

EGFR K-ras 遺伝子変異と DNA メチル化異常からみた肺腺癌の発癌機構

豊岡 伸一^{a*}, 伊達 洋至^b

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腫瘍・胸部外科学, ^b京都大学大学院医学研究科 呼吸器外科

キーワード: 肺腺癌, EGFR, Kras, methylation

Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinoma

Shinichi Toyooka^a, Hiroshi Date^b

^aDepartment of Cancer and Thoracic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,

^bDepartment of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

はじめに

肺癌は世界的にも悪性腫瘍の死亡者数の上位を占める癌である¹⁾。2005年の統計では本邦における肺癌による死亡者数が約6万人であり、全がん死の中で男性では最も多く、女性では第3位の死亡者数であった。肺癌の組織型は大別すると扁平上皮癌, 腺癌, 大細胞癌, 小細胞肺癌に分類されるが, 近年は腺癌が増加しており, 扁平上皮癌を抜いて現在, 最も多い組織型となっている。肺癌のリスクファクターとしては喫煙が第一にあげられる。扁平上皮癌, 小細胞肺癌は喫煙と強い関係があるが, 腺癌に関しては, 非喫煙者にもみられ, 非喫煙者の肺癌は総数としては喫煙者ほど多くないがほとんどの場合, 腺癌である。以上の現状より,

肺癌, 特に肺腺癌に対する予防・診断・治療法の進歩は重要な課題であると考えられる。

最近の分子生物学の発展に伴い, 悪性腫瘍の発癌機構に対する分子生物学手法を応用した取り組みが盛んに行われている。なかでも体細胞性変異などの Genetic な異常と DNA メチル化などの Epigenetic な異常について広く研究が行われている。肺癌では体細胞性変異としては *P53*, *Kras*, ヒト上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 遺伝子などの遺伝子変異が報告されている²⁻⁵⁾。Epigenetic な異常については, 以前, われわれは *P16*, *RASSF1A*, *APC*, *CDH13* 遺伝子などのメチル化を検討し, *P16*, *APC* 遺伝子が喫煙者の非小細胞肺癌で多くメチル化されていることなど, 臨床病理学的因子により DNA メチル化のプロフィールが異なることを報告した^{6,7)}。これらの結果は, 肺癌において体細胞性遺伝子変異 (Genetic 異常), DNA メチル化の異常 (Epigenetic 異常) が癌化の機構において重要な役割を担っていることを示唆している。

本研究では肺腺癌において Genetic 異常として

平成20年1月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7265 FAX: 086-235-7269

E-mail: toyooka@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



豊岡 伸一

平成6年岡山大学医学部医学科卒業, 同年, 岡山大学大学院医学研究科入学 (第二外科学講座)。一般外科研修のあと, 岡山大学病態遺伝子解析部門 (現 分子遺伝学教室) の清水憲二教授のもと肺癌の新規癌抑制遺伝子 (HD-PTP) について研究を行った。平成13年岡山大学大学院医学研究科卒業 (第二外科学講座)。平成11年から約3年間米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンターの Gazdar 教授に師事, 胸部悪性腫瘍における分子腫瘍学, 特にエピジェネティック異常に関し研究を行った。平成16年より岡山大学医学部・歯学部附属病院呼吸器外科助手 (現 助教)。本研究は肺癌の *EGFR* 遺伝子異常が発見された平成16年に, 留学先でのエピジェネティック異常の研究経験がヒントになり着手, 誌上発表にいった。現在は肺癌・肺移植を中心とした呼吸器外科診療と基礎研究を行っている。

EGFR, Kras 遺伝子変異を, Epigenetic 異常として PI6, RASSF1A, APC, CDH13 遺伝子のプロモーターのメチル化を調べ, Genetic 異常, Epigenetic 異常の関係について検討した。

EGFR 遺伝子と関連遺伝子

EGFR 蛋白は細胞膜貫通型のレセプター蛋白であり EGFR 蛋白自身や HER2 など EGFR family 蛋白とホモ/ヘテロダイマーを形成し, 増殖, 抗アポトーシス, 血管新生, 転移などに関係するシグナル伝達に関与している (図1)⁸⁾。EGFR 蛋白のチロシンキナーゼ部位に相当する exon18-21 に変異がおこると, リガンドの存在によらない EGFR 蛋白の構造的な活性化がおこり, 癌化に至る^{2,3,9)}。特に exon19 の欠失変異と exon21 codon858 の L858R 変異は変異症例のうち約80%の症例で EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブ, erlotinib に感受性を示すことが知られており, ゲフィチニブ投与の指標として注目されている¹⁰⁾。EGFR 遺伝子は肺腺癌, 非喫煙者, 女性, 東洋人に高頻度に変異がおこっており, 本邦の腺癌症例では約40%に変異が存在している^{11,12)}。Kras は EGFR の下流の分子であり, 喫煙歴を有する肺腺癌に多く存在する。また Kras の下流に BRAF が存在するが EGFR, Kras, BRAF の変異はお互いに排他的な関係にありそ

