

Semi-Nested リアルタイム RT-PCR 法による  
微小な肺生検検体からの遺伝子発現定量  
解析の有用性に関する研究  
—非小細胞肺癌における  
サイトケラチン mRNA 発現量による  
組織型鑑別と予後との関係について—

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

中西 陽子

申請年 2015 年

指導教員 根本 則道

## 目 次

I	概要	1
II	研究の背景	7
III	目的	13
IV	研究対象	14
V	実験 I	15
V-1	目的	15
V-2	方法	15
V-3	結果	20
V-4	小括	24
VI	実験 II	25
VI-1	目的	25
VI-2	方法	25
VI-3	結果	30
VI-4	小括	31
VII	考察	33
VIII	結語	38
	文献	39
	表	47
	図	65
	図の説明	81
	研究業績	88
	謝辞	102

略語一覽 ①

略語

完全形

説明

略語一覽 ②

略語

完全形

説明



## I 概要

### 背景

近年新たに開発が進んでいる非小細胞肺癌に対する分子標的薬剤の適応決定には、病理形態学的組織型の鑑別、すなわち扁平上皮癌と非扁平上皮癌との適切な鑑別診断が必要不可欠である。腫瘍細胞に上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼ領域の変異を有する患者へのゲフィチニブやエルロチニブ、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子を有する患者へのクリゾチニブは肺癌の分子標的薬の代表であり、これらの遺伝子変異は主に腺癌に見られるため、扁平上皮癌であった場合には遺伝子検査の施行が推奨されない。しかしながら、手術適応のない、進行肺癌患者の場合は、形態学的な解析に適した手術検体を得ることができず、微小な肺生検検体での解析および評価が求められる。肺生検検体から作製される切片は 1mm 四方程度と小さく、組織型を鑑別するために、癌組織の構造異常を形態学的に評価することや、癌細胞が発現している特異的な蛋白質を複数染色することは困難となる場合も多い。しかし現在、肺癌の組織型を鑑別することは有効な治療方法を選択する上で必須となっている。肺癌の組織型鑑別マーカーは多数報告されている。代表的なものとしては肺腺癌を鑑別するマーカーには甲状腺転写因子 (TTF)-1、Napsin-A、サイトケラチン(CK)7、肺扁平上皮癌には CK5/6、CK14、p63、p40 が用いられている。これらの中で、サイトケラチンは細胞骨格の中間径フィラメントとして発現する蛋白質であるが、そのサブタイプの発現は細胞や癌種によって異なることから、診断においても様々な癌を鑑別する際に用いられる。しかし癌の鑑別に有用なサイトケラチン発現の意義についてはいまだ明らかではない。そこで本研究では、肺癌の組織型鑑別にも有用とされるサイトケラチンサブタイ

プ蛋白質の mRNA レベルでの発現解析に着目した。免疫組織化学では発現の有無を調べたい蛋白質の種類と同じ数の切片を作製して染色を行う必要があるが、遺伝子解析の場合は一度抽出した核酸から複数の標的遺伝子を解析でき、量的に限界のある肺生検検体への活用が期待される。そこで、本研究では、微量な肺生検検体からの高感度な遺伝子発現定量解析手法の構築を試み、肺生検からの組織型鑑別マーカーとしての可能性と、組織型特異的な mRNA の高発現の意義について検討した。

## 目的

本研究では、実験 I として、微小な肺生検のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から、高感度な遺伝子発現定量解析手法を確立し、mRNA 発現量による組織型鑑別の可能性を明らかにすること、さらに、実験 II として、組織型特異的に高発現する mRNA の意義として、予後との関係および高発現因子について検討し、進行肺癌の悪性度との関係について明らかにすることを目的とした。

## 対象

対象は日大板橋病院にて 2009 年から 2010 年に肺生検を施行した肺癌 47 例と非悪性 5 例の FFPE 切片であった。本研究ではこれらの臨床検体を後ろ向き研究に使用することと限定し、臨床研究倫理審査委員会の承認を受けて研究対象とした(臨床研究承認番号 RK-121109-9)。

## 方法

実験 I では、対象の FFPE 切片より、レーザーマイクロダイセクション(LMD)

法を用いて癌細胞を回収した。Total RNA の抽出後、相補的 (c) DNA 合成を行って鋳型とした。標的遺伝子転写産物は、細胞骨格の中間径フィラメントとして発現しているサイトケラチン (CK) 6、CK7、CK14、CK18、甲状腺転写因子 (TTF)-1 と内因性コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。標的遺伝子転写産物の発現を高感度に検出するための定量解析手法として、これまで微生物検出分野では報告があったが、FFPE 標本を対象とした報告はなかった semi-nested quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (snq RT-PCR) 法の FFPE 検体への応用を検討した。本法は、定量したい標的遺伝子配列を増幅させておくための 1 回目の RT-PCR 反応と、実際に定量する 2 回目の qRT-PCR 反応で同一のプライマーの組み合わせを使用する方法である。また蛋白発現との相関を検討するため、CK5/6、CK7、CK14、CK18、TTF-1 の免疫組織化学を施行した。

実験 II では、実験 I で肺腺癌の組織型鑑別への有用性と予後への関与が示された CK18 高発現の意義について検討した。CK18 発現量から対象の腺癌症例を高発現群、低発現群に分け、 Kaplan-Meier 法による予後解析を行った。対象切片の癌細胞から DNA を抽出し、非小細胞肺癌のドライバー変異として着目されている上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異、 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) 遺伝子変異の解析を quenching probe (QP) 法と DNA ダイレクトシーケンス法で行った。Anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子の有無については免疫組織化学と DNA ダイレクトシーケンス法で行い、実験 I で作製した cDNA を用いて snqRT-PCR 法により、EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現量を定量した。統計解析は、Mann-Whitney U 検定、スピアマンの順位相関解析、Kaplan-Meier の log-rank 検定、ピアソンの  $\chi^2$  検定、重回帰分析を、SPSS Statistics version 20.0 (IBM) を用いて行った。

## 結果

実験 I の結果、FFPE 検体を用いた遺伝子発現定量解析において、通常の qRT-PCR による解析では、初期遺伝子発現量が  $10^4$  コピー/ $\mu$ L から測定可能であったが、snqRT-PCR 法による結果では  $10^1$  コピー/ $\mu$ L から測定可能であり、微小検体からの遺伝子発現定量解析の高感度化が示された。Snq RT-PCR により定量された遺伝子発現量は、免疫組織化学による蛋白発現の陽性細胞数と関連していた。組織型の鑑別では、CK7、CK18、TTF-1 mRNA は腺癌に有意に高発現 ( $P < 0.05$ ) であり、CK6、CK14 mRNA は扁平上皮癌に有意に高発現 ( $P < 0.05$ ) であった。特に CK18 mRNA は腺癌の予後に ( $P < 0.05$ )、CK6 mRNA は扁平上皮癌の予後に ( $P < 0.05$ ) 有意に関連した。

実験 II では、実験 I で示された進行肺腺癌における CK18 mRNA 高発現の意義について、予後との関係ならびに高発現因子について検討を行った。この結果、進行肺腺癌における CK18 mRNA 高発現群の生存期間の中央値は 342.7 日、低発現群は 932.9 日で、CK18 高発現群は有意に予後不良であることが示された ( $P = 0.01$ , log-rank)。CK18 高発現に関与する因子について検討を行った結果、肺腺癌のドライバー変異との間に有意な相関は認められなかったが、phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (PI3K) mRNA 発現との間に有意な相関が示された ( $P = 0.01$ )。また、ras homolog gene family (Rho) A mRNA 発現との間に単相関の関係が示された。

## 考察

肺癌の組織型鑑別は治療方針決定のため重要となっている。従来、肺癌の組織型鑑別には癌組織の構造異型を評価する以外に免疫組織化学によるパネルが有用とされていたが、手術不能な進行肺癌では、微小な肺生検検体しか採取で

きないことから、パネルに必要な枚数の標本を作製することが困難であった。

しかし、本研究において構築した微小な肺生検検体からの snq RT-PCR 法で肺癌の組織型特異的な mRNA 発現定量解析を行うことにより、肺癌の組織型を鑑別できることが明らかとなった。さらに、CK18 mRNA および CK6 mRNA の高発現は、各々肺腺癌ならびに肺扁平上皮癌の組織型に特異的であることに加えて、予後を予測し得た。特に、進行肺腺癌症例における CK18 mRNA の高発現予後因子となることを初めて示した。CK18 蛋白質は、癌患者の血中濃度が非癌患者に比較して上昇することや、前癌病変で Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox) 1 による CK18 蛋白質の蓄積が癌への進展に関与している可能性が報告されている。本研究において、CK18 mRNA 高発現因子について検討した結果、増殖因子受容体シグナル伝達経路との関係は示されず、PI3K mRNA 発現との相関、RhoA mRNA 発現との単相関が示された。Nox 1 のサブユニットに Rho ファミリー G 蛋白質が含まれることから、前癌病変の進展だけではなく、本研究で検討した進行肺腺癌においても RhoA の高発現に示唆される Nox1 の亢進が CK18 の高発現あるいは蓄積を誘導して、悪性化に関与している可能性も考えられた。進行肺癌の予後は、治療の反応性に依存すると考えられる。細胞膜蛋白質や糖蛋白質の過剰発現は、プラチナ系抗癌剤の細胞内への取り込みを低減させることにより、薬剤耐性を示すことが報告されているが、細胞膜構成成分であるイノシトールリン脂質のリン酸化を媒介する脂質キナーゼである PI3K が CK18 mRNA の高発現に強く関与していたことから、CK18 の高発現は抗癌剤の核への浸透性を阻害するような薬剤耐性因子となっている可能性が示唆された。進行肺腺癌の悪性化因子として、CK18 高発現と治療抵抗性との関係についてさらに検討を継続したい。

本研究により構築した snqRT-PCR 法により微小な肺生検検体からも複数の

遺伝子発現定量解析が可能となることが示された。微小であるが患者個々の癌細胞と臨床情報を有する生検検体の高感度な分子生物学的解析手法は、手術検体を得ることができない進行癌やその他の疾患の形態、分子、治療反応性、臨床予後の関係を明らかにするための方法論として有用性が期待される。

## 結語

本研究により、snqRT-PCR 法は、微小な肺生検から高感度に複数の遺伝子発現定量解析を可能とすることが明らかとなった。これにより、従来の病理組織学的手法では鑑別困難な場合が多かった肺生検検体からも組織型鑑別が可能となり、進行肺癌の治療法選択への有用性が示された。さらに本研究では CK18 mRNA の高発現が進行肺腺癌の予後因子となることを初めて示した。また、進行肺腺癌における CK18 高発現は、抗癌剤への耐性化に関与して予後因子となっている可能性が示唆された。

## II 研究の背景

### II-1. 肺癌の分類

#### II-1-1. 肺癌の組織分類

肺癌は、難治性で予後不良な疾患であり、厚生労働省の最新癌統計 [1] によると 2012 年の癌死亡者数は 360,963 人で、肺癌は男性の 1 位、女性の 2 位となっている。部位別の死亡者数で見ると男女ともに肺癌が 1 位である。

肺癌は、病理組織学的に神経系のマーカーが陽性となる小細胞癌と上皮性腫瘍である非小細胞癌に大別され、非小細胞癌は、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌に分類される。全肺癌の 50%以上が腺癌、約 25–30%が扁平上皮癌、約 10–15%が小細胞癌、大細胞癌、その他が数%とされる。肺癌は、喫煙との関係が知られているが、組織型の中で最も多い腺癌は喫煙との関係は示されておらず、むしろ、非喫煙者や女性に比較的多い傾向がある。腺癌の中で、特に末梢型小型肺腺癌の組織分類として野口分類があり(表 1)、外科的根治術が適用される場合の予後因子として重要である。

#### II-1-2. 肺腺癌の分子生物学的分類

一方、手術適応のない進行・再発癌の薬物療法は、近年、分子生物学の進歩にともなって、目覚ましい発展を遂げている。特に癌細胞の増殖を特異的に抑制する機能に優れた分子標的薬は進行・再発癌の予後改善に最も期待されている。この背景として、非小細胞肺癌の細胞増殖に強い関与を示す遺伝子変異の存在がいわゆるドライバー変異として発見された[2]ことは非常に大きく、各々のドライバー変異に対応する分子標的薬の開発が進むこととなった[2]。非小細胞肺癌のドライバー変異は、図 1 に示した通り、増殖因子受容体シグナル



伝達経路においてチロシンキナーゼを恒常的に活性化する変異が存在することにより、増殖因子の結合がなくても二量体を形成し、チロシンリン酸化が生じ転写活性が促進されるというものである。非小細胞肺癌におけるドライバー変異は相互排他的とされており、一つの癌細胞は一つのドライバー変異のみを有するということから、図 2 に示した通り、分子標的薬への適応を踏まえて組織型に替わり遺伝子変異の種類で分類する必要性が生じてきた[2]。肺腺癌におけるドライバー変異と分子標的薬で、上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) はその代表である[3]。ゲフィチニブは EGFR-TKI として 2002 年に世界に先駆けてわが国で承認されるが、副作用が社会問題ともなった。その後、治療奏功例で EGFR 遺伝子変異の存在が明らかとなり[4]、EGFR exon18 から exon 21 の TK 活性化ドメインに薬剤感受性変異を有する症例に限定して 2009 年に再度、承認となった。EGFR-TKI に感受性の EGFR 遺伝子変異を有する症例は腺癌、女性、非喫煙、アジア人に多いとの報告がある[4]。また、2007 年に我が国の曾田、間野らが発見した echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌[5]に対しては ALK TK の阻害作用を有するクリゾチニブが著効することが明らかとなり[6]、2011 年に承認された。

### II-1-3. 肺癌診療における組織型分類の重要性と分類方法

これらの標的遺伝子変異は肺腺癌に多く存在することから、遺伝子検査を効率的に行うために組織型を鑑別することがより重要となってきた。一方で、血管新生抑制作用のあるベバシズマブは、扁平上皮癌患者で重篤な喀血を引き起こす副作用が報告された。また、葉酸代謝拮抗剤であるペメトレキセドは扁平上皮癌患者では効果が見られないという結果から、非小細胞肺癌を腺癌と扁



平上皮癌あるいは、扁平上皮癌と非扁平上皮癌に鑑別することは、肺癌診療において極めて重要となっている[7]。

病理組織における組織型の鑑別では、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による形態学的所見が重要となる。分化度が低く鑑別困難な場合には、特殊染色による粘液の証明や、免疫組織化学による鑑別マーカー蛋白質の検出が補助的資料となる。組織型鑑別マーカーに関しては多数の報告があり、現在一般的に用いられているものは、肺腺癌では thyroid transcription factor (TTF) -1[8]、サーファクタント蛋白質 (SP)[9]、サイトケラチン(CK)7[10]、Napsin A[11] がある。TTF-1 は甲状腺特異遺伝子の転写調節因子であり、ホメオボックスを有するホメオドメインタンパクファミリーに属する。甲状腺、肺、間脳で特異的に発現し、肺に特異的な分化誘導遺伝子の活性化にも関与していることが示されている。正常組織では、肺の II 型肺胞上皮細胞、クララ細胞、甲状腺の濾胞上皮細胞に発現が認められる[8]。SP は、肺サーファクタント蛋白質であり、疎水性でサーファクタントの表面活性に関与する SP-B、SP-C と、免疫防御において主たる機能を有する SP-A、SP-D がある。II 型肺胞上皮細胞で産生され、ラメラ封入体と呼ばれる層状構造物の中でリン脂質特にホスファチジルコリンと会合し、肺胞腔へ分泌される。細気管支領域のクララ細胞や一部の気管支上皮にも発現が認められる[9]。Napsin A は、ペプチダーゼ A1 ファミリーに属する、ペプシン様アスパラギン酸プロテイナーゼで、肺サーファクタントの成熟過程に関与している分子量約 38kDa の単鎖タンパク質である。免疫組織化学で肺の II 型肺胞細胞や肺腺癌で発現することが知られる[11]。肺腺癌における CK7[10]、肺扁平上皮癌に特異的に発現する蛋白質としては、CK5/6[10]、CK14[10]、p63[12]、p40[13]がある。サイトケラチン(CK)に関しては後述する。P63 は、p53 癌抑制遺伝子ファミリーの 1 つである。様々な上皮の基底細胞の

核に発現し、細胞周期中の細胞増殖と DNA 損傷や環境応答による細胞死を制御する転写因子となる[12]。

細胞骨格関連タンパク質であるサイトケラチン (CK) のサブタイプ分類も細胞種によって発現が異なることが古くから知られており[10]、鑑別に利用されてきた。近年では、網羅的な遺伝子解析により、統計学的有意性を有する鑑別マーカーも次々に見出されている。

#### II-1-4. サイトケラチン

サイトケラチンは、細胞骨格を構成する中間径フィラメント蛋白質の 1 種である。細胞骨格は、アクチンマイクロフィラメント、中間径フィラメント (intermediate filament : IF) 、微小管の 3 つのネットワークから構成されている。中間径フィラメントネットワークは、重要な生理機能として器官の分配、シグナル伝達、細胞極性と遺伝子制御を担っているとされるが、他の 2 つのネットワークと比較していまだ不明な点が多いとされている[14]。中間径フィラメント蛋白質は、アミノ酸配列と cDNA 塩基配列の類似性から 6 種類に分類されている(表 2)。タイプ I、II が最も大きいグループでヒトでは 54 種類のケラチンが同定されている。上皮、毛髪、爪に発現しているサイトケラチンも含まれる。ケラチンネットワークはタイプ I と II のケラチンの組み合わせで構成されており、この組み合わせは組織や細胞に特異的である(表 3)ことから、病理診断においても鑑別マーカーとしての有用性が言われてきた。特に CK7 と CK20 の免疫組織化学による発現の組み合わせが有用とされている (表 4)[15]。

#### II-1-5. 微小な肺生検における組織型分類

肺癌の 80%以上を占める非小細胞肺癌の組織型を分類することは、適切な

治療方針決定のために極めて重要である[16]。しかしながら、手術適応のない進行肺癌の場合は、生検あるいは細胞診検体での検討が必要となる。経気管支鏡的肺生検により採取される組織検体は約 1mm 四方と小さい上に挫滅な変性なども加わるため、HE 染色により構造異常を形態学的に評価することや、複数の鑑別マーカーを染色することが困難となる場合がある。肺癌診療ガイドラインにおいても、生検組織や細胞診検体で組織型鑑別が困難な場合には、組織型によらず EGFR ならびに ALK の遺伝子検査を行うことを推奨している。しかしながら、遺伝子変異が陰性であった場合には、再度組織型の鑑別が必要となる。

肺癌は、自覚症状に乏しいため約 70%の患者はすでに進行した状態で発見されている。したがって、特に進行肺癌患者における肺生検は肺癌患者個々の癌細胞の特性を評価し得る唯一の検体となるが、ホルマリン固定された微小な肺生検検体 (図 3) は、形態学的にも、分子生物学的にも解析困難な検体と見なされてきた。

