

体の分配に必要であるが、分裂により短くなっていく。<sup>74</sup> テロメラーゼはテロメア長を維持することにより細胞の不死化に関与しており、その活性化と癌の関係が示唆される。非小細胞肺癌の約80%、小細胞肺癌の100%にテロメラーゼ活性がみられ、細胞増殖、進行病期に関係している。<sup>75,76</sup>

#### 血管新生

血管新生因子のうち VEGF は血管内皮細胞の増殖に関わる因子として重要な働きをしている。<sup>77</sup> 肺癌において VEGF の過剰発現は腫瘍の血管増生や転移と関連し、また腫瘍の進行や予後不良と相関することが報告されている。<sup>78</sup> 治療への応用としては VEGF のモノクローナル抗体であるベバシズマブをプラチナダブレットの化学療法と併用することで、進行非小細胞肺癌の生存中央値が12ヶ月を上回る成績が報告された。<sup>4</sup>

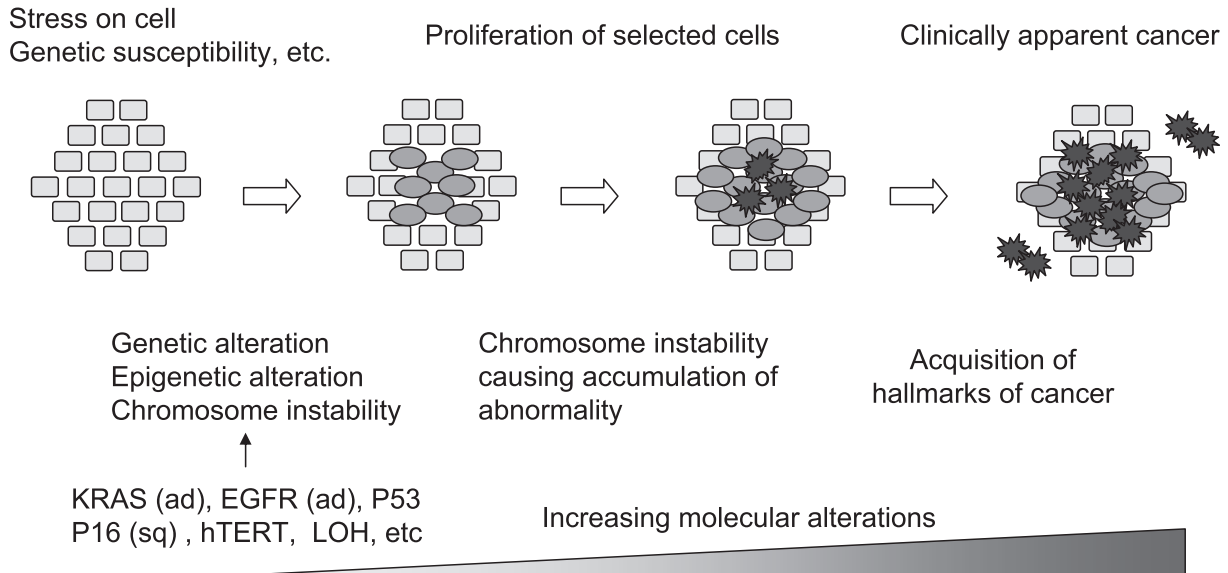
#### 浸潤・転移

癌細胞が運動・浸潤能を獲得するためには、多くの上皮性の表現型を失い、間葉系様細胞に形態変化する必要がある。これは、epithelial-mesenchymal transition (EMT; 上皮間葉移行) と呼ばれる。<sup>79</sup> EMT に関連する遺伝子発現プロファイルの変化として、cytokeratin, E-cadherin 発現の抑制、N-cadherin, vimentin などの発現の誘導が報告されている。癌細胞による matrix metalloproteinase (MMP) の分泌も EMT の徴候の1つであり、特に MMP2, MMP9 が詳細に検討されている。MMP によってフィブロネクチン、コラーゲンなどの細胞外マトリックスが分解され、癌細胞が移動できる空隙が生じる。肺癌においては血清 MMP2 レベルが進展・転移・生存に関連するとの報告がある。<sup>80</sup> EMT の他のマーカーとしては laminin  $\gamma 2$  がある。これは laminin-5 の3つのサブユニット ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ) の1つであるが、EMT を果たした細胞は laminin  $\gamma 2$  のみ放出し、他の2つは放出しない。肺癌においても laminin  $\gamma 2$  の発現が、肺腺癌進展の指標となり得るという報告がある。<sup>81</sup> MMP や vimentin が浸潤・転移を促進する遺伝子であるのに対し、KAI1/CD82 は E-cadherin などと同様、「metastasis suppressor genes」と呼ぶべき遺伝子で、培養細胞において KAI1 は細胞移動・浸潤を抑制し、同時に細胞凝集を促進する。肺癌を含む多くの進行癌で KAI1 の発現が抑制されていることが報告されている。非小細胞肺癌株 H1299 において KAI1/CD82 が MMP9 を不活化することにより腫瘍浸潤を抑制するとの報告がある。<sup>82</sup>