#### II-1-6. 微小検体を用いた高感度遺伝子解析の試み

本研究では、微量臨床検体からの高感度な遺伝子解析方法を構築するため、遺伝子発現定量解析には semi-nested リアルタイム定量 (snq) reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法について検討した。微量な遺伝子発現を検出する際、通常の RT-PCR 法の前に標的遺伝子配列を増幅させる場合があるが、図 4 に示した通り、1 回目の RT-PCR 反応で増幅させる標的遺伝子配列の内側に、再度プライマーを設計して 2 回目の PCR 反応を行う方法を nested RT-PCR 法と言う。一方、1 回目の RT-PCR 反応で使用するプライマーと片側のみ同じ場合、あるいは、両側とも同じプライマーを使用する場合、Semi-nested RT-PCR 法と言われている[17]。この semi-nested PCR 法を定量

PCR 法に応用した方法が、snqRT-PCR 法である[18]。すなわち、リアルタイム定量(q)RT-PCR を行う前に、qRT-PCR に用いるプライマーと同じ組み合わせのプライマーを使用して標的 mRNA 配列の増幅を行う方法である。これらの方法は、微生物学の分野でより高感度に微生物の遺伝子を検出するために用いられている[17,18]。しかしながら、ヒトの病理組織で FFPE 標本から試みた例はなく、本研究が初めての試みである。

そこで、本研究では、微小ではあるが様々な細胞の混在する肺生検検体からレーザーマイクロダイセクション (LMD) 法により標的腫瘍細胞のみを回収した (図 5)。微量な腫瘍細胞からの CK サブタイプの高感度遺伝子発現定量解析手法の構築を試み、mRNA 発現量による肺癌組織型鑑別への有用性を検討した。さらに本研究では、免疫組織化学において肺癌の組織型鑑別に有用とされながら発現の意義については報告されていなかった CK サブタイプの発現の意義について検討するため、snqRT-PCR 法によって肺生検検体から定量し得た CK mRNA 発現量と予後との関係を初めて解析した。

手術適応のない進行肺癌においては、十分な検体量を得ることができないため、詳細な病理学的検索を行うことが困難となり組織型の鑑別はもとより、検体から得られる情報量が限られてしまうことが懸念される。微小であるけれども患者個々の腫瘍細胞と臨床情報をともに有する肺生検検体の分子生物学的背景を解析できる高感度な方法論の検討は必要である。

### III. 目 的

手術不能な進行肺癌では、手術検体などの十分量の組織検体を得ることができない。進行肺癌では特に組織型の鑑別が治療方針決定に重要であるにも係らず、肺生検検体の量的な問題から従来の病理組織学的検索が困難であった。そこで本研究では、実験 I として、微小な肺生検のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から、高感度な遺伝子発現定量解析手法を確立し、mRNA 発現量による組織型鑑別の可能性を明らかにすること、さらに、実験 II として、組織型特異的に高発現する mRNA の意義として、予後との関係および高発現因子について検討し、進行肺癌の悪性度との関係について明らかにすることを目的とした。

#### IV. 研究対象

日本大学医学部附属板橋病院病理部に 2009 年から 2010 年に提出された肺癌手術検体ならびに肺生検検体のホルマリン固定パラフィン包埋検体のうち、複数名の病理専門医によって確定診断が行われ、かつ、臨床情報が得られた 52 例の検体を対象とした。いずれも病理診断後の残検体の後ろ向き研究への使用と限定し、当院倫理委員会による臨床研究の承認を得て行った（臨床研究承認番号 RK-121109-9）。症例のサマリーは表 5 に示した通りであった。

## V. 実験 I

### V-1. 目的

微小な肺生検のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE) 検体から、高感度な遺伝子発現定量解析手法を確立し、mRNA 発現量による組織型鑑別の可能性を明らかにすることを目的とした。

### V-2. 方法

#### V-2-1. レーザーマイクロダイセクション (LMD)

①各症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより 8  $\mu\text{m}$  の切片を作製して LMD 専用フィルム付きスライドガラス (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany)に貼付し、60°C一晩静置した。

②プレパラートを静置して 100%キシレンで切片を室温で 10 分間覆い、キシレンをピペットで除去した後、100%エタノールで切片を覆いすぐにピペットで除去する。その後、再度 100%エタノールで覆い室温で 1 分間程度置いた後ピペットで除去して切片を乾燥させた。

③トルイジンブルー染色を行い室温で乾燥させた。

④PALM MicroBeam III-N (Carl Zeiss Microscopy) を用いて切片中の腫瘍細胞を 2 名の病理専門医とともに同定して切削し、ミネラルオイルを注入したチューブキャップに回収した (図 1)。

#### V-2-2. Total RNA の抽出

① RNA 抽出液は 1 サンプルにつき 200  $\mu\text{l}$  中、2% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、10 mM

Tris-HCl)を含み室温で保管した。

- ② LMD 法により腫瘍細胞が回収されたチューブキャップを 200  $\mu$ L の RNA 抽出液を分注した 1.5 mL チューブにセットしキャップを下にして十分攪拌した。
- ③ 2 M 酢酸ナトリウム溶液 20  $\mu$ l、クエン酸飽和フェノール(pH 4.0) 220  $\mu$ l、クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) 60  $\mu$ l を加えて攪拌 (vortex) し室温で静置した。
- ④ 室温で 30 分間遠心 (回転数は 10,000 ~ 16,000 rpm) し、上部の水層を新しい 1.5 ml チューブに移した。
- ⑤ グリコーゲン 2  $\mu$ l、イソプロパノール 200  $\mu$ l を加えて転倒混和後-80°Cに 30 分静置した。
- ⑥ 4°Cで 30 分間遠心 (15,000 rpm) し、上清を除去した。
- ⑦ 70%エタノールを 200  $\mu$ l 加えてただちに遠心 (4°C、15,000 rpm、5 分間)し、上清除去後、水中で乾燥させた(約 30 分間)。
- ⑧ 5  $\mu$ l の RNase free 水に溶解させた後、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, U.S.A) を用いて RNA 濃度を測定し、使用まで-80°Cで保存した。

### V-2-3. ゲノム DNA の除去と cDNA 合成

V-2-2 で調整した RNA サンプルは、QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA の除去と cDNA 合成を行った。RNA 溶液の濃度が 100 ng 以上の場合には通常通り cDNA 合成を行い、100 ng 未満の場合には 1/2 量のプロトコルで cDNA 合成を行った。cDNA の合成方法は下記に示した通りである。



#### V-2-4. ゲノム DNA の除去

サンプル毎に表 6 に示した反応溶液を 0.2 mL チューブに調整し、サーマルサイクラー PC808 (ASTECC, Tokyo, Japan) を用いて、42°C、2 分間反応後、氷中にて急冷した。

#### V-2-5. cDNA 合成

V-2-4 の各反応溶液に表 7 に示したマスターミックスを分注し、サーマルサイクラー PC808 (ASTECC) を用いて、42°C、20 分間反応後、95°C、7 分間で酵素を失活させて使用まで 4°C に保存した。

#### V-2-6. Semi-nested リアルタイム定量 RT-PCR 法

本研究では、snqRT-PCR 法を用いて、CK サブタイプの発現として、CK 6, CK 7, CK 14, CK 18 と、CK19 mRNA について、また、蛋白レベルでの発現が肺腺癌の鑑別に多く用いられている TTF-1 mRNA の発現定量解析を行った。内因性コントロールとして、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現量を定量した。定量解析を行う標的 mRNA 配列を増幅させるための 1 回目の RT-PCR 反応では、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、表 8 に示したマスターミックスを調整した。反応に用いたプライマーの作製方法は次の通りであった。塩基配列データベース GenBank (National Center of Biotechnology Information : NCBI) を用いて標的遺伝子の塩基配列情報を検索し、得られた塩基配列から、インターネット上でフリーで提供されているプライマー設計ソフト Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, All rights were reserved by Whitehead Institute for Biomedical Research, Steve Rozen,

and Helen Skaletsky.) を用いてプライマーの設計を行った。近年、PCR 反応は従来の変性 (95°C)、アニーリング (T<sub>m</sub> 値)、伸長反応 (72°C) の 3 step で行うサイクル反応に替わり、変性 (95°C) と、アニーリングおよび伸長を 60°C の 2 step で行うサイクル反応の有用性が示され [19]、試薬メーカーからも SYBR Green I を用いた qRT-PCR 法のためのプライマー設計方法が推奨されている [20]。これにより、設計条件は、①RT-PCR 産物の塩基長はホルマリン固定による RNA の断片化を考慮し 150bp 以下であること、②二本鎖 DNA が一本鎖に溶解する温度 (melting temperature : T<sub>m</sub>) が qRT-PCR の最適条件である 60°C ±0.5°C となること、③分子間結合力が強く PCR 効率に影響を与えるとされるグアニン(G)とシトシン(C)の含有量が 50%程度となることの 3 つを満たすこととした。作製したプライマーは表 9 に示した通りであった。

各反応液を 0.2 mL チューブに調整し、サーマルサイクラー PC808 (ASTECH) を用いて、95°C、10 分間反応させた後、94°C、30 秒、60°C、30 秒、72°C、1 分間の反応を 25 サイクル行い、72°C、7 分間の反応停止後、4°C に保存した。

次に、この反応産物各 1 μL を鋳型として、SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて表 10 に示した反応液を調整し、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific Inc.) により qRT-PCR 反応を行った。反応条件は、95°C、10 分間反応後、95°C、15 秒、60°C、1 分間を 40 サイクルとした。プライマーは 1 回目の RT-PCR 反応で用いた表 9 と同じものを使用した。

#### V-2-7. スタンダード系列 template DNA による検量線の作成

本研究では、各標的遺伝子の発現が確認されたサンプルの RT-PCR 産物を用いてスタンダード系列を作製し、検量線を作成した。スタンダード系列の作製

は次に示す通りである。RT-PCR 産物を Microcon 100 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)で精製した後、Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて濃度を測定し、最終濃度が  $10^1 \sim 10^7$  コピー/ $\mu\text{L}$  になるよう Tris-EDTA buffer を用いて希釈系列を作製し標準サンプルとした。各標的遺伝子の標準サンプルを用いて V-2-6 と同様に snqRT-PCR 反応を行って検量線を作成し、検体個々の各標的遺伝子の発現量を求めた。さらに内因性コントロールとして測定した GAPDH mRNA の発現量で各標的遺伝子の発現量を標準化した。

#### V-2-8. 免疫組織化学

各標的分子の蛋白発現は、免疫組織化学により検討した。4  $\mu\text{m}$  の切片を薄切してシランコーティングしたスライドガラスにマウントした。脱パラフィン後、抗原賦活化を行った。使用した 1 次抗体と希釈倍率、抗原賦活化法は表 11 に示した通りであった。

抗原賦活化後、ヒストステイナー (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)を用いて染色を行った。

- ①3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの除去を行った (室温、5 分間)。
- ②水洗後一次抗体と反応させた (室温、30 分間)。
- ③Phosphate buffered saline (PBS) により洗浄した。
- ④ポリマー二次抗体 (シンプルステイン Max PO Multi, Nichirei Bioscience) と反応させた (室温、30 分間)。
- ⑤PBS により洗浄後、3,3-diaminobenzidine (DAB)にて発色させた (室温、10 分間)。
- ⑥PBS により洗浄後、ヘマトキシリンで対比染色を行い、洗浄後に透徹、封

入した。

免疫組織化学の評価は 2 名の病理専門医とともに、腫瘍細胞中の陽性細胞の数の割合を示す **proportion score (PS)** を用いて行った。陽性細胞がない場合は score 0、10 %未満の場合は score 1、10-50 %は score 2、51-80 %は score 3、80% より多い場合は score 4 とした。また、免疫組織化学の評価は、**snqRT-PCR** の結果や臨床情報などを伏せて盲検的に行った。

#### V-2-9. 統計解析

各遺伝子発現量と肺癌の組織型、臨床病期、予後との関係は、**Mann-Whitney U** 検定を用いて解析した。免疫組織化学によるスコアと遺伝子発現量の関係は、スピアマンの順位相関解析を行った。これらの検定は、**SPSS Statistics version 20.0 (IBM)** を用いて行った。

### V-3. 結果

#### V-3-1. Snq RT-PCR 法による遺伝子発現量の解析可能域の向上

本研究では、微小な肺生検検体からの遺伝子発現定量解析を可能にするため、**snqRT-PCR** 法による高感度化を試みた。検討の結果、通常の **qRT-PCR** 法では、初期濃度が  $10^4$  コピー/ $\mu\text{L}$  から  $10^7$  コピー/ $\mu\text{L}$  の mRNA 量まで定量することが可能であったが、**snqRT-PCR** 法では、 $10^1$  コピー/ $\mu\text{L}$  から  $10^7$  コピー/ $\mu\text{L}$  の mRNA 量を定量することが可能であった (図 6-A)。また、**snqRT-PCR** 後の反応産物はアガロースゲル電気泳動により、各々特異的であることが示された (図 6-B)。

### V-3-2. 免疫組織化学

本研究では、肺生検の FFPE 検体から snqRT-PCR 法により定量した mRNA 量と免疫組織化学による評価の相関についても検討を行った。陽性症例の割合と、各症例中の陽性細胞の割合 (PS) を表 12 に示した。肺腺癌では、CK7、CK18、TTF-1 の陽性症例数がそれぞれ、90.9%、100%、66.7%で、各々の PS はいずれも肺扁平上皮癌と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。肺扁平上皮癌では、CK5/6 と CK14 の陽性症例数がそれぞれ、100%、100%で、各々の PS はいずれも肺腺癌と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。肺小細胞癌では CK7、CK18、TTF-1 の陽性症例数はそれぞれ、12.5%、12.5%、50.0%であった。陽性となる蛋白は肺腺癌と同じであったが、その染色強度は肺腺癌よりも弱かった (図 7)。

各蛋白質の免疫組織化学による染色像を図 4 に示した。肺腺癌では、CK7 と CK18 が細胞質に高発現し (図 7-A, B)、CK19 は細胞質に (図 7-C)、TTF-1 は肺腺癌細胞の核への発現が認められた (図 7-D)。肺扁平上皮癌では、CK5/6 と CK14 の細胞質への高発現が認められた (図 7-E, F)。非腫瘍性の組織では、CK5/6、CK7、CK18、CK19 は、気道上皮細胞と気管支腺細胞に発現しており、特に CK5/6 と CK18 が気道上皮細胞に過剰発現していた (図 7-G, H)。肺胞上皮細胞では CK7 と CK18 が高発現していた (図 7-I, J)。CK7 と CK18 は、気管支腺細胞の細胞質にも発現を認めたが、CK5/6 と CK19 は細胞質に弱発現が認められた。また、肺癌における CK20 陽性所見は、消化器癌からの転移を鑑別するために重要であるが、本研究で用いた肺癌症例は全て陰性であり、原発性肺癌であることが確認された (結果未記載)。

### V-3-3. 免疫組織化学 (IHC) による発現と mRNA 発現量の相関

免疫組織化学による CK5/6、CK7、CK14、CK18、TTF-1 発現の PS と各標

的分子の mRNA 発現量の関係を検討した結果、細胞質に染色像を示す CK5/6、CK7、CK14、CK18 は、IHC による PS と mRNA 発現量が有意に相関することが示された (表 13)。一方、核に発現を示す TTF-1 は PS と mRNA 発現量の間に関連を認めなかった。サイトケラチン (CK) 20 については IHC 同様、mRNA 発現も全例陰性であることが示された (結果未記載)。

#### V-3-4. 肺腺癌と肺扁平上皮癌における mRNA 発現の違い

本研究において、肺生検の FFPE 検体から腫瘍細胞のみをマイクロダイセクトして CK6、CK7、CK14、CK18、CK19、TTF-1 の mRNA 発現量を snqRT-PCR 法を用いて定量した結果を図 8 に示した。肺腺癌における CK7、CK18、TTF-1 mRNA の発現量は、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、正常肺組織と比較して有意に高発現であった ( $P < 0.05$ )。肺扁平上皮癌では、CK6、CK14 mRNA の発現量が他と比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。CK5/6、CK7、CK18 は IHC では正常細胞にも発現が認められたが、各々の mRNA 発現量は腫瘍サンプルと比較して低値であった。

#### V-3-5. 免疫組織化学 (IHC) と mRNA 発現量による肺癌組織型鑑別の感度と特異度

従来から行われている CK サブタイプと TTF-1 を標的とした IHC による肺癌組織型鑑別と、これらの mRNA 発現量による鑑別の感度と特異度を比較し、表 14 に示した。mRNA 発現量による評価はカットオフ値を 0.1 として解析した。特に問題となる腺癌と扁平上皮癌の鑑別について検討した結果、IHC による方が mRNA 定量よりも感度は高く、一方、特異度は mRNA 定量による方が高い傾向を示した。TTF-1 mRNA の定量は感度、特異度ともに低く、TTF-1 IHC

に比較して組織型鑑別マーカーとして適さなかった。

#### V-3-6. サイトケラチンサブタイプの遺伝子発現量と肺癌の悪性度の関係

本研究では、サイトケラチンサブタイプの発現量と肺癌の悪性度の関係を調べるため、予後因子として重要とされている各症例の臨床病期との関係を解析した。肺腺癌では、CK7 と CK18 の mRNA 発現量は、I 期の段階ではより進行した癌よりも低値を示したが、有意な差は認められなかった (図 9-A)。肺扁平上皮癌における CK6 と CK14 の mRNA 発現量は IV 期で最も高く、他の病期よりも有意に高値であることが示された (図 9-B)。

肺腺癌の各症例のサイトケラチン mRNA 発現量と、臨床病期、予後の関係を表 15 に示した。肺腺癌では、CK18 mRNA 発現量は、臨床病期 III 期と IV 期の間には有意な差は認められなかったが、特に III 期の死亡例と生存例の間に有意な差が認められた ( $P=0.02$ )。CK7 mRNA 発現量は、肺腺癌症例の臨床病期と予後のいずれにも有意な関係は認められなかった。

次に肺扁平上皮癌の各症例のサイトケラチン mRNA 発現量と、臨床病期、予後の関係を表 16 に示した。肺扁平上皮癌では、III 期と IV 期の症例の予後と CK6 mRNA 発現量の有意な関係が認められた ( $P=0.02$ ) が、CK14 mRNA 発現量との関係は認められなかった。

#### V-4. 小括

肺生検検体は微小なために、組織型鑑別に必要な形態学的評価や複数の免疫組織化学を施行することが困難な量的問題があった。実験 I では、高感度な遺伝子発現定量解析手法を構築することによって、微小な肺生検の FFPE 検体からも標的 mRNA 発現量を定量することが可能となった。本法を用いて、肺生検検

体からも、CK サブタイプ mRNA 発現量を定量することで肺癌の組織型を特異的に鑑別できることが示された。また、免疫組織化学で陽性と評価される蛋白質も、mRNA レベルで定量するとばらつきがあり、肺腺癌における CK18 mRNA、扁平上皮癌における CK6 mRNA 発現量は、3 年以内の死亡例で特に高値を示した。肺腺癌における CK18 mRNA の発現量は臨床病期の進行に伴って上昇するものの、IV 期の症例では症例間差が大きく、高値を示すものは予後不良であった。これらの結果から、CK18 mRNA 高発現は、進行肺腺癌の悪性度に関与している可能性が示唆され、CK18 mRNA 高発現の意義について検討が必要と考えた。



## VI 実験 II

### VI-1. 目的

進行肺腺癌組織における CK18 mRNA の高発現の意義として、予後との関係および高発現因子について検討し、CK18 mRNA 高発現と進行肺腺癌の悪性度との関係について明らかにすることを目的とした。

### VI-2. 方法

#### VI-2-1. 肺生検 FFPE 検体よりマイクロダイセクトした腫瘍細胞からの DNA の抽出

①DNA抽出液を調整した。Sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.125 g を RNase free 水 13 ml に懸濁し、60°Cの温浴槽中で完全に溶解させた。0.5 M Tris-HCl (pH8.0) 0.5 ml、0.5 M EDTA (pH8.0) 1.25 ml、1 M NaCl 2.5 ml を添加し、RNase free 水で全量 25 ml とした。使用まで室温で保存した。

②LMD 法でキャップに標的細胞を回収したチューブに DNA 抽出液 200  $\mu$ l とプロテアーゼ K 5  $\mu$ l を分注し、キャップを閉めて攪拌後 55°C に静置した。

③中性飽和フェノール (pH8.0) 100  $\mu$ l、クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) 100  $\mu$ l を添加して攪拌後遠心した (室温、15,000 rpm、10 分間)。

④上部の液層を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、回収された液層に対して 1/2 量の 7.5 M 酢酸アンモニウム、2 倍量の 100%エタノール、1  $\mu$ l グリコーゲンを加えて転倒混和し、-20°C で 30 分間静置した。

④4°C、15,000 rpm で 30 分間遠心し、上清除去後乾燥させた。

⑤5  $\mu$ l の TE buffer で溶解させた後、使用まで 4°C で保存した。

## VI-2-2. Quenching probe 法によるドライバー遺伝子変異の検出

本研究では、FFPE 検体からの変異 DNA の解析に関しても、より高感度な方法を構築するため、これまで、血液検体からの変異 DNA 解析に使用されていた quenching probe (QP) 法を応用する試みを行った。QP 法は、プライマーと quenching probe を用いて PCR 反応を行い  $T_m$  値解析を行うと、probe の配列に完全に一致しない配列が検出された場合、DNA の 2 本鎖が 1 本鎖に融解する温度 ( $T_m$  値) が異なることを利用し、1 塩基の点突然変異も高感度に検出できる方法である[21]。DNA の二本鎖が一本鎖に解離した時にプローブから蛍光色素が遊離することによって蛍光検出される。また、図 10 に示したように、標的変異配列に相補的なプローブを用いた場合は、野生型の配列との塩基配列のミスマッチが生じる。各々の  $T_m$  値解析を行うと、ミスマッチが生じている野生型の配列は、低い温度で二本鎖から一本鎖への融解が蛍光量として検出され、パーフェクトマッチとなっている標的変異配列の場合は、ミスマッチ配列よりも高い温度で二本鎖から一本鎖への融解を示す蛍光量が検出され、両者は蛍光量のピークが生じる温度 ( $T_m$  値) の違いによって評価される。本法は遺伝子変異や single nucleotide polymorphism (SNP) を迅速、簡便に検出できる方法として着目されている。肺癌への応用では、血漿遊離 DNA を用いた epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) 耐性遺伝子変異の検出に有用であるとの報告[22]があるが、FFPE 検体にも応用されてきている。本法を用いて、非小細胞肺癌のドライバーとして重要な EGFR exon 19 欠失、EGFR exon 21 L858R 変異、kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) codon12, 13 変異、BRAF V600E 変異の検出を行った。方法は、次の通りであった。

- ① i-densy Pack UNIVERSAL (ARKRAY) に EGFR、KRAS、BRAF の標的遺伝子変異を検出するために作製したプローブ、プライマー混合液を 25  $\mu$ L 分注した。プローブ、プライマーの配列は表 17 に示した通りであった。
- ② で調整した DNA 溶液を 4  $\mu$ L 分注した。
- ③ i-densy5320 (ARKRAY) を用いて PCR 反応と Tm 値解析を行った。

### VI-2-3. 免疫組織化学による ALK 融合遺伝子の検出

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子は、2007 年に Soda, Mano らにより非小細胞肺癌のドライバーとして発見された [6]。融合相手は Echinoderm microtubule associated protein like 4 (EML4)、kinesin family member 5B (KIF5B) など様々であるが、coiled-coil ドメインを有する遺伝子との融合により、3'側に存在する ALK チロシンキナーゼが活性化される (図 11)。このため、ALK-TKI が分子標的薬として有効であり、非小細胞肺癌における ALK 融合遺伝子の検出はコンパニオン診断として重要となっている。ALK 融合遺伝子の発現によって活性化される 3'側の ALK 蛋白質が過剰発現することから、高感度免疫組織化学 (図 12) によって ALK 融合遺伝子の有無を検出できる。そこで、本研究においても、高感度免疫組織化学による ALK 融合遺伝子の検出を行った。方法は、以下の通りである。

- ① 対象の FFPE 組織より 4  $\mu$ L の切片を薄切した。
- ② 脱パラフィン後、ALK iAEP キット (ニチレイバイオサイエンス) に付随する抗原賦活化液を調整し、98°C の温浴槽に 40 分間精置した。
- ③ 常温まで放置した後、PBS で洗浄し、3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの除去を行い (室温、5 分間)、PBS で洗浄した。

- ④ 1次抗体（抗ALKモノクローナル抗体 クローン5A4、ニチレイバイオサイエンス）を反応させた（室温、30分間）。
- ⑤ PBSで洗浄後、ブリッジ試薬（ALK iAEPキット、ニチレイバイオサイエンス）を反応させた（室温、15分間）。
- ⑥ PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識エンパワー試薬（ALK iAEPキット、ニチレイバイオサイエンス）を滴下し、室温で30分間反応させた。
- ⑦ PBSで洗浄後、DABにより発色させた（室温、10分間）。
- ⑧ 精製水で洗浄後、ヘマトキシリンで対比染色を行い、流水洗浄した。
- ⑨ 脱水、キシレンによる透徹後、封入し、顕微鏡下で観察した。
- ⑩ 陽性対照として、Anaplastic lymphomaの組織切片を用いた。
- ⑪ 評価は2名の病理専門医とともにを行い、核は陰性で細胞質のみ均一に染色されている場合を陽性とした。

#### VI-2-4. DNAダイレクトシーケンス法による遺伝子塩基配列の確認

VI-2-1で調整したDNA溶液から1  $\mu$ Lを鋳型として、AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてAC808 (ASTEC) によりPCRを行った。表18に示した通り、反応液を0.2 mLチューブに調整し、サーマルサイクラーPC808 (ASTEC) を用いて、95°C 10分間反応させた後、94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 1分間の反応を25サイクル行い、72°C 7分間の反応停止後、4°Cに保存した。各PCR産物5  $\mu$ LにゲルローディングDye (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) 1  $\mu$ Lを添加してよく混和し、2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。SYBR Green I (Takara Bio Inc.)を用いてゲル染色を行い、蛍光下でバンドを可視化した。バンドが単一であり、非特異バンドがないことを確認した後、残りのPCR産物20  $\mu$ LをMicrocon 100 (Takara

Bio Inc.) を用いて精製し NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて DNA 濃度を測定した。

次に BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてシーケンス反応を行った。表 19 の通り反応液を調整し、PC808 (ASTECH) を用いて 96°C 1 分の後、96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分を 25 サイクル行い、4°C で保管した。シーケンス反応産物は、BigDye Terminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて精製し、20  $\mu$ L を ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) で塩基配列解析を行った。

#### VI-2-5. snqRT-PCR 法による EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現の定量解析

実験 I で調整した各症例の cDNA を用いて、snqRT-PCR 法により EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現として、MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (cMET)、phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (PI3K)、v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1)、mechanistic target of rapamycin (mTOR)、Janus kinase 1 (JAK1)、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)、Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)、Ras homolog family member A (RhoA) mRNA の発現定量解析を行った。snqRT-PCR 反応は実験 I に準じて行い、実験 I と同様に作製したプライマーを用いた (表 20)。発現量は、GAPDH mRNA の発現量に対する割合として  $\Delta \Delta$ Ct 法[23]により求めた。

#### VI-2-6. 統計解析

CK18 mRNA 発現量と予後との関係は、カプラン・マイヤー法の log-rank 検

定を行った。CK18 mRNA 発現量と症例の年齢、性別、喫煙率、病期、また、ドライバー遺伝子変異の有無との関係はピアソンの  $\chi^2$  検定を行った。CK18 高発現群、低発現群、また非悪性群における遺伝子発現量の差の有意性については、Mann-Whitney の U 検定を行った。今回検討した標的遺伝子の mRNA 発現の CK18 高発現への関与について、重回帰分析を行った。これらの統計解析は、SPSS Statistics version 20.0 (IBM)を用いて行った。

### VI-3. 結果

#### VI-3-1. 進行肺腺癌における CK18 mRNA 発現量と予後

今回検討した肺腺癌症例における CK18mRNA 発現量の中央値を用いて、高発現群と低発現群に分類し、予後をカプラン・マイヤー法で比較した結果を図 13 に示した。CK18 高発現群、低発現群の生存期間の中央値は各々 342.7 日、932.9 日で、CK18 高発現群は有意に予後不良であった ( $P=0.01$ )。

#### VI-3-2. QP 法による EGFR 変異ならびに KRAS 変異の検出結果

本研究で用いた QP 法による EGFR ならびに KRAS 遺伝子変異の結果は、図 14 に示した通り、野生型と異なる Tm 値のピークとして検出された。陽性症例について各々塩基配列解析を行った結果は、図 14 に示した通り、QP 法の結果に一致した。

#### VI-3-3. ALK 融合遺伝子の検出結果

陽性対照とともに行った (図 15-A, C) ALK 免疫組織化学の結果、対象症例中の ALK 融合遺伝子陽性症例は 1 例であり、活性化された ALK 蛋白質は細胞質

に瀰漫性に染色された (図 15-B)。DNA ダイレクトシーケンス法による塩基配列解析の結果、本症例は EML4 exon13/ALK exon 20 であることが示された (図 15-D)。

#### VI-3-4. 対象肺腺癌症例におけるドライバー変異の状態と臨床病理学的因子

対象症例の肺腺癌細胞におけるドライバー変異の有無を検討した結果、EGFR 遺伝子変異陽性症例は 18.0%、KRAS 遺伝子変異陽性症例は 13.0%、ALK 融合遺伝子陽性症例は 1.0%であった。各々のドライバー変異を有する症例の臨床病理学的因子の状態を表 21 に示した。CK18 発現を高発現群と低発現群に分類した結果、年齢、性別、喫煙、病期、またドライバー変異との間に有意な関係は認められなかった (表 22)。

#### VI-3-5. CK18 発現量と EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現量の関係

CK18 発現量で二群に分類した肺腺癌症例と非悪性上皮細胞における EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現量を測定した結果を表 23 に示した。非悪性上皮細胞と比較すると、CK18、Her2、RhoA、CK7、TTF-1 は癌で高値を示す傾向が示された。一方、c-MET は非悪性上皮細胞の方が高値を示す傾向が示された。今回定量した EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現量の CK18 mRNA 高発現への寄与について検討するため多変量解析を行った結果、CK18 発現量に対する PI3K 発現量の関与が示された ( $P=0.011$ 、表 24)。CK18 発現量と、PI3K、JAK1、Her2、CK7、RhoA 発現量の間に関係が示された。

#### VI-4. 小括

実験 II では、肺腺癌に特異的であり、かつ進行肺腺癌の悪性例で高発現を示

した CK18 mRNA の意義について検討した。この結果、CK18 mRNA 高発現は進行肺腺癌患者の生存期間を有意に短縮し、予後因子であることが示された。CK18 mRNA 高発現因子について検討した結果は、肺腺癌の主要なドライバー変異や増殖因子受容体シグナル伝達とは関係が認められず、PI3K 発現との強い相関ならびに RhoA 高発現との関係が示された。切除不能な進行癌の予後は抗癌剤治療の反応性に依存すると考えられる。増殖シグナルよりも、細胞膜や細胞骨格に関連する PI3K や RhoA の高発現との関係が示されたことから、進行肺腺癌では、CK18 mRNA を含む細胞骨格に関連する分子の発現が症例間で異なること、さらに、これらの高発現は治療抵抗性因子として予後に関与している可能性が示唆された。



## VII. 考 察

非小細胞肺癌の診療においては、薬物治療に対する効果と副作用に関する知見から、腺癌か扁平上皮癌かという病理組織学的分類が極めて重要となっている [24]。しかしながら、進行肺癌は切除不能な場合が多いため、腫瘍全体が摘出される手術検体と比較すると、約 1 mm 四方と微小な生検検体を得ることしかできず、しばしば十分な病理組織学的検索を行うことが困難となる。組織構築を形態学的に評価することや、組織特異的な複数のマーカーを用いて免疫組織化学を行うことが困難となり、病理組織診断に限界が生じた結果、非小細胞肺癌の疑い、さらには悪性腫瘍疑いに留まる場合もあり、患者の治療計画に遅れを来すことが懸念されてきた。進行肺癌では患者の状態が悪い場合も多く、速やかに治療を開始できるよう迅速な治療方針の決定は重要である。

本研究では、微小ではあるが、患者個々の腫瘍細胞を含む貴重な検体である肺生検検体からの高感度遺伝子発現解析手法を構築し、その有用性を検討した。本研究で対象とした肺生検検体は、微小であるという点と、ホルマリン固定されているという点が遺伝子発現解析には非常に不利な点である。これまで、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体は遺伝子解析に不向きとされてきたが、多くの検討の結果、制限はあるが遺伝子解析が可能であるとの報告がなされている [25-31]。しかしながら、mRNA については、ホルマリン固定による断片化が顕著なことから、さらに解析が困難とされてきた。これまで様々な細胞が混在する組織切片において標的細胞の mRNA 解析を行うための LMD 法の有用性を報告してきた [32-35]が、本研究では、病理組織検体として最も小さい肺生検検体より LMD 法で回収したさらに微量な腫瘍細胞検体から、mRNA の定性解析ではなく、定量解析を成功させるための試みとして、snqRT-PCR 法の

応用を検討した。これまで、snqPCR 法や、snqRT-PCR 法は、微量な臨床検体を用いたメチル化 DNA 解析 [36] や、血漿および口腔スワブからの微生物 DNA の検出 [17, 18] の高感度化への有用性が述べられている。本研究で行った微小な FFPE 検体からの mRNA 定量解析への応用は、これまで報告がなく、本研究が初めての試みである。本研究の結果、微小 FFPE 肺生検検体からの snqRT-PCR による mRNA 発現定量解析では、従来の qRT-PCR 法と比較して  $10^3$  倍感度が上昇することが示された。本法による mRNA 発現量での組織型の鑑別能について感度と特異度を免疫組織化学と比較すると、感度では免疫組織化学の方が優れていたが、特異度は mRNA 発現定量解析が優れていた。病理組織学的検索で従来から行われている免疫組織化学では、抗原となる蛋白質の存在を高感度に検出するため、複数の標的蛋白質をパネルで使用する有用性は非常に高いが、解析対象となる標的マーカーの数に応じて組織を薄切して各々染色しなければならず、量的な問題から肺生検では実施困難となる。この問題に対して、本法では肺生検検体であっても、1-2 枚の切片から抽出した RNA より、蛋白質発現状態を予測し得る複数の mRNA 発現を一度に定量可能であることが示された。本法により、従来の方法では組織型鑑別に至らなかった症例の肺癌組織型を特異的に鑑別できることが期待される。

非小細胞肺癌の組織型鑑別に有用な標的分子として、本研究の結果、有意性が示された CK18 mRNA および CK6 mRNA の snqRT-PCR 法による発現定量解析は、肺腺癌ならびに肺扁平上皮癌の組織型鑑別のみならず予後を予測し得た。免疫組織化学では、これらの標的蛋白質は非腫瘍性気管支上皮細胞にも発現が認められたが、mRNA 発現量は腫瘍細胞で有意に高発現であり、臨床病期の進行に従って発現量が増加する傾向も示された。扁平上皮癌における CK6 mRNA 発現量は臨床病期の進行にともなって有意に増加したが、肺腺癌におけ

る CK18 mRNA 発現量は IV 期の腫瘍細胞ではばらつきが認められ、CK18 mRNA 高発現群は低発現群に比較して生存期間が短く有意に予後不良であることが明らかとなった。

サイトケラチン 18 は、正常の上皮細胞に広く分布しており、CK8 との結合によって増殖因子として細胞内シグナル伝達に関与していると報告されている [14, 37]。また、癌の血清マーカーとしての有用性や健常人に比較して非小細胞肺癌患者では血漿中の CK18 が上昇することも報告されている [38]。このように、CK18 蛋白質は、様々な癌細胞で高発現していることが示唆されているが、患者個々の病理組織における発現と予後の関係はこれまで報告されていない。本研究においても、免疫組織化学では肺腺癌症例はいずれも CK18 蛋白質が高発現しており、予後との関係を解析するには至らなかった。近年の免疫組織化学技術では、より高感度に発色させる方法が用いられているため、抗原蛋白質の定量性はなく定性的な評価となるためと考えられる。しかしながら、本法により腫瘍細胞特異的な CK18 mRNA 発現量を定量した結果、免疫組織化学により蛋白陽性となる症例の間には mRNA 発現量の差異があることが認められ、特に、進行肺腺癌における CK18 mRNA の発現量は、患者の生存期間に有意な関係を示し、予後因子となることが示唆された。免疫組織化学で腫瘍の鑑別に有用とされた CK サブタイプについて、患者の腫瘍組織における mRNA 発現量を定量することで、予後との関係を明らかにしたのは本研究が初めてである。

進行肺癌の予後は、早期発見例での外科的根治術後の予後とは異なり、抗癌剤などの治療の反応性に依存すると考えられる。癌細胞の細胞骨格と癌の薬物治療の反応性については、細胞膜蛋白質や糖蛋白質の過剰発現が、プラチナ系抗癌剤の細胞核内への取り込みを低減させることによって薬剤耐性を示すことが報告されている [39, 40]。今回、肺腺癌における CK18 高発現群で有意に

予後不良であったことから、CK18 mRNA 発現亢進および CK18 蛋白質の細胞質内過剰発現あるいは異常蓄積も抗癌剤の細胞内への取り込みに対する阻害因子となっている可能性がある。細胞骨格ケラチンの糖鎖付加の亢進は上皮細胞を障害から保護するという報告もある[41]。