### 肺癌の発生と進展

#### 1. 多段階発癌型肺癌

上述の如く肺癌には様々な異常が認められる。大腸癌では adenoma-carcinoma sequence という多段階発癌の



**Figure 4.** Models of multistep molecular alterations in the progression of lung cancer. Accumulating alteration of various genes results in clinically apparent lung cancer. ad, adenocarcinoma; sq, squamous cell carcinoma; LOH, loss of heterozygosity.

モデルが提唱されているが,<sup>83</sup> 肺癌においても、上述の如く、様々な異常が蓄積した結果、臨床的な癌となる肺癌の一群があると考えられる。いわば異常蓄積型肺癌といえよう。事実、KRAS 変異、P53 変異、EGFR 変異、P16<sup>INK4a</sup> メチル化、loss of heterozygosity などは腫瘍近傍の病理学的には悪性ではない細胞においてすでに腫瘍と同じ異常を有していることが報告されている。<sup>84,85</sup> これは、分子レベルの異常による前癌状態の領域が存在し、これらの細胞において「癌の特徴」を引き起こす何らかの異常がさらに蓄積することで、臨床的に認識される腫瘍に進展していくことが示唆される (Figure 4)。<sup>86</sup>

このような癌発生の母地として肺腺癌では異型腺腫様過形成、扁平上皮癌では dysplasia などが考えられている。<sup>87</sup> さらに、癌細胞の起源として、自己複製能と、多分化能を特徴とする癌幹細胞が注目されている。肺癌の癌幹細胞については、その存在も含め不明だが、<sup>88</sup> 肺癌の癌幹細胞の表面マーカーとして脳腫瘍や乳癌などで知られている aldehyde dehydrogenase が有力視されている。<sup>89</sup> また、Notch 経路、Hedgehog 経路、Wnt 経路といった自己複製能に関わる経路の活性化や異常が肺癌でも報告されている。<sup>90-92</sup>

## 2. oncogene addiction

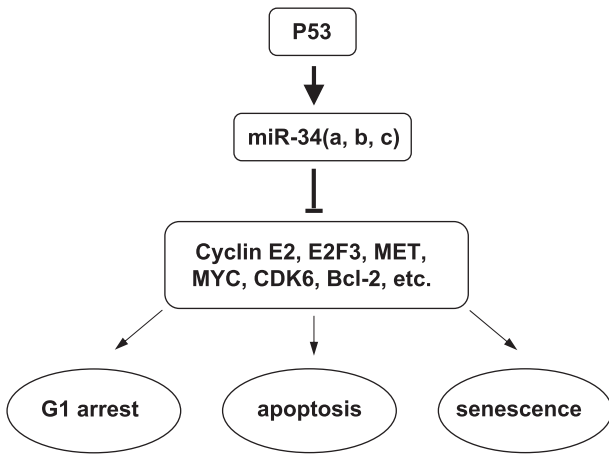
EGFR 変異を有する肺癌は EGFR-TKI により著しい腫瘍の縮小を認める。<sup>9,10</sup> これは EGFR 変異肺癌が他の異常の有無に関わらず、その生存を EGFR 変異に強く依存していることを示唆している。このように癌が特定の癌遺伝子に依存している現象を「oncogene addiction」と