では、進行肺腺癌において CK18 の発現を亢進させる因子は何か。本研究では、さらに、近年、肺腺癌の増殖・進展の理解に不可欠とされる EGFR シグナル伝達経路のドライバー変異との関係について検討を行った。この結果、肺腺癌の主要なドライバーとして着目されている EGFR 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子の有無と CK18 mRNA の高発現とは関係が認められなかった。ドライバー変異に関連して、非小細胞肺癌の治療では、近年、分子標的治療が進んでおり、EGFR 遺伝子変異を有する患者には EGFR-TKI であるゲフィチニブやエルロチニブが、ALK 融合遺伝子陽性症例にはクリゾチニブやアレクチニブが推奨され、効果を奏している。本研究では、CK18 mRNA 発現量について検討を行ったが、これらの分子標的治療の奏功性は、薬剤の標的分子としてのドライバー遺伝子変異の有無に応じており、CK18 mRNA 発現量との関係は認められなかった。

他の腫瘍では、CK8/18 は human papilloma virus (HPV) E6/E7 や Ras など様々な癌遺伝子によって活性化され、前駆細胞での発現が示されたことから、前癌病変の進展に関与している可能性が報告されている [42, 43]。また、通常は翻訳後修飾として CK18 蛋白質がリン酸化すると、ユビキチン化が誘導されて代謝される[44, 45]が、多くの上皮系腫瘍で CK18 が蓄積していることも知られており、前癌病変で nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox) 1 による CK18 蛋白質の蓄積が癌への進展に関与している可能性が報告されている[46]。本研究において、CK18 mRNA 高発現因子について検討した結

果、増殖因子受容体シグナル伝達経路との関係は示されず、PI3K mRNA、RhoA mRNA 発現、ならびに Her2 mRNA 発現との強い相関が示された。Nox 1 のサブユニットに Rho ファミリーG 蛋白質が含まれることから、前癌病変の進展だけではなく、本研究で検討した進行肺腺癌においても RhoA の高発現に示唆される Nox1 の亢進が CK18 の高発現あるいは蓄積を誘導して悪性化に関与している可能性も考えられた (図 16)。また、CK18 高発現は、肺腺癌で重要とされる EGFR シグナル伝達系との直接の関係は認められなかったが、EGFR のサブタイプである Her2 との共発現が示されたため Her2 のリガンド刺激による PI3K の発現亢進から RhoA を介した CK18 の活性化の可能性も考えられ (図 16) た。さらに PI3K は細胞膜構成成分であるイノシトールリン脂質のリン酸化を媒介する脂質キナーゼであり、CK18 mRNA の高発現に強く関与していたことから、CK18 の高発現は細胞膜蛋白質の過剰発現に伴って、抗癌剤の核への浸透性を阻害するような薬剤耐性因子となっている可能性も示唆され (図 16) た。これらの機序の検証と薬剤耐性因子を含めた進行肺腺癌の悪性化に関するキーマルを明らかにすることは、薬物療法の効果改善のための補助療法の可能性を見出す今後の課題である。

これまで、進行肺癌における CK18 高発現の機序や、CK18 高発現と悪性度との関係については明らかとなっていなかったが、この原因として、進行癌の状態を培養細胞系で再現することが困難であること、臨床研究では微小な生検検体の解析が困難であったことが考えられ、本研究により構築した肺生検検体からの高感度遺伝子発現解析方法は、進行肺癌における患者の病態と癌細胞の状態を *in vivo* で理解するための方法としての有用性が期待される。

## VIII 結 語

本研究により、snqRT-PCR 法は、微小な肺生検から、高感度に複数の遺伝子発現定量解析を可能とすることが明らかとなった。これにより、従来の病理組織学的手法では鑑別困難な場合が多かった肺生検検体からも組織型鑑別が可能となり、進行肺癌の治療法選択への有用性が示された。さらに本研究により明らかとなった CK18 mRNA の高発現は進行肺腺癌の予後因子となること、また、CK18 発現は肺腺癌のドライバー変異による EGFR シグナル伝達経路の活性化とは異なり、細胞膜リン脂質の活性化や酸化還元調節に関係して高発現し、抗癌剤に対する治療抵抗性因子となっている可能性が示唆された。進行肺癌の予後因子として、CK18 高発現に関与する細胞膜および細胞骨格関連蛋白質の高発現と治療抵抗性との関係についてはさらに検討を継続し、治療抵抗性を解除する補助療法の可能性を探りたい。

## 文 献

1. 平成 26 年我が国の人口動態. 厚生労働省大臣官房統計情報部
2. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011; 12:175-80.
3. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol.* 2003; 21:2237-46.
4. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004; 304:1497-500.
5. 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.



6. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363:1693-703.
7. Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 32: 22-31.
8. Vijay BOGGARAM. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clinical Science.* 2009; 116, 27–35.
9. Rodoriguez EL, Gil JP. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy. *BBA.* 2014; 1838:1568-1585.
10. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.* 2001; 40: 403-439.
11. Mukhopadhyay S, Katzenstein ALA. Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens: Utility of an Immunohistochemical Panel Containing TTF-1, Napsin A, p63, and CK 5/6. *Am. J.*



*Surg. Pathol.* 2011; 35: 15-25.

12. Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR: p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 2004; 18: 126-131.
13. Nobre AR, Albergaria A, Schmitt F. p40: a p63 isoform useful for lung cancer diagnosis - a review of the physiological and pathological role of p63. *Acta Cytol.* 2013; 57:1-8.
14. Iwatsuki H, Suda M. Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function. *Acta Histochem. Cytochem.* 2010; 43:19-31.
15. Linder S, Olofsson MH, Herrmann R, Ulukaya E. Utilization of cytokeratin-based biomarkers for pharmacodynamic studies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010; 10:353-9.
16. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J. Thorac. Oncol.* 2010; 5: 442-447.
17. Pasternak AO, Adema KW, Bakker M, Jurriaans S, Berkhout B, Cornelissen M, Lukashov VV. Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 2206-2211.
18. Saini R, Santhanam J, Othman NH, Saini D, Tang TH. Single-tube seminested PCR

- assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *The Open Microbiol. J.* 2009; 3: 106-112.
19. Imai K, Ishihara R, Jayawardane GW, Nishimori K, Nishimori T. Development of a shuttle polymerase chain reaction for the detection of bovine herpesvirus 2. *J Vet Med Sci.* 2002; 64:953-956.
20. SYBR® Green I を用いたリアルタイム PCR の検討. TAKARA BIO INC. [http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100004190](http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004190)
21. Ureshino N, Aragane N, Nakamura T, Ide M, Mochinaga S, Fukushima N, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S. A fully integrated and automated detection system for single nucleotide polymorphisms of UGT1A1 and CYP2C19. *Oncol Res.* 2011; 19:111-4.
22. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, Ureshino N, Hayashi S, Hosomi T, Hirai M, Sueoka E, Kimura S. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol.* 2011; 6:1639-48.
23. Macabeo-Ong M, Ginzinger DG, Dekker N, McMillan A, Regezi JA, Wong DTW. and Jordan RCK. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis. *Mod. Pathol.* 2002; 15: 979-987.
24. Rossi G, Pelosi G, Graziano P, Barbareschi M, Papotti M. A reevaluation of the

- clinical significance of histological subtyping of non-small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int. J. Surg. Pathol.* 2009; 17: 206-18.
25. Burgemeister R. Nucleic acids extraction from laser microdissected FFPE tissue sections. *Methods Mol. Biol.* 2011; 724:117-29.
26. Jacobson TA, Lundahl J, Mellstedt H, Moshfegh A. Gene expression analysis using long-term preserved formalin-fixed and paraffin-embedded tissue of non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 2011; 38:1075-81.
27. Klopffleisch R, Weiss AT, Gruber AD. Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol. Histopathol.* 2011; 26:797-810.
28. Reichmuth C, Markus MA, Hillemmans M, Atkinson MJ, Unni KK, Saretzki G, Hofler H. The diagnostic potential of the chromosome translocation t(2;13) in rhabdomyosarcoma: a PCR study of fresh frozen and paraffin-embedded tumor samples. *J. pathol.* 1996; 180: 50-57.
29. Rupp GM, Locker J. Purification and analysis of RNA from paraffin embedded tissues. *Biotechniques.* 1988; 6: 56-60.
30. Sheils OM, Sweeney EC. TSH receptor status of thyroid neoplasms-- TaqMan

- RT-PCR analysis of archival material. *J. Pathol.* 1999; 188: 87-92.
31. Steinau M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn.* 2011; 13:377-81.
  32. Mizutani G, Nakanishi Y, Watanabe N, Honma T, Obana Y, Seki T, Ohni S, Nemoto N. Expression of somatostatin receptor (SSTR) subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5 in neuroendocrine tumors using real-time RT-PCR method and immunohistochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 2012; 45: 167-176.
  33. Nakanishi Y, Mizutani G, Sano M, Oinuma T, Nemoto N. Comparison of HER2 mRNA amplification with immunohistochemistry in human breast cancer using laser assisted microdissection technique. *Acta Histochem. Cytochem.* 2004; 37: 73-79.
  34. Nakanishi Y, Oinuma T, Sano M, Fuchinoue F, Komatsu K, Seki T, Obana Y, Tabata M, Kikuchi K, Shimamura M, Ohmori K, Nemoto N. Coexpression of an unusual form of the EWS-WT1 fusion transcript and interleukin 2/15 receptor beta mRNA in a desmoplastic small round cell tumour. *J. Clin. Pathol.* 2006; 59: 1108-10.
  35. Ohno C, Nakanishi Y, Honma T, Henmi A, Sugitani M, Kanai Y, Nemoto N. Significance of system L amino acid transporter 1 (LAT-1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) expression in human developing intestines. *Acta Histochem. Cytochem.* 2009; 42: 73–81.

36. Lee JS, Fackler MJ, Lee JH, Choi C, Park MH, Yoon JH, Zhang Z, Sukumar S. Basal-like breast cancer displays distinct patterns of promoter methylation. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 9: 1017-1024.
37. Yamashiro Y, Takei K, Umikawa M, Asato T, Oshiro M, Uechi Y, Ishikawa T, Taira K, Uezato H, Kariya K. Ectopic coexpression of keratin 8 and 18 promotes invasion of transformed keratinocytes and is induced in patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 399:365-72.
38. De Petris L, Branden E, Herrmann R, Sanchez BC, Koyi H, Linderholm B, Lewensohn R, Linder S, Lehtio J. Diagnostic and prognostic role of plasma levels of two forms of cytokeratin 18 in patients with non-small-cell lung cancer. *Eur. J. Cancer.* 2011; 47:131-7.
39. Bernal SD, Speak JA, Boeheim K, Dreyfuss AI, Wright JE, Teicher BA, Rosowsky A, Tsao SW, Wong YC. Reduced membrane protein associated with resistance of human squamous carcinoma cells to methotrexate and cis-platinum. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 95:61-70.
40. Kawai K, Kamatani N, Georges E, Ling V. Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *J. Biol. Chem.* 1990; 265:13137-13142.

41. Ku NO, Toivola DM, Strnad P, Omary MB. Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury. *Nat Cell Biol.* 2010; 12:876-85.
42. Pankov R, Umezawa A, Maki R, Der CJ, Hauser CA, Oshima RG. Oncogene activation of human keratin 18 transcription via the Ras signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:873-7.
43. Pankov R, Neznanov N, Umezawa A, Oshima RG. AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:7744-57.
44. Kulesh DA, Ceceña G, Darmon YM, Vasseur M, Oshima RG. Posttranslational regulation of keratins: degradation of mouse and human keratins 18 and 8. *Mol Cell Biol.* 1989; 9:1553-65.
45. Ku NO, Omary MB. Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J Cell Biol.* 2000; 149:547-52.
46. Sattayakhom A, Ittiwat W, Stremmel W, Chamulitrat W. Redox regulation of cytokeratin 18 protein by NADPH oxidase 1 in preneoplastic human epithelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137:1669-78.

表 1.末梢型小型肺腺癌の組織分類（野口分類）

	肺胞上皮置換性に増殖する腺癌			
低悪性度	Type A :	腫瘍内に線維化巣を認めない(GGOのみ)		
	↓	Type B :	腫瘍内に肺胞虚脱型の線維化巣を認める	含気型
	↓	Type C :	腫瘍内に線維芽細胞の増生巣を認める	
	↓	肺胞上皮非置換性に増殖する腺癌		
	↓	Type D :	充実破壊性に増殖する低分化腺癌	
	↓	Type E :	管状腺癌	充実型
高悪性度	Type F :	肺胞上皮非置換性に増殖する乳頭状腺癌		

表 2. 哺乳類の IF 蛋白質

タイプ	IF proteins
I      Acidic keratin	K9-K28 (cytokeratin), K31-K40 (hair keratin)
II     Basic keratin	K1-K8 (cytokeratin), K71-K80 (cytokeratin), K81-K86 (hair keratin)
III    ホモポリマー状蛋白質	Desmin, Vimentin, Peripherin, Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Syncoilin
IV    神経細胞内 IF	Light neurofilament protein (NF-L), Medium NF (NF-M), Heavy NF (NF-H), $\alpha$ -internexin, Synemin $\alpha$ , Synemin $\beta$ , Nestin
V      核内ネットワーク	Lamin A, Lamin A $\Delta$ 10, Lamin C1, Lamin C2, Lamin B1, Lamin B2, Lamin B3
VI    レンズ、水晶体特異的 IF	CP49(phakinin), Filensin(CP115)



表 3. 正常細胞でのケラチンの発現と組み合わせ

Type II (basic) keratin		発現する正常細胞	Type I (acidic) keratin	
分子量(kD)			分子量(kD)	
		手掌・足底の表皮細胞	CK9	64
CK1	67	角化扁平上皮細胞	CK10	56.5
CK2	65	全ての上皮細胞	CK11	56
CK3	63	角膜上皮細胞	CK12	55
CK4	59	内臓の非角化扁平上皮細胞	CK13	51
CK5	58	基底細胞、筋上皮細胞、中皮細胞	CK14	50
		扁平上皮細胞	CK15	50
CK6	56	増殖期の扁平上皮細胞	CK16	48
CK7	54	単層（腺）上皮細胞	CK17	46
CK8	52	腺基底細胞、筋上皮細胞	CK18	45
		単層（腺）上皮細胞、一部の基底細胞	CK19	40
		胃・腸管の腺上皮細胞、Merkel 細胞	CK20	46

Ann NY Acad Sci 1985;455:282-306

表 4. 癌細胞による CK7 および CK20 の発現パターンの違い

免疫組織化学	癌種
CK7+ / CK20+	膵癌、胆道系癌、移行上皮癌、卵巣粘液性癌、Merkel 細胞癌
CK7+ / CK20-	非小細胞肺癌(非扁平上皮癌)、乳癌、卵巣非粘液性癌、子宮内膜癌、中皮腫
CK7- / CK20+	大腸癌、胃癌など消化器系の癌
CK7- / CK20-	小細胞肺癌、肺扁平上皮癌、前立腺癌、腎癌、肝細胞癌

Histopathology 2002;40:403-439

表 5. 症例のサマリー

Carcinoma samples	
Age (years)	67.5 ± 9.3
male:female (n)	31 :16
Histology (n)	
adenocarcinoma	25
squamous cell carcinoma	13
small cell carcinoma	9
Stage (n)	
I	4
II	4
IIIA	7
IIIB	21
IV	11
Prognosis (n)*	
alive	20
death	22
no information	5
Non-neoplastic samples	
Age (years)	69.2 ± 9.5
Total (n)	
	52

\* Alive: 治療開始から 3 年間の観察期間中の生存例

Death: 治療開始から 3 年以内に死亡した例

表 6. ゲノム DNA 除去反応液の調整

試薬	通常反応量	1/2 反応量
ゲノム DNA Wipe Out	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L
RNA 溶液 + RNase free 水	12 $\mu$ L	6 $\mu$ L
Total	14 $\mu$ L	7 $\mu$ L

表 7. マスターミックスの調整

試薬	通常反応量	1/2 反応量
Primer mix (Oligo dT + random primer : pre mixed)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
QuantiTect RT buffer	4 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Reverse transcriptase	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
ゲノム DNA 除去反応液全量	14 $\mu$ L	7 $\mu$ L
Total	20 $\mu$ L	10 $\mu$ L

表 8. RT-PCR 反応溶液の調整

Component	Final Conc.	Volume/1 tube
2×AmpliTaq Gold® 360 Master Mix	1 ×	10.0 μL
GC enhancer		0.4 μL
10 μM Forward primer	100 nM	0.2 μL
10 μM Reverse primer	100 nM	0.2 μL
D.W.		8.2 μL
cDNA 溶液		1 μL
Total		20 μL

表 9. RT-PCR に使用したプライマー

Target	Forward primer	Reverse primer	Tm* (°C)	Product size (bp)
CK 5	5'-caagttgatgcactgatgg-3'	5'-tcagcgatgatgctatccag-3'	60.0	150
CK 6	5'-gacctggtggaggactcaa-3'	5'-gtaggcagcatccacatcct-3'	60.0	105
CK 7	5'-caggatgtggtggaggactt-3'	5'-ttgctcatgtaggcagcatc-3'	60.0	116
CK14	5'-ggcctgctgagatcaaagac-3'	5'-gtccactgtggctgtgagaa-3'	60.0	83
CK18	5'-gagatcgaggctctcaagga-3'	5'-ctgagattggggcatcta-3'	60.0	126
CK19	5'-ttgagacggaacaggctct-3'	5'-agctcttccttcaggccttc-3'	60.0	128
TTF-1	5'-ctcctgggaatgactggaa-3'	5'-ccaagcaccacgattcttt-3'	60.0	108
GAPDH	5'-ggaaggtgaagtcggagtca-3'	5'-gtcattgatggcaacaatccact-3'	60.0	101

\*  $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[M^{+}]) + 0.41(\%[\text{G}+\text{C}]) - 500/n \dots \textcircled{1}$

M<sup>+</sup>: 一価の陽イオン、n: プライマーの長さ(塩基数)、%[G+C]: GC の割合(%)

多くの PCR 反応系では M<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>もしくは K<sup>+</sup>)の濃度は 50 mM(=0.05 M)と考えられ、

$\log 0.05 = -1.3$  であることから①の式は

$T_m(^{\circ}\text{C}) = 59.9 + 0.41(\%[\text{G}+\text{C}]) - 500/n \dots \textcircled{2}$  として求めた。

表 10. qRT-PCR 反応液の調整

Component	Final Conc.	Volume/ 1 tube
2×SYBR®Green PCR Master Mix	1×	10 $\mu$ L
10 $\mu$ M Forward Primer	100 nM	0.2 $\mu$ L
10 $\mu$ M Reverse Primer	100 nM	0.2 $\mu$ L
D.W.		8.4 $\mu$ L
Template cDNA		1 $\mu$ L
Total		20 $\mu$ L

表 11. 免疫組織化学に使用した 1 次抗体と使用条件

Target	Company	Animal	Clone	Dilution ratio	Antigen retrieval
CK5/6	DAKO	Mouse	D5/16 B4	×100	A.C.(pH 9)
CK7	DAKO	Mouse	OV-TL 12/30	×100	A.C.(C.B.)
CK14	Novocastra	Mouse	LL002	×20	A.C.(C.B.)
CK18	DAKO	Mouse	DC10	×50	A.C.(C.B.)
CK19	DAKO	Mouse	RCK108	×80	A.C.(C.B.)
TTF-1	DAKO	Mouse	8G7G3/1	×200	A.C.(C.B.)

表 12. 肺癌症例の組織型と免疫組織化学陽性症例の割合と各症例中の陽性細胞数の割合

Target	Adenocarcinoma	Squamous cell carcinoma	Small cell carcinoma	Non-neoplastic lung tissue* <sup>1</sup>
CK5/6	5/33 (15.2%) 0.31 ± 0.69	11/11 (100%) *3.00 ± 0.00	0/8 (0%) 0.00	5/5 (100%) 3.00 ± 0.00
CK7	30/33 (90.9%) *2.44 ± 0.98	2/11 (18.2%) 0.45 ± 1.04	1/8 (12.5%) 0.13 ± 0.35	5/5 (100%) 2.60 ± 0.55
CK14	2/31 (6.5%) 0.17 ± 0.46	11/11 (100%) *2.18 ± 0.87	0/8 (0%) 0.00	0/5 (0%) 0.00
CK18	27/27 (100%) *2.81 ± 0.57	6/12 (50.0%) 0.75 ± 0.97	1/8 (12.5%) 0.13 ± 0.35	5/5 (100%) 4.00 ± 0.00
CK19	26/32 (81.3%) 1.57 ± 1.09	6/12 (50.0%) 1.17 ± 1.27	0/8 (0%) 0.00	5/5 (100%) 0.55 ± 1.40
TTF-1	22/33 (66.7%) *1.74 ± 0.46	1/12 (8.3%) 0.08 ± 0.29	4/8 (50.0%) 1.28 ± 1.25	0/5 (0%) 0.00

\* : adenocarcinoma と squamous cell carcinoma を比較して、有意に免疫組織化学スコアが高かった蛋白発現 ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney's U test)

表 13. 免疫組織化学による蛋白発現の PS と mRNA 発現量の相関

Target	IHC score (PS)				Correlation coefficient	P value
	1	2	3	4		
CK5/6	0.03 ± 0.02	No sample	0.04 ± 0.00	3.24 ± 5.43	0.43	0.010*
CK7	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.27	0.10 ± 0.22	11.16 ± 31.6	0.36	0.0015*
CK14	0.03 ± 0.08	0.70 ± 1.55	13.4 ± 20.7	30.13 ± 45.9	0.48	< 0.001**
CK18	0.05 ± 0.06	0.11 ± 0.00	0.24 ± 0.13	5.52 ± 15.7	0.52	< 0.001**
TTF-1	1.58 ± 1.32	No sample	45.3 ± 76.8	339.5 ± 470.8	0.26	0.07

\* $P < 0.05$ 、 \*\* $P < 0.001$



表 14. 免疫組織化学と mRNA 発現量による組織型鑑別の感度と特異度

組織型	マーカー	感度	特異度	
腺癌(AD)	CK18 IHC	1	0.50	
	CK18 mRNA	0.88	1	
	CK7 IHC	0.91	0.82	
	CK7 mRNA	0.44	1	
	TTF-1 IHC	0.67	0.92	
	TTF-1 mRNA	0.88	0.23	
	扁平上皮癌(SQ)	CK6 IHC	1	0.85
		CK6 mRNA	0.69	1
CK14 IHC		1	0.94	
CK14 mRNA		0.80	1	

表 15. 肺腺癌症例の予後と CK7 および CK18 mRNA 発現量の関係

No.	Age	Gender	Stage	Prognosis	CK7 mRNA		CK18 mRNA			
					expression level(/GAPDH)		expression level(/GAPDH)			
1	77	M	I	Alive	0.01		0.02			
2	77	M	II	Alive	5.31		0.28			
3	63	M	III	Alive	0.22	} N.S.	0.19	} P = 0.02*		
4	72	F	III	Alive	0.00		0.27			
5	79	M	III	Alive	0.29		0.07			
6	61	M	III	Alive	0.00		0.00			
7	53	F	III	Alive	0.00		0.81			
8	60	M	III	Alive	0.26		0.47			
9	78	F	III	Dead	0.00		0.86			
10	62	M	III	Dead	0.10		7.73			
11	65	F	III	Dead	36.70		0.27			
12	59	M	III	Dead	0.03		19.43			
13	54	M	III	Dead	5.97		67.60			
14	62	F	III	Dead	0.01		0.29			
15	76	F	III	Dead	0.01		0.70			
16	83	F	IV	Alive	0.00		} N.S.		0.13	} P = 0.08
17	77	F	IV	Alive	15.35				0.04	
18	62	M	IV	Alive	0.00	0.49				
19	68	F	IV	Alive	0.03	0.27				
20	48	M	IV	Dead	0.06	0.25				
21	55	M	IV	Dead	5.66	0.51				
22	67	F	IV	Dead	0.03	0.23				
23	71	M	IV	Dead	0.01	18.00				
24	66	M	IV	Dead	0.00	0.69				
25	69	M	IV	Dead	1.61	2.89				

\* $P < 0.05$ , N.S.: no significant

表 16. 肺扁平上皮癌症例の予後と CK6 および CK14 mRNA 発現量の関係

No.	Age	Gender	Stage	Prognosis	CK6 mRNA	CK14 mRNA
					expression level(/GAPDH)	expression level(/GAPDH)
1	75	M	I	Dead	0.02	37.3
2	74	F	II	Alive	0.11	0.31
3	66	M	II	Dead	2.66	1.75
4	76	M	II	Dead	18.4	106.9
5	62	M	III	Alive	0.01	0.01
6	67	M	III	Alive	0.43	39.1
7	65	M	III	Alive	0.02	0.00
8	70	M	III	Alive	0.03	0.03
9	64	M	III	Dead	2.95	3.48
10	52	M	III	Dead	1.83	2.64
11	64	M	III	Dead	0.19	0.44
12	62	M	IV	Dead	3.12	2.46
13	81	M	IV	Dead	54.6	137.2

\* $P < 0.05$ , N.S.: no significant

表 17. ドライバー変異を検出するためのプライマーとプローブ

Target		Forward primer
EGFR exon21	Forward primer	5'-aggaacgtactggtgaaaacaccgc -3'
	Reverse primer	5'-gcctccttctgcatggtattctttctc-3'
	probe	5'-ttgccccgccccaaatc -3'
EGFR exon19	Forward primer	5'-tctctctgcatagggactc -3'
	Reverse primer	5'-gaaactcacatcgaggatttc -3'
	probe	5'-cccgtcgctatcaaggaattaagagaagc -3'
EGFR exon20	Forward primer	5'-tccaggaagcctacgtgatggccag -3'
	Reverse primer	5'-ccaatattgtctttgttcccggacatagtc -3'
	probe	5'-tgagctgcatgatgaggtgcac-3'
KRAS	Forward primer	5'-aaggcctgctgaaaatgactg-3'
	Reverse primer	5'-ggtcctgcaccagtaatatgca -3'
	probe	5'-ctttgctacgccaccagctccaact -3'
BRAF	Forward primer	5'-tgcttgctctgataggaaaatgagatctac -3'
	Reverse primer	5'-aaactgatgggaccactccat -3'
	probe	5'-gctacagagaaatctc -3'

表 18. PCR 反応溶液の調整

Component	Final Conc.	Volume/1 tube
2×AmpliTaq Gold® 360 Master Mix	1 ×	25.0 μL
GC enhancer		1.0 μL
10 μM Forward primer	100 nM	0.5 μL
10 μM Reverse primer	100 nM	0.5 μL
D.W.		23.0 μL
cDNA 溶液		1 μL
Total		50 μL

表 19. シーケンス反応溶液の調整

Component	Volume/1 reaction
BigDye Terminator ready reaction Mix	4 μL
Template	1-3 ng
Primer	3.2 pM
D.W.	Up to 10 μL
Total	10 μL

表 20. snqRT-PCR 法に使用したプライマー

Target	Forward primer	Reverse primer	Tm* (°C)	Product size (bp)
c-MET	5'-ccagaagtgattgtggagca-3'	5'-tgactgcaggactggaatg-3'	59.8	122
PIK3CA	5'-ctctgcaaaaagccactgt-3'	5'-gccgtaaatcatccccattt-3'	60.4	107
AKT1	5'-gcaccttccatgtggagact-3'	5'-tgagttgtcactgggtgagc-3'	60.1	130
mTOR	5'-ttaatggaggccaagagt-3'	5'-gccttgagattcgtcgaac-3'	60.1	109
STAT3	5'-ggccatcttgagcactaagc-3'	5'-cggactggatctgggtctta-3'	60.0	125
JAK1	5'-tgaagcctgagagtggaggt-3'	5'-attcctccgtcttctgtgc-3'	60.0	122
RohA	5'-cgcttttgggtacatggagt-3'	5'-caagacaaggcaccagatt-3'	60.0	124
Her2	5'-acaaccaagtgaggcaggtc-3'	5'-caggggtgtattgttcagc-3'	60.0	123
GAPDH	5'-ggaaggtgaaggtcggagtca-3'	5'-gtcattgatggcaacaatatccact-3'	60.0	101

\*  $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[M^{+}]) + 0.41(\%[\text{G}+\text{C}]) - 500/n \dots \textcircled{1}$

M<sup>+</sup>: 一価の陽イオン、n: プライマーの長さ(塩基数)、%[G+C]: GC の割合(%)

多くの PCR 反応系では M<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>もしくは K<sup>+</sup>)の濃度は 50 mM(=0.05 M)と考えられ、  
 $\log 0.05 = -1.3$  であることから①の式は

$T_m(^{\circ}\text{C}) = 59.9 + 0.41(\%[\text{G}+\text{C}]) - 500/n \dots \textcircled{2}$  として求めた。

表 21. ドライバー変異と臨床病理学的因子

因子	EGFR 変異	KRAS 変異	ALK 融合遺伝子
年齢 (中央値)	73.6 歳	64.8 歳	53.0 歳
喫煙率	68.8%	91.0%	27.2%
女性の割合	37.5%	27.3%	63.6%
生存期間 (中央値)	16 か月	7 か月	9 か月

表 22. CK18 mRNA 発現量で分類した症例の臨床病理学的因子ならびにドライバー変異の状態

	Mean age	Gender M:F	smoker	Clinical stage	Driver mutation			
					ALK	EGFR	KRAS	BRAF
CK18 High (n=15)	68.6	9:6	80.0%	3.83 (IIB-IV)	0/15 (0%)	4/14 (28.6%)	1/13 (7.7%)	0/13 (0%)
CK18 Low (n=13)	66.8	8:5	76.9%	3.31 (IA-IV)	1/13 (7.7%)	1/9 (11.1%)	4/11 (36.4%)	1/11 (9.1%)

表 23. CK18 mRNA の発現量と EGFR シグナル伝達関連遺伝子発現量

	mRNA expression level (/GAPDH)										
	CK18	cMET	PI3K	AKT1	mTOR	JAK1	STAT3	Her2	CK7	RhoA	TTF1
CK18 High (n=15)	0.30±0.29	0.10±0.17	0.12±0.41	0.16±0.17	0.11±0.19	0.63±0.69	1.13±1.10	0.91±2.00	1.15±1.16	0.10±0.14	12.9±367
CK18 Low (n=13)	0.07±0.04	0.25±0.52	0.01±0.01	0.14±0.10	0.06±0.06	0.24±0.18	0.59±0.51	0.36±0.53	0.81±1.19	0.04±0.03	7.17±19.8
No malignancy (n=2)	0.03±0.04	1.29±0.03	0.04±0.03	0.18±0.01	0.20±0.01	0.11±0.00	0.47±0.02	0.00	0.003±0.00	0.03±0.00	0.01±0.02

表 24. 重回帰分析による CK18 発現との関係

項目	偏回帰係数	標準誤差	P 値	95%信頼区間		単相関
cMET	0.050	0.132	0.712	-0.233	0.332	-0.155
<b>PI3K</b>	<b>0.989</b>	<b>0.338</b>	<b>0.011 *</b>	<b>0.265</b>	<b>1.714</b>	<b>0.903***</b>
AKT1	-0.014	0.168	0.936	-0.373	0.346	-0.189
mTOR	-0.162	0.292	0.588	-0.788	0.464	-0.015
JAK1	0.042	0.084	0.621	-0.137	0.222	<b>0.652**</b>
STAT3	0.094	0.050	0.079	-0.013	0.201	0.061
Her2	-0.045	0.050	0.384	-0.153	0.063	<b>0.879***</b>
CK7	0.010	0.025	0.694	-0.044	0.064	<b>0.513*</b>
RhoA	-0.226	0.887	0.802	-2.129	1.676	<b>0.867**</b>
TTF1	0.000	0.000	0.608	0.000	0.000	-0.175
定数項	0.074	0.049	0.149	-0.030	0.179	



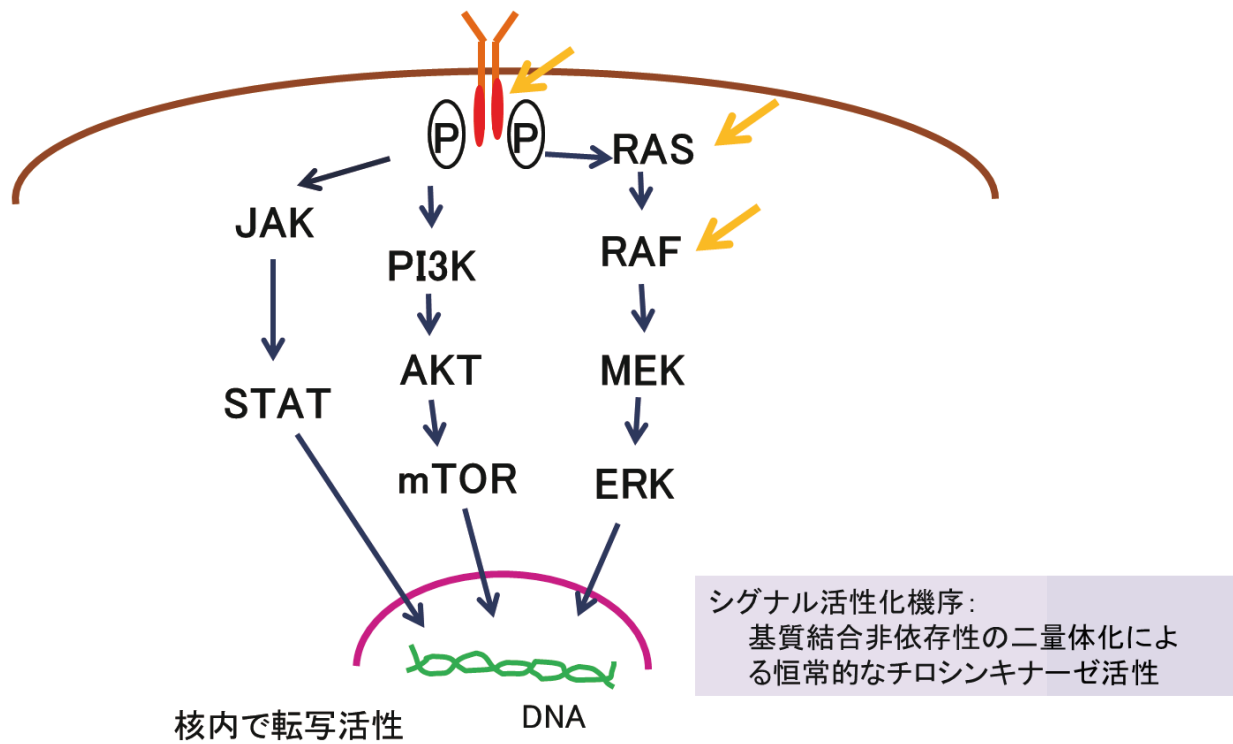
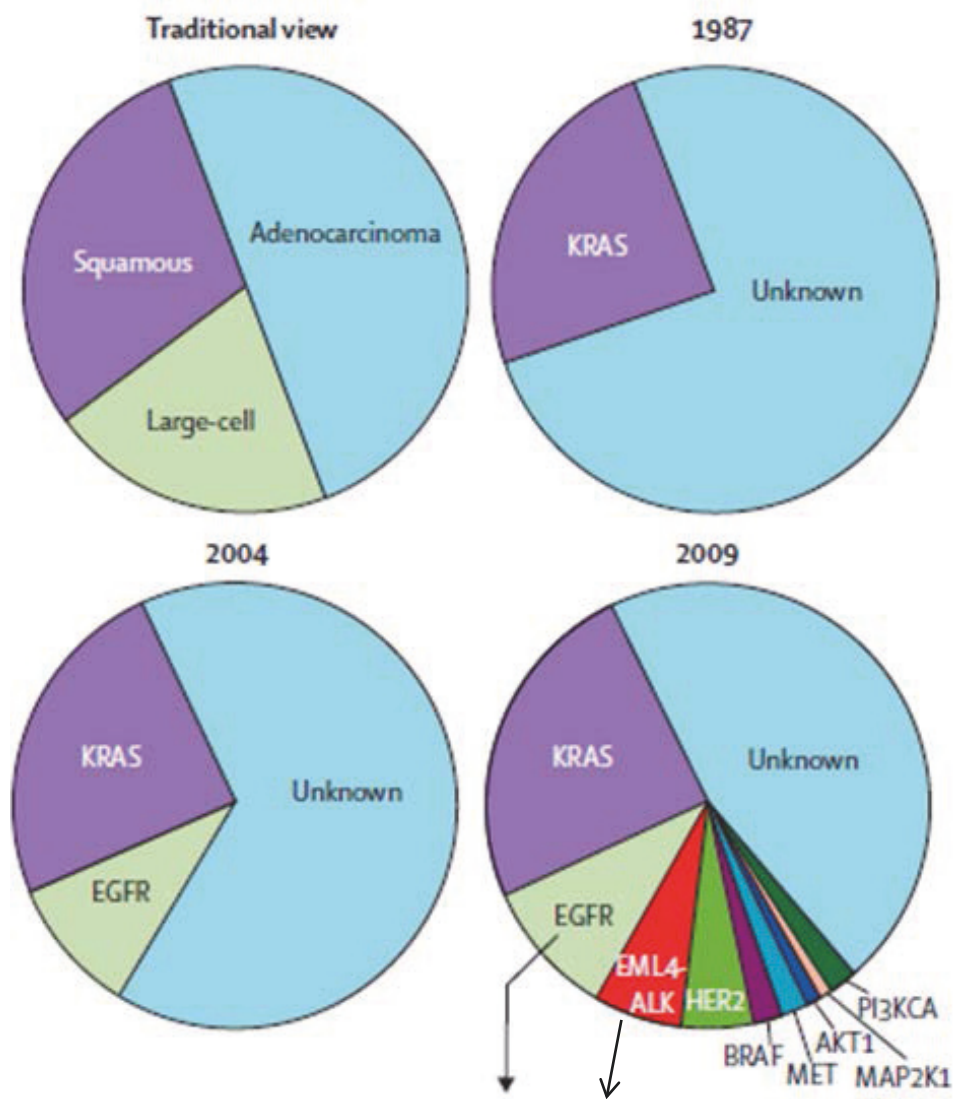
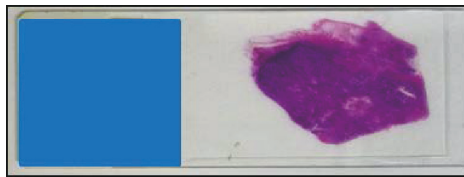


図1.