いう。<sup>93</sup> EML4-ALK 融合遺伝子異常も oncogene addiction を起こす異常と考えられる。また、癌抑制遺伝子においても、癌の中には P53 などの単一の遺伝子の高発現のみで著明な抗腫瘍効果を示すものがあり、「tumor suppressor gene hypersensitivity」と呼ばれる。<sup>93,94</sup> これらの遺伝子異常は腫瘍原性が強く、単独あるいは比較的限られた分子異常でも癌化を引き起こす可能性がある。我々の検討では EGFR 遺伝子変異を有する肺癌では KRAS 遺伝子変異を有する肺癌と比較し P16 遺伝子などの癌抑制遺伝子のメチル化の頻度が低い。また、分子レベルでの異常が蓄積していく過程でゲノムあるいは染色体不安定性のため oncogene addiction を起こす決定的な遺伝子異常が生じることも考えられる。

## 個別化治療への課題

複雑な異常を持つ癌の治療が今後の課題である。ヒントは EGFR 変異と EGFR-TKI の関係であろう。癌が最も依存している異常を同定し、その依存を断ち切るというコンセプトは、今後の個別化治療の 1 つの柱となろう。最近では EML4-ALK 融合遺伝子と ALK 阻害剤の関係が注目されている。しかしながら、現在のところ明らかに oncogene addiction を起こす遺伝子異常は、EGFR 変異と EML4-ALK 融合遺伝子の 2 つであり、この 2 者のいずれかを有する非小細胞肺癌は腺癌の半数にも満たない。残りの非小細胞肺癌に oncogene addiction あるいは tumor suppressor gene hypersensitivity を引き起こす未知の遺伝子異常は何か? あるいは、残りの肺癌には





**Figure 5.** p53 and target genes of microRNA-34s. The microRNA-34s that inhibit multiple oncogenic genes mediates the primary function of p53, cell cycle arrest and induction of apoptosis and senescence.

このような遺伝子異常は少ないのか、その場合の治療法はどうあるべきか？ これらは今後、解決していくべき課題である。

## 今後の新しい分野

### 1. microRNA (miRNA)

miRNA はタンパク質をコードしていない 22 塩基ほどの小さな RNA である。<sup>95</sup> miRNA は相補的な配列を有する標的 mRNA に結合し、mRNA がタンパク質に翻訳される過程を妨げることでタンパク発現の調整を行っており、癌において発現異常が指摘されている。<sup>96</sup> 多くの miRNA は標的となる mRNA が不明であるが、let-7 が RAS および c-MYC を抑制することはよく知られている。<sup>97</sup> 最近では P53 が miR-34 の転写因子であり、miR-34 の標的が MET, CDK4, c-MYC, Bcl-2 などの癌遺伝子であることから、癌における癌抑制遺伝子 P53, miRNA, 癌遺伝子の発現異常という興味深い経路が明らかになった (Figure 5)。<sup>98</sup> 肺癌においても miR-34 の発現低下が報告されている。<sup>99</sup> また、非小細胞肺癌では let-7, miR-155 の発現が予後不良因子であるとする報告もある。<sup>100,101</sup>

### 2. 包括的解析

癌における遺伝子異常を網羅的に把握することを目的とした「The Cancer Genome Atlas (TCGA, 癌ゲノムアトラス)」計画が始動している (<http://cancergenome.nih.gov/>)。2007 年には肺腺癌に対し single nucleotide polymorphism アレイによるゲノムワイドなアプローチにより、14q13.3 の増幅を発見しこの領域にある TTF1 遺伝子を含めた遺伝子が腺癌の発生に関与することを示

唆した。<sup>43</sup> さらに 2008 年には肺腺癌に対し、623 個の遺伝子を調べ 1,000 以上の変異を検出した。<sup>102</sup> 高頻度に異常を認めた遺伝子にはチロシンキナーゼ遺伝子があり、EGFR ファミリー遺伝子である ERBB4, NTRK (neurotrophic tyrosine receptor kinase) などの変異が発見された。最近では、変異により腫瘍を起こす可能性のある遺伝子を driver gene と呼ぶことがある。今後、次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の検索が、より簡便に行えるようになったため、さらなる遺伝子異常の発見が期待される。

ゲノム以外の包括的取り組みも行われている。遺伝子の発現状態を調べる transcriptomics, タンパク質を調べる proteomics, 細胞内の代謝物に対する metabolomics などがある。このような包括的解析は OMICS 解析と呼ばれる。<sup>103</sup> さらに、最近、病気を含めた複雑な生命現象をシステムとしてとらえる systems biology が急速に発展しているが、今後、肺癌の研究、臨床においても systems biology に基づいた新しい発想が重要となる可能性がある。

## おわりに

個々の非小細胞肺癌の病態は様々であり、同じ癌として一括りにすることは適切ではない。特に進行癌では、様々な治療法を駆使する必要があるが、個々の癌の特徴に応じた治療を行わない限り治療成績を劇的に改善することは難しいと考えられる。分子生物学的特徴から非小細胞肺癌を簡便かつ的確に分類するシステムを構築するとともに、分類された特徴に応じた治療法を開発することが、今後の目標となろう。

## REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225-249.
2. Fukui T, Mitsudomi T. Mutations in the epidermal growth factor receptor gene and effects of EGFR-tyrosine kinase inhibitors on lung cancers. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;56:97-103.
3. Jida M, Toyooka S, Mitsudomi T, Takano T, Matsuo K, Hotta K, et al. Usefulness of cumulative smoking dose for identifying the EGFR mutation and patients with non-small-cell lung cancer for gefitinib treatment. *Cancer Sci.* 2009;100:1931-1934.
4. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355:2542-2550.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
6. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science.* 1989;246:491-494.

7. Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL, Linnoila RI, Minna JD, Gazdar AF. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene*. 1991;6:1353-1362.
8. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM, et al. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res*. 2002;62:3659-3662.
9. 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.
10. 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.
11. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33(Suppl):245-254.
12. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429:457-463.
13. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-1159.
14. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 2001;61:249-255.
15. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, et al. DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther*. 2001;1:61-67.
16. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;111:47-54.
17. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 2001;37(Suppl 4):S3-S8.
18. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:339-346.
19. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Koehler O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2005;352:786-792.
20. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2005;2:e73.
21. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2006;66:7854-7858.
22. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer*. 2006;118:257-262.
23. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, Domenichini I, Bartolini S, Ceresoli GL, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23:5007-5018.
24. Soh J, Toyooka S, Ichihara S, Fujiwara Y, Hotta K, Suehisa H, et al. Impact of HER2 and EGFR gene status on gefitinib-treated patients with nonsmall-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2007;121:1162-1167.
25. 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.
26. Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2009;4:5-11.
27. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res*. 2008;68:9479-9487.
28. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell*. 2010;17:77-88.
29. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501.
30. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:921-929.
31. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res*. 2008;68:6913-6921.
32. Kim MS, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer*. 2008;98:1533-1535.
33. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999;401:82-85.
34. Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:1133-1141.
35. Pal SK, Figlin RA, Reckamp KL. The role of targeting mammalian target of rapamycin in lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2008;9:340-345.
36. Gridelli C, Maione P, Rossi A. The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2008;13:139-147.
37. Tsuchida N, Ohtsubo E, Ryder T. Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science*. 1982;217:937-939.