分子標的治療

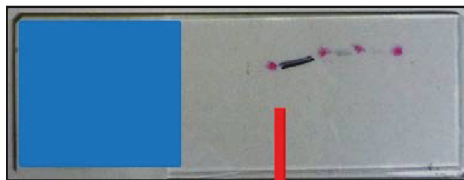
圖2.



外科切除標本



針生検標本



鉗子生検標本  
(1-2 mm<sup>2</sup>)

D

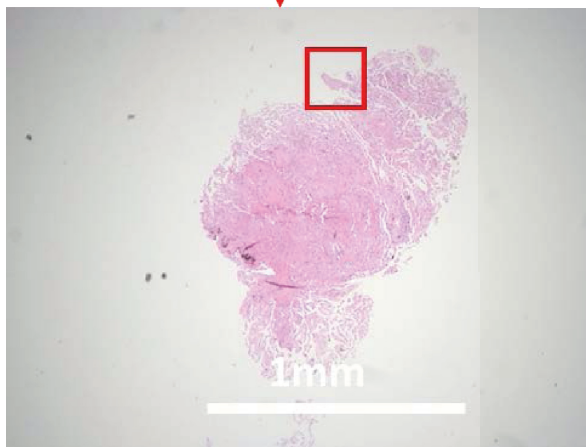
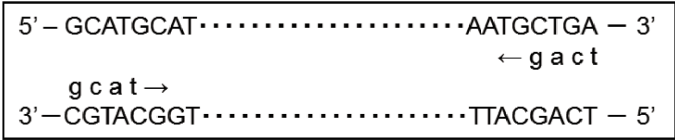
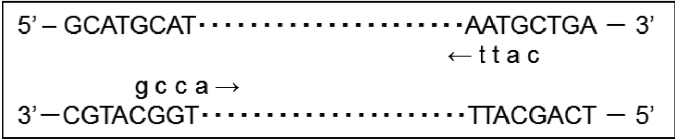


図3.

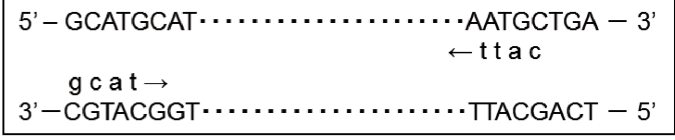
← Target DNA sequences →



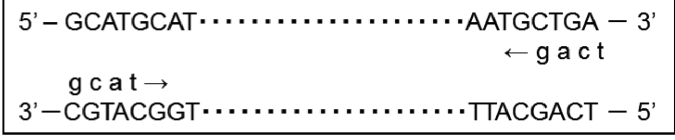
A: Primers for the first PCR  
(2 primers are required.)



B: Primers for nested PCR  
( Total 4 primers are required for the first and the second PCR reaction.)  
The second PCR products is shorter than the first.



C: Primers for semi-nested PCR  
( Total 3 primers are required for the first and the second PCR reaction.)  
The second PCR products is shorter than the first.



D: Primers for the present semi-nested PCR  
( The same 2 primers for the first PCR reaction are used for the second PCR reaction.)  
The second PCR products is same length as the first.

☒ 4.

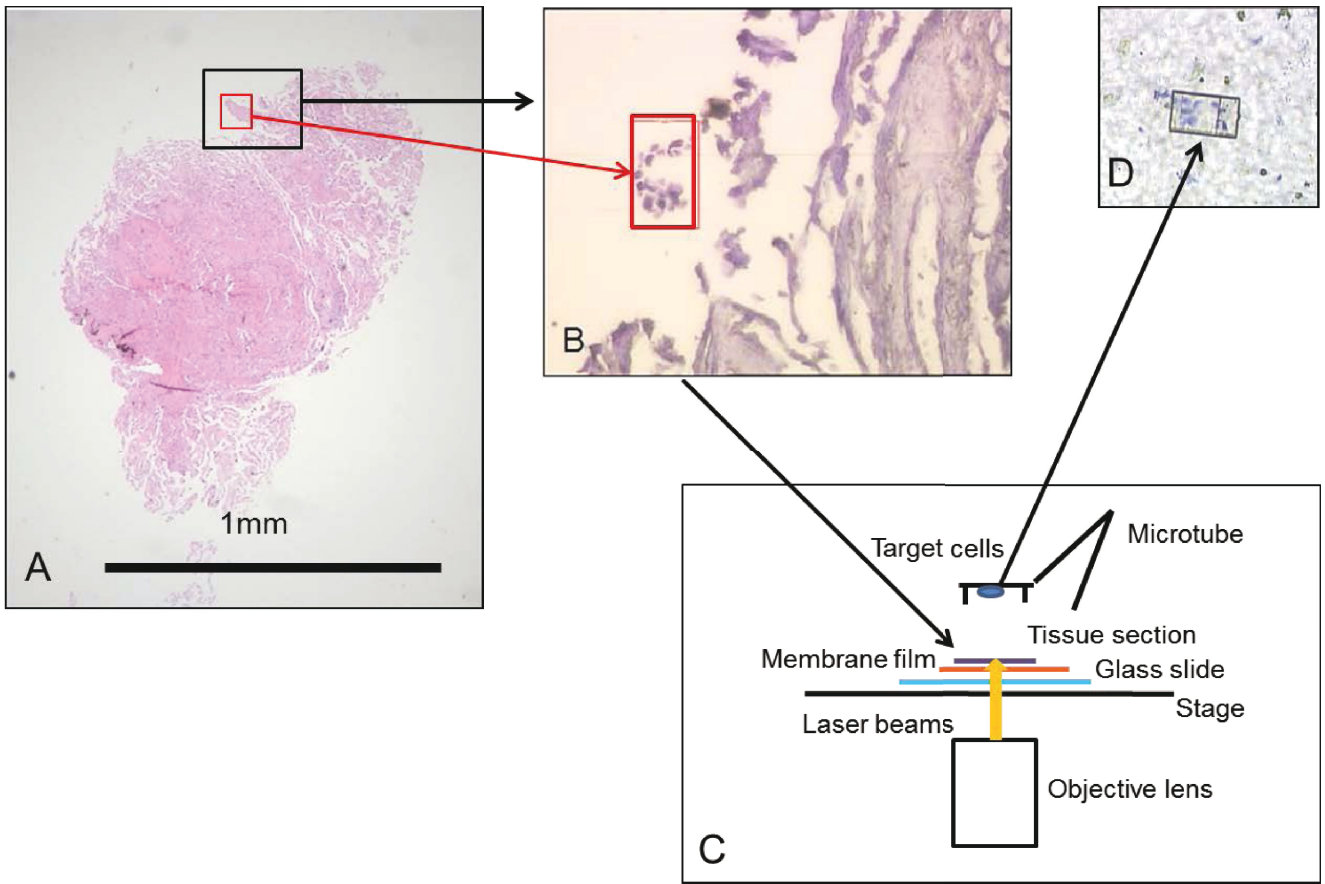
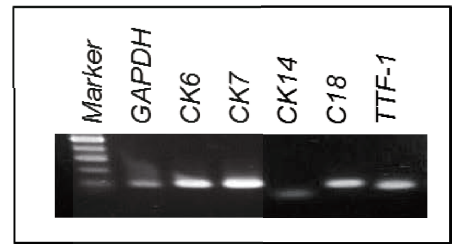
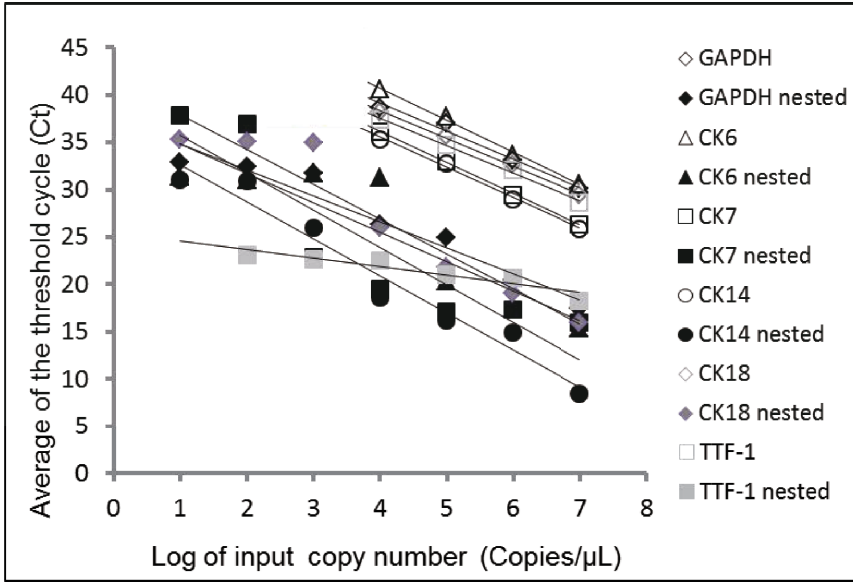


图5.



A

B

6.

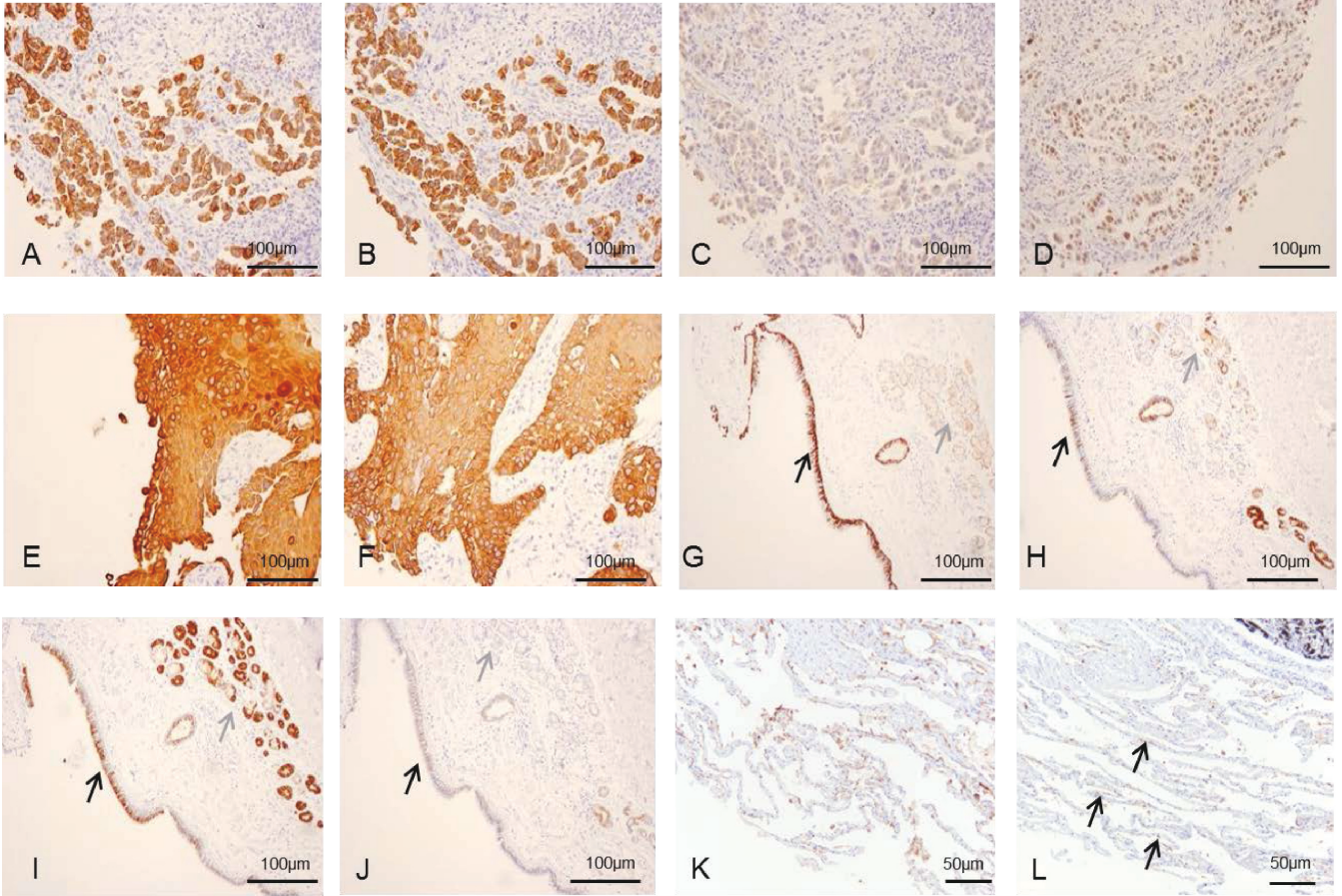
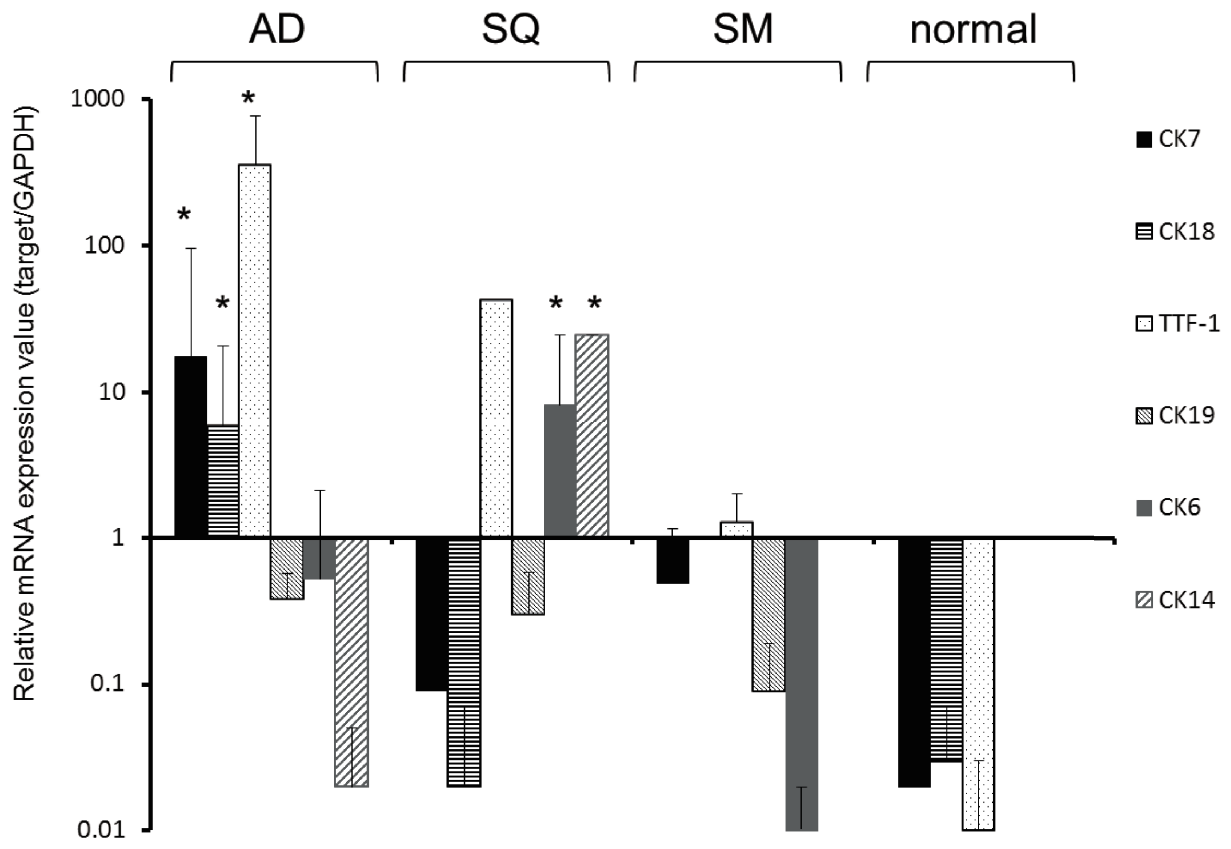
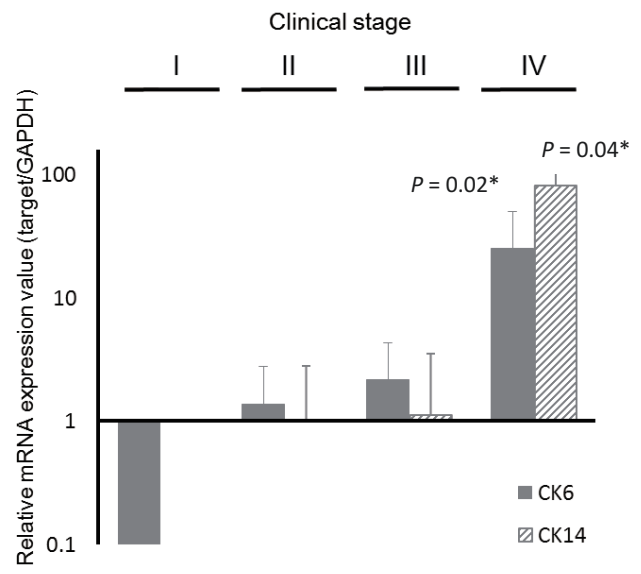
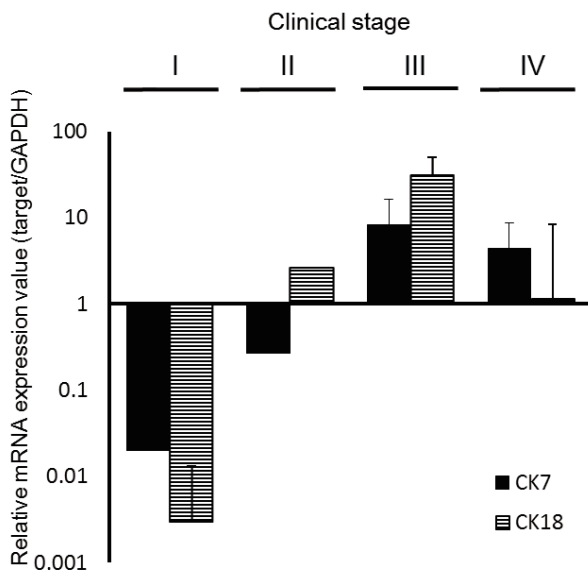


图7.