38. Soh J, Okumura N, Lockwood WW, Yamamoto H, Shigematsu H, Zhang W, et al. Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells. *PLoS One*. 2009;4:e7464.
39. Jackman DM, Miller VA, Cioffredi LA, Yeap BY, Jänne PA, Riely GJ, et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5267-5273.
40. Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, et al. Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2008;68:5524-5528.
41. Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev*. 1995;42:459-467.
42. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:633-639.
43. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhi R, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007;450:893-898.
44. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448:561-566.
45. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:497-511.
46. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263:1281-1284.
47. Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol*. 2004;199:330-358.
48. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncogene identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3143-3149.
49. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol*. 2009;22:508-515.
50. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009;27:4247-4253.
51. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2008;68:3389-3395.
52. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274:1672-1677.
53. Ewen ME. The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev*. 1994;13:45-66.
54. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*. 2001;28(Suppl 4):3-13.
55. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*. 1996;85:27-37.
56. Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*. 1996;17:1187-1198.
57. Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 2001;22:367-374.
58. Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Hum Mutat*. 2003;21:229-239.
59. Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, et al. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*. 1992;7:171-180.
60. Eymen B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene*. 2002;21:2750-2761.
61. VanderBorghet A, Valckx A, Van Dun J, Grand-Perret T, De Schepper S, Vialard J, et al. Effect of an hdm-2 antagonist peptide inhibitor on cell cycle progression in p53-deficient H1299 human lung carcinoma cells. *Oncogene*. 2006;25:6672-6677.
62. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998;92:725-734.
63. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:820-823.
64. Girard L, Zöchbauer-Müller S, Virmani AK, Gazdar AF, Minna JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res*. 2000;60:4894-4906.
65. Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, et al. Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1987;317:1109-1113.
66. Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba II, Latif F, Bader S, Wei MH, et al. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. *Oncogene*. 1998;16:3151-3157.
67. Daly MC, Xiang RH, Buchhagen D, Hensel CH, Garcia DK, Killary AM, et al. A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity. *Oncogene*. 1993;8:1721-1729.
68. Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varela-Garcia M, Swanton M, et al. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene*. 1996;12:1289-1297.

69. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 2000;25:315-319.
70. Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:691-699.
71. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Coticelli MG, Inoue H, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell.* 1996;85:17-26.
72. Rohr UP, Rehfeld N, Geddert H, Pflugfelder L, Bruns I, Neukirch J, et al. Prognostic relevance of fragile histidine triad protein expression in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:180-185.
73. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, et al. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3581-3585.
74. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* 1987;51:887-898.
75. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:895-902.
76. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, et al. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1609-1615.
77. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246:1306-1309.
78. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chiné S, Silvestri V, Lucchi M, et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3:861-865.
79. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420-1428.
80. Guo CB, Wang S, Deng C, Zhang DL, Wang FL, Jin XQ. Relationship between matrix metalloproteinase 2 and lung cancer progression. *Mol Diagn Ther.* 2007;11:183-192.
81. Kagesato Y, Mizushima H, Koshikawa N, Kitamura H, Hayashi H, Ogawa N, et al. Sole expression of laminin gamma 2 chain in invading tumor cells and its association with stromal fibrosis in lung adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:184-192.
82. Jee BK, Park KM, Surendran S, Lee WK, Han CW, Kim YS, et al. KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342:655-661.
83. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759-767.
84. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. 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.* 1998;95:11891-11896.
85. 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.
86. Kubo T, Yamamoto H, Ichimura K, Jida M, Hayashi T, Otani H, et al. DNA methylation in small lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma components. *Lung Cancer.* 2009;65:328-332.
87. Colby TV, Wistuba II, Gazdar A. Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv Anat Pathol.* 1998;5:205-215.
88. Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:61-72.
89. Patel M, Lu L, Zander DS, Sreerama L, Coco D, Moreb JS. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer.* 2008;59:340-349.
90. Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, Donzelli M, Tosoni D, Volorio S, et al. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:22293-22298.
91. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003;422:313-317.
92. Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, Sidhu SS, Mengistab A, Finkbeiner W, Gallup M, et al. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer. *PLoS One.* 2006;1:e93.
93. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science.* 2002;297:63-64.
94. McCormick F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer.* 2001;1:130-141.
95. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294:853-858.
96. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435:834-838.
97. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120:635-647.
98. He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:819-822.
99. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol.* 2007;17:1298-1307.
100. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64:3753-3756.

101. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9:189-198.
102. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455:1069-1075.
103. Ghosh D, Poisson LM. "Omics" data and levels of evidence for biomarker discovery. *Genomics*. 2009;93:13-16.