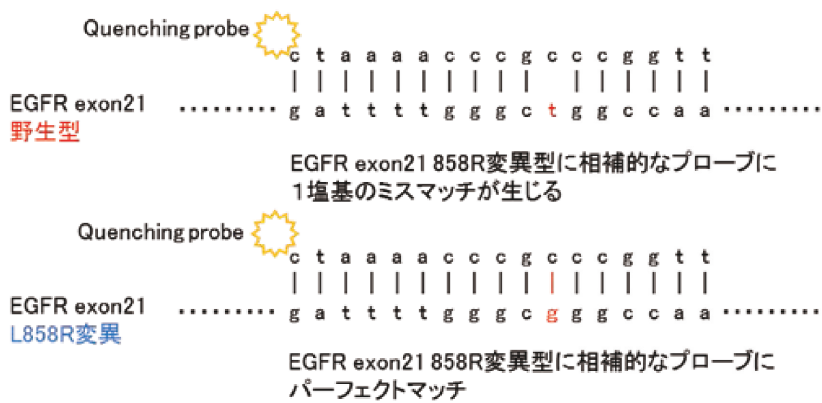


8.

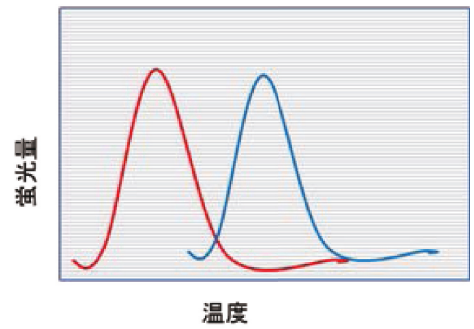




☒9.



A



B

図10.

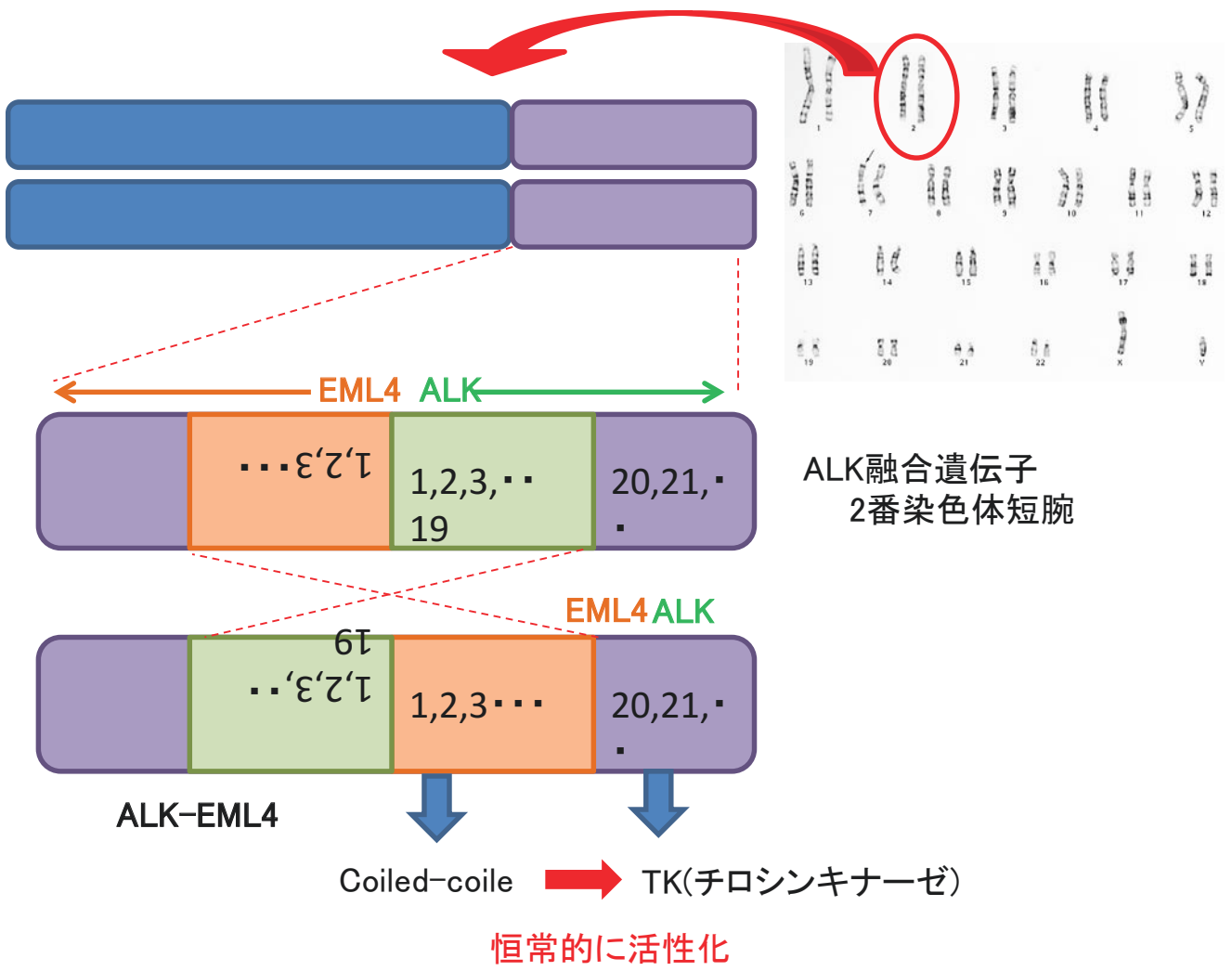


図11.

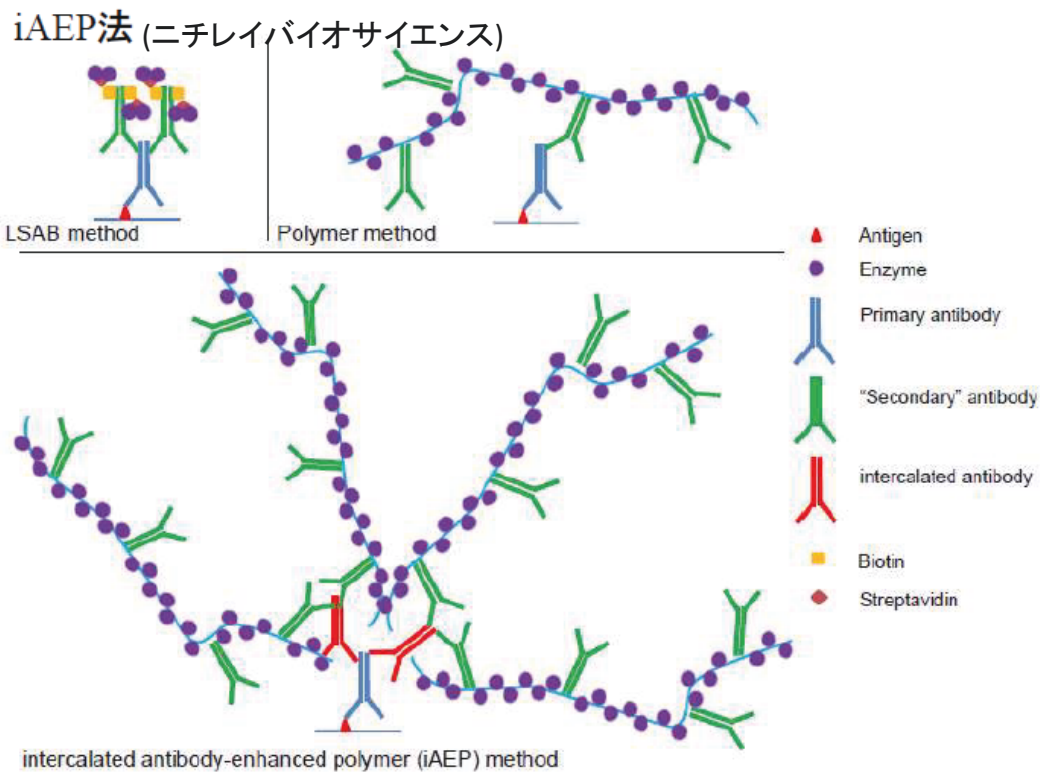


図12.

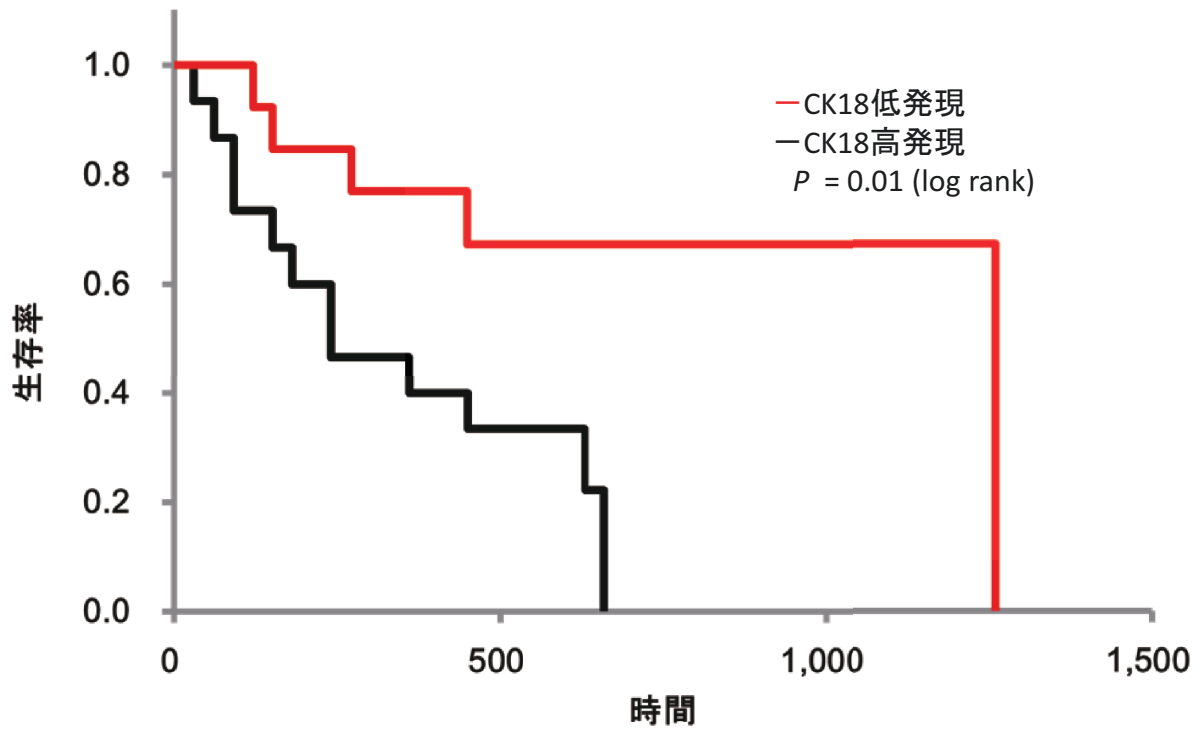
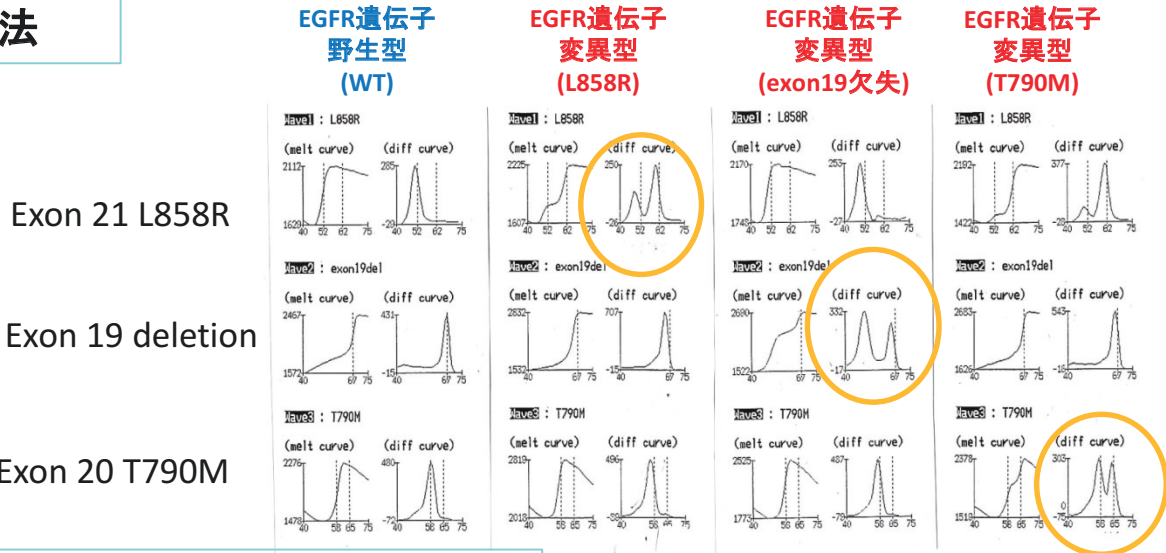


図13.

QP法



DNAダイレクトシーケンス法

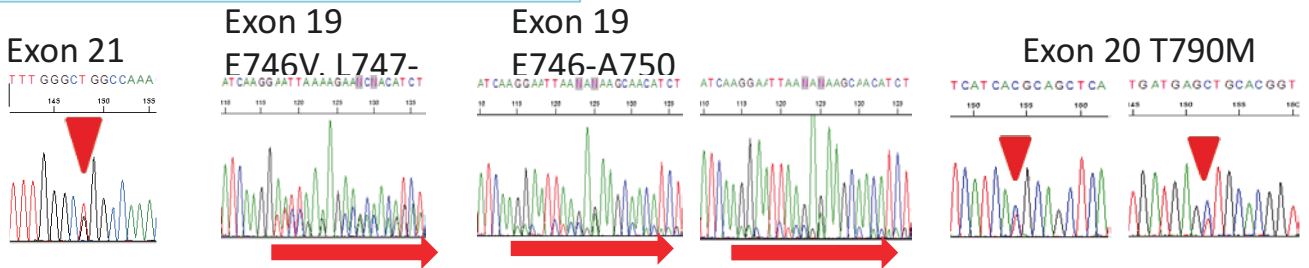
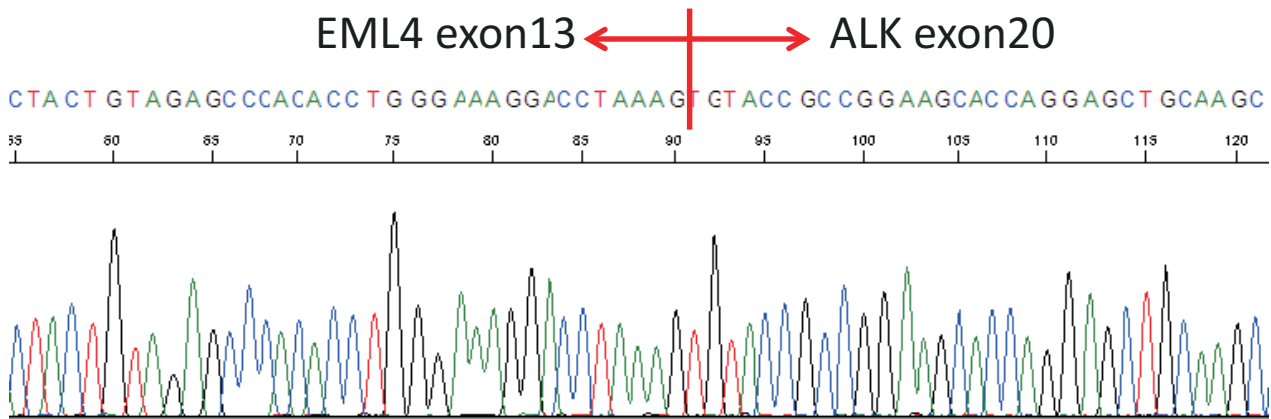
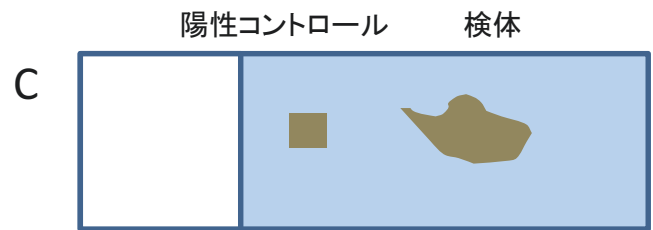
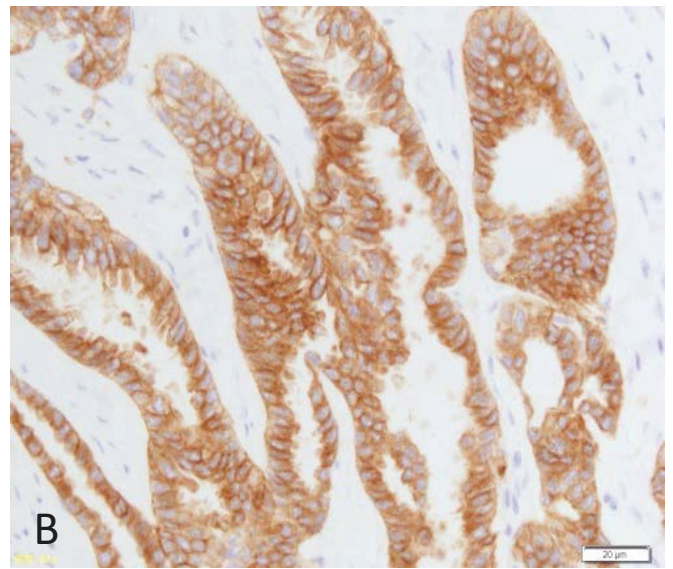
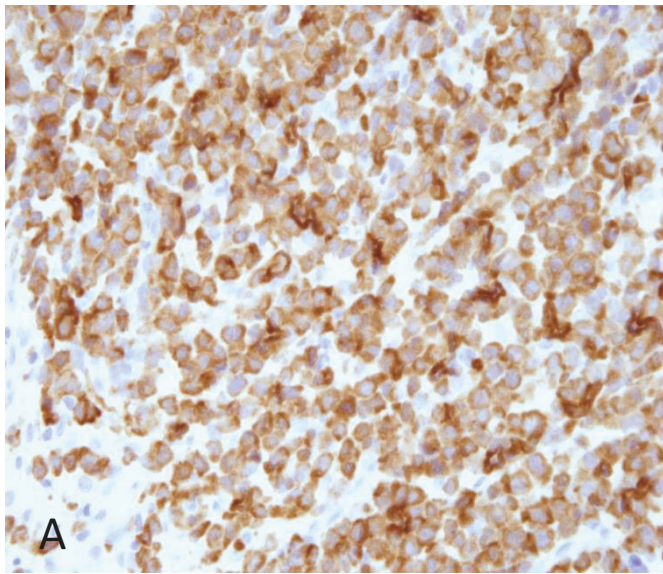


図14.



D

図15.

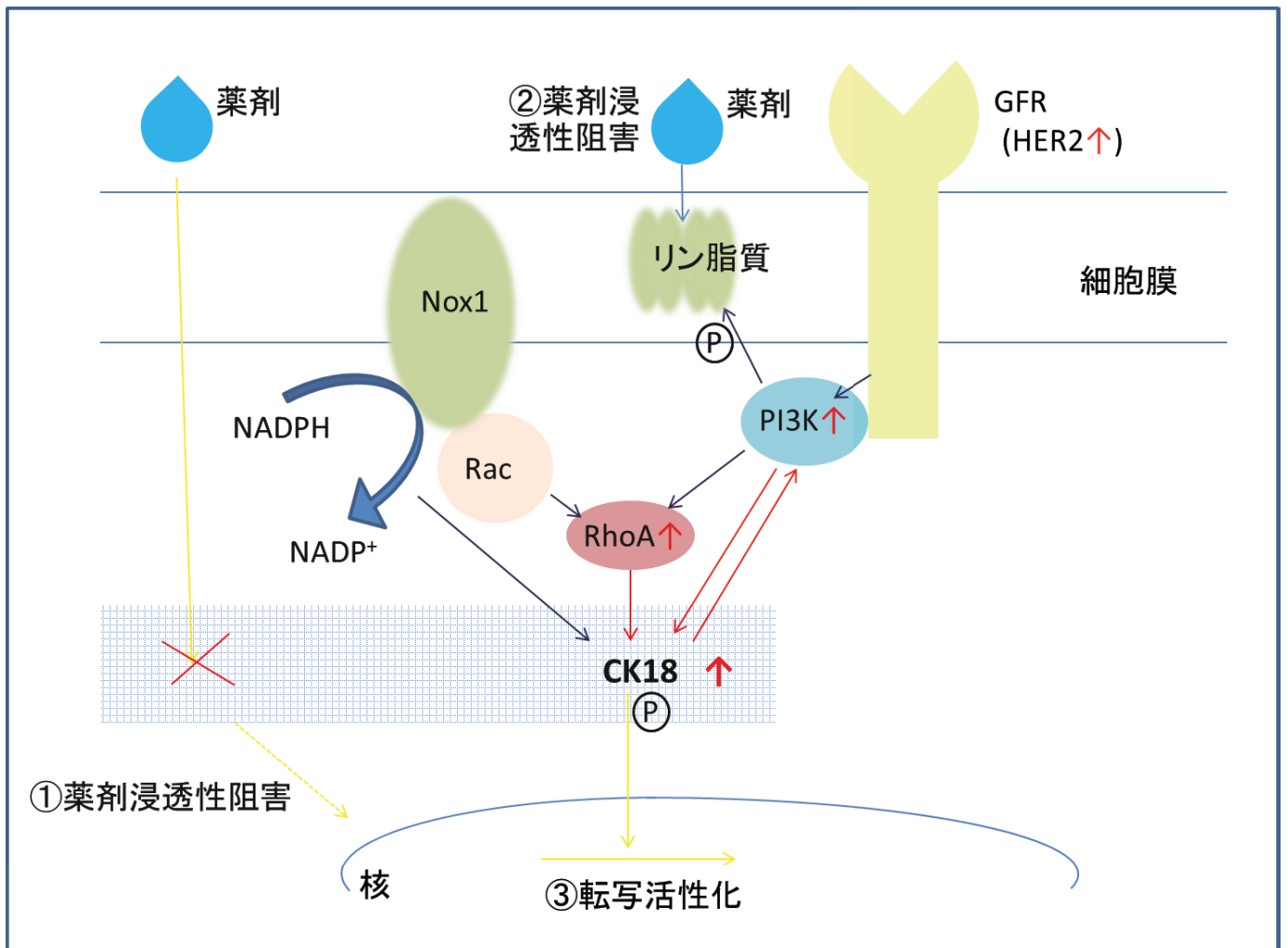


図16.



## 図の説明

### 図 1. 非小細胞肺癌で着目されている EGFR シグナル伝達経路のドライバー変異

EGFR、RAS、RAF などのチロシンキナーゼ活性部位に特異的な変異を生じると、増殖因子などによる EGFR へのリガンド結合がなくても二量体形成し、恒常的にチロシンキナーゼが活性化され、転写活性が促進される。

### 図 2. 非小細胞肺癌の分類の変遷

非小細胞肺癌は腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌と形態学的に分類されていたが、徐々にドライバー変異の存在が発見され、2009 年には分子標的治療適応決定のため、ドライバー変異による分類の重要性が増してきた[2]。この中で、EGFR 遺伝子に EGFR-TKI に感受性を示す変異がある場合、および ALK 融合遺伝子がある場合は各々分子標的治療の対象となる。これらの変異は腺癌に特異的とされている。

### 図 3. 肺癌の検査と得られる病理組織標本

肺癌の疑いで経気管支鏡的肺生検が行われた患者で、手術適応のない進行癌であった場合、手術検体 (A) に比較して、経皮的針生検検体であれば約 1mm×5mm 程度であるが (B)、最も多く行われる経気管支鏡的肺生検では約 1mm 四方と微小な病理組織標本 (C) しか得られない。さらに生検中に含まれる腫瘍細胞の割合もわずかな場合も多く (D)、このような患者では、免疫組織化学や特殊染色を含む十分な組織形態学的検索が施行不可能なため、確定診断が困難となる場合もある。

図 4. 通常の nested-PCR 法と semi-nested PCR 法のプライマー作成方法の違い

Nested-PCR 法は、従来より、標的遺伝子量が少ない場合に検出感度を向上させる目的で行われてきた[17,18]。特に微生物検出の分野で行われている。Nested-PCR 法では、1 回目に PCR 反応(A)を行って得られた標的遺伝子配列の内側に、新しくプライマーを作製して 2 回目の PCR 反応(B)を行う方法である。Semi-nested PCR では、2 回目に行う PCR に用いるプライマーを片側だけ内側に作製し、片側は同じ場合(C)と、両方とも 1 回目の PCR と同じプライマーを使用する(D)がある。プライマー設計の効率化とコストダウンが図れる他、PCR 反応時の条件を一定にできるという利点がある。特に近年の定量 PCR 法では、従来のディネイチャー、アニーリング、エクステンションの 3 段階の温度設定ではなく、アニーリングとエクステンションを 60°C一定の温度で行うことで、クリアな結果が得られるようになってきているため、反応条件を一定にできることは精細な反応を得るのに望ましい。

図 5. 肺生検検体からのレーザーマイクロダイセクション法による腫瘍細胞の回収

臨床検体は、微量であっても様々な細胞が混在している。本研究では肺生検検体から標的腫瘍細胞を回収する目的で、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いた。HE 染色を行った切片を光学顕微鏡下で、複数名の病理医によって観察し、標的細胞を同定した(A, ×100)。この検体では赤枠内にのみ腫瘍細胞が存在した。連続切片でトルイジンブルー染色を行い、LMD を行うためカバーガラス無しで鏡頭した像が B(×400)で、赤枠内に腫瘍細胞が確認された。LMD ソフトウェア (PALM® RoboSoftware, Carl Zeiss Microscopy)でマーキ

ングし、対物レンズを通して発振されるレーザービームでスライドガラス上の切片を専用フィルムとともにマイクロダイセクト (C) 後、ミネラルオイルを充填させたエッペンドルフチューブのキャップに、さらにレーザービームを照射して回収した (D)。

#### 図 6. 従来の qRT-PCR 法と snqRT-PCR 法による検量線

スタンダード系列を使用して検量線を作成した (A)。白抜きのマーカーは従来法の定量 (q) RT-PCR 法によるもの、黒いマーカーは snqRT-PCR 法によるものである。それぞれ、GAPDH, CK 6, CK 7, CK 14, CK 18 と TTF-1 mRNA 発現量定量結果であるが、従来の qRT-PCR 法では、それぞれの mRNA の初期量と RT-PCR 反応によって一定の蛍光量に達する threshold cycle time の相関係数は、各々 0.979、0.996、0.999、0.994、0.997、および 0.995 と定量性の高さが示されたが、測定可能な mRNA の初期量は  $10^3$  コピー/ $\mu$ L から  $10^7$  コピー/ $\mu$ L であった。

一方、snqRT-PCR 法によると、mRNA の初期量と threshold cycle time の相関係数は 0.945、0.808、0.816、0.959、0.927、および 0.881 と、従来法と比較して若干の低下を認めたが、測定可能な mRNA の初期量は  $10^1$  コピー/ $\mu$ L から  $10^7$  コピー/ $\mu$ L と感度の上昇が認められた。また、snqRT-PCR 法により得られた産物は、アガロースゲル電気泳動により特異的なバンドであることが示された (B)。

#### 図 7. 免疫組織化学

免疫組織化学の結果、サイトケラチン(CK)7 は、腺癌の細胞質(A)、ならびに非腫瘍性の上皮組織 (H、黒矢印、K、灰色矢印)に高発現が認められた。CK18

は、肺腺癌の細胞質 (B)、ならびに非腫瘍性の上皮組織 (I、黒矢印、L、灰色矢印)に高発現が認められた。CK19 は、肺腺癌の細胞質 (C)、ならびに非腫瘍性の気道上皮組織 (J、黒矢印)と気管支腺(J、灰色矢印)に弱い発現が認められた。甲状腺転写因子 (TTF-1) は、肺腺癌の核に高発現が示された (D)。CK5/6 は、肺扁平上皮癌の細胞質 (E) と、非腫瘍性の気道上皮細胞(G、黒矢印) に高発現が認められ、非腫瘍性の気管支腺 (G、灰色矢印)に弱い発現が認められた。CK14 は、肺扁平上皮癌の細胞質 (F) に高発現が認められた。

#### 図 8. サイトケラチンサブタイプの遺伝子発現量と肺癌組織型

今回、snqRT-PCR 法で測定した腫瘍細胞中のサイトケラチンサブタイプおよび TTF-1 mRNA の発現量を肺癌の組織型である腺癌 (AD)、扁平上皮癌 (SQ)、小細胞癌 (SM) ならびに正常部位 (normal) 別に示した(mean + SD)。腺癌 (AD)では、CK 7, CK 18, および TTF-1 mRNA の発現量が他の組織型や正常部位よりも有意に高く ( $P < 0.05$ )、扁平上皮癌では、CK 6 および CK 14 mRNA の発現量が他の組織型や正常部位よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。今回検討した標的 mRNA 発現量はいずれも正常部位では低値であった。

#### 図 9. サイトケラチンサブタイプの遺伝子発現量と臨床病期

サイトケラチンサブタイプの mRNA 発現量と症例の臨床病期の関係を示した。

A: 腺癌 (AD)では、CK7 および CK 18 mRNA の発現量は I 期では低値を示し、III 期まで病期の進行に従って高くなる傾向を示したが IV 期ではばらつきが生じていることが示され、特に CK18 mRNA で顕著であった。

B: 扁平上皮癌 (SQ) では、CK6 および CK14 mRNA の発現量は病期の進行に従って高くなる傾向を示した。特に IV 期の検体では、CK6、CK14 mRNA 発

現量ともに他の病期の検体よりも有意に高値を示した( $P=0.02, 0.04$ ).

#### 図 10. Quenching Probe(QP) 法の原理

A : 二本鎖の DNA が一本鎖に解離した際に蛍光励起するよう結合させた Quenching プローブとその外側にプライマーを作製して PCR 反応を行う。特異的な変異 (図では EGFR exon21 の L858R 変異を例としている) を有する配列に相補的な Quenching Probe を用いて PCR 反応を行うと、野生型ではプローブで認識する配列中にミスマッチを生じる。このため、PCR 産物の二本鎖 DNA が一本鎖に解離する温度 ( $T_m$  値) を調べると、より低い温度で解離するため B に示した赤いピークのように、特異的に変異を有し、プローブとのパーフェクトマッチを示す検体の  $T_m$  値 (B、青いピーク) よりも先にピークが検出される。

#### 図 11. 非小細胞肺癌に発見された ALK 融合遺伝子

2 番染色体の短腕の一部が逆位を起こすことによって EML4-ALK 融合遺伝子が生じる。ALK の融合部位は常に exon 20 のチロシンキナーゼ活性部位であり、EML4 遺伝子に存在する coiled-coil ドメインによって、ALK は二量体の形成なしにチロシンキナーゼが恒常的に活性化され、肺腺癌のドライバーとなるとされる。現在は、EML4 以外の融合相手も発見されているが、意義のある融合の場合、3'側の ALK 蛋白質の発現が亢進しているため、同部位を認識するクローンを用いた免疫組織化学により、ALK 融合遺伝子の存在を検出することができる。

#### 図 12. 高感度免疫組織化学の原理

ALK 融合遺伝子により 3'側 ALK のチロシンキナーゼドメインが活性化され

るため、同部位を認識するクローンを用いた免疫組織化学により、ALK 融合遺伝子の存在を検出することができるが、ALK 遺伝子そのものの増幅や受容体蛋白質の過剰発現ではないことから、通常の免疫組織化学では、高発現として捉えることは困難である。このため、一次抗体に二次抗体がさらに多く結合できるような手法（ニチレイバイオサイエンス）が用いられている。

#### 図 13. CK18 mRNA 発現量と進行肺腺癌患者の予後

肺腺癌症例における CK18 mRNA の発現量の中央値で高発現群、低発現群にわけて生存分析を行った結果、CK18 mRNA 高発現群は、有意に予後不良であった ( $P=0.01$ , log-rank)。

#### 図 14. QP 法とダイレクトシーケンス法による遺伝子変異解析結果

上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異の解析を QP 法で行うと、原理の図 10 で述べた通り、変異がある場合は野生型との  $T_m$  値のピークの違いで検出された。これらをダイレクトシーケンス法で解析すると、QP 法では遺伝子変異の有無がスクリーニングされるが、シーケンス法では変異の詳細が示された。EGFR exon 21 L858R 変異や、exon20 T790M 変異は、QP 法とシーケンス法が 1 対 1 の対応を示したが、exon 19 の欠失は様々なパターンがあり、本症例中では、シーケンスの結果、E746V, L747-, E746-A750 del が示された。EGFR exon19 の欠失には様々なパターンがあるが、いずれの場合も EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) に感受性とされている。

#### 図 15. 免疫組織化学による ALK 融合遺伝子検出結果とその遺伝子塩基配列

ALK 免疫組織化学の結果を示した。A は、陽性対照として用いた Anaplastic

lymphoma である。B は陽性症例で、ALK 蛋白質は細胞質に瀰漫性に発現している。分子標的治療の選定に直結する ALK の免疫組織化学では、偽陰性や偽陽性を回避するため、C のように陽性対照、検体を同一のスライドガラスにのせて染色した。陽性症例の遺伝子塩基配列をシーケンス法で解析した結果、EML4 exon13 と ALK exon20 が融合したタイプであることが示された。

#### 図 16. 肺腺癌における CK18 高発現の機序と CK18 高発現の悪性化への関与

今回、進行肺腺癌において CK18 高発現との関係が示された PI3K、RhoA、ならびに Her2 の関係を赤矢印で示し、他の上皮系腫瘍の培養細胞系で報告されている各々の関係を青矢印で示した。CK18 高発現の機序としては、Rho ファミリーG 蛋白質をサブユニットとする Nox1 の過剰発現による場合と、Her2 のリガンド刺激による PI3K の発現亢進から RhoA を介して高発現となる場合が示唆された。そして、CK18 高発現の予後への関与については、①CK18 の過剰発現あるいは異常蓄積による薬剤の核への浸透性阻害、②CK18 高発現と連動する PI3K 発現による膜リン脂質の活性化あるいは過剰発現による薬物輸送の異常あるいは薬剤の核への浸透性阻害、あるいは、高発現した CK18 のリン酸化による転写活性が考えられる。また、図に示していないが、CK18 高発現状態の維持は、ユビキチン異常による代謝異常の可能性も考えられ、各々の機序の検証と進行肺腺癌における薬剤耐性解除ならびに悪性化阻害のキー分子についての検討は今後の課題である。

# 研究業績

中 陽

1 発	①	7
	②	1
2 論	①	1
	②	0
	③	0
3 著		1

以上



1 発表

① 一般発表

1. 中西陽子, 佐野 誠, 矢ヶ崎宏紀, 生沼利倫, 根本則道. マイクロダイセクショ

10. 佐野 誠, 菊池建太郎, 趙 忱, 中西陽子, 小林美智代, 生沼利倫, 根本則

遺伝子の検出とサイトカイン関連遺伝子の発現. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004. 5 (示説)

21. Ikeda A, Nakanishi Y, Sakimoto T, Shoji J, Sawa M, Nemoto N. Expression of

伸, 生沼利倫, 杉谷雅彦, 根本則道. 扁平上皮癌成分が優位を示した metaplastic carcinoma の一例. 第 48 回日本臨床細胞学会秋季大会, 奈良, 2009. 10 (示説)

32. 村上絵里子, 中西陽子, 前田哲代, 本間 琢, 尾花ゆかり, 佐野 誠, 山田

彦、須金紀雄、高橋典明、橋本修、村松高、大森一光、根本則道. 肺生検を対象としたレーザーマイクロダイセクション法による遺伝子発現解析の診断への応用. 第 51 回日本肺癌学会総会, 広島, 2010. 11 (示説)

42. 清水哲男, 中西陽子, 中川喜子, 須金紀雄, 辻野一郎, 大地康司, 生沼利

51. 清水哲男, 中西陽子, 中川喜子, 須金紀雄, 辻野一郎, 大地康司, 生沼利

60. Tsujino I, Nakanishi Y, Shimizu T, Obana Y, Ohni S, Takahashi N, Nemoto N,

之上史, 大荷澄江, 楠美嘉晃, 山田 勉, 四万村三恵, 大森一光, 高橋典明, 橋本修, 根本則道. 当院における ALK 肺癌スクリーニング結果. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013. 6 (口演)

70. 唐 小燕, 渕之上史, 中西陽子, 増田しのぶ. 乳腺化生癌の進展過程と免疫



第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014 年 11 月.

② 特別発表

シンポジウム発表

1. 根本則道、中西陽子. 悪性腫瘍の遺伝子解析的アプローチ 遺伝子診断か

診断 尿細胞診検体からの MMP-2,9 発現解析による膀胱癌診断の試み. 第 42 回日本臨床細胞学会総会, 下関, 2003. 3

4. 中西陽子. レーザーマイクロダイセクション法とリアルタイム RT-PCR 法を用い

2. 茂手木賞受賞講演

中西陽子、関 利美、尾花ゆかり、大荷澄江、楠美嘉晃、山舘周恒、根本則

2006.

10. Komatsu K, Nakanishi Y, Seki T, Fuchinoue F, Amano S, Komatsu A, Sugitani M,

④著書

1. 小松京子、中西陽子、根本則道. 未来志向型病理－病理検査の迅速性・安全

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご指導をいただきました病態病理学系人体病理学分野 根本則道教授、逸見明博教授、同形態機能病理学分野 杉谷雅彦教授、同腫瘍病理学分野 増田しのぶ教授、同病理学分野 大荷澄江先生、楠美嘉晃先生、山田 勉先生、内科学系呼吸器内科学分野 橋本 修教授、高橋典明先生、辻野一郎先生、清水哲男先生、外科学系呼吸器外科学分野 村松高先生、四万村三恵先生、ならびに多大なご協力をいただきました病態病理学系病理学分野 廣谷ゆかり技師、瀧之上 史先生、板橋病院病理部 関 利美主任と病理学分野の皆様へ深謝申し上げます。