れぞれの遺伝子異常による癌化は独立した pathway によるものと思われる¹³⁾。

癌と Epigenetic 異常

癌の発生・進展の機構として遺伝子変異や欠失という DNA 自体の塩基配列の異常以外に, 配列の変化はきたさないが, DNA に対するヒストン, メチル基修飾の異常がおこることがある。このような異常は Epigenetic 異常と呼ばれ, 特にプロモーター領域に多い CpG 配列のシトシン塩基にメチル基が付加されると結果として転写が抑制される。よって, 癌抑制遺伝子のプロモーター部位にメチル化が起これば遺伝子の発現消失による機能不全の結果, 癌化の方向へ傾く¹⁴⁾。さまざまな癌種でメチル化の検討が行われており, 悪性腫瘍の機構に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた¹⁵⁾。

本研究における方法

外科的切除により得た肺腺癌症例164例の新鮮凍結腫瘍組織から DNA を抽出した。EGFR 遺伝子 exon18-21 と Kras 遺伝子の exon2 における体細胞性変異をダイレクトシーケンス法により検索した^{4,12)}。DNA メチル化は PI6, RASSF1A, APC, RARβ, CDH13 遺伝子について bisulfite 処理した DNA をテ

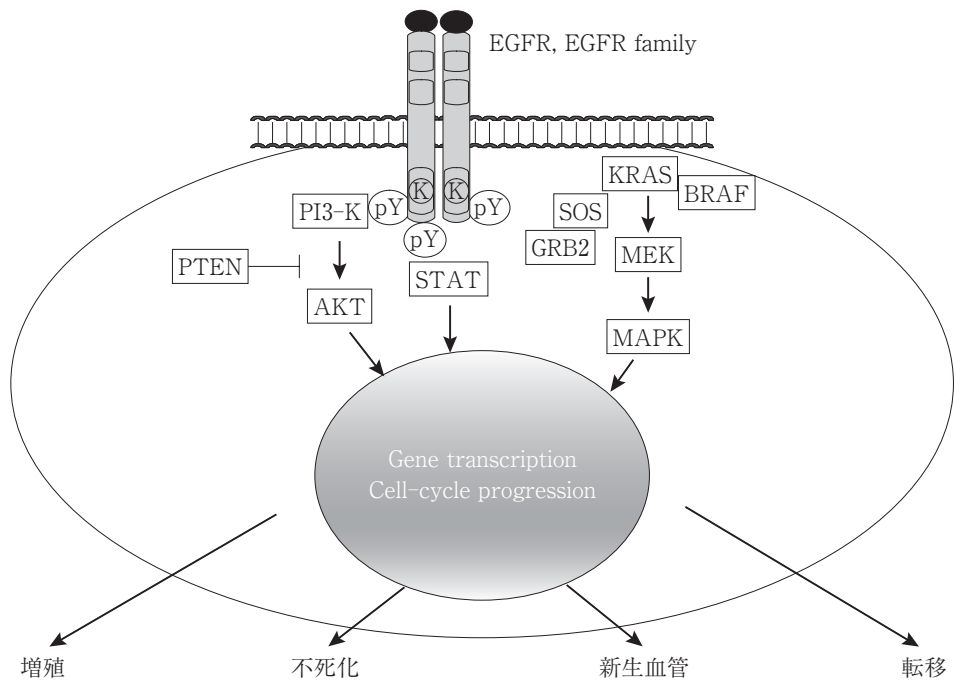


図1 EGFR シグナル伝達と機能

ンプレートとし、Methylation-specific PCR 法を用いて検索した¹⁶⁾。メチル化を調べた 5 つの遺伝子について各検体においてメチル化されている遺伝子の割合（メチル化が起きている遺伝子の数/検索した遺伝子数 [5]）を Methylation Index (MI) と定義した⁷⁾。

結 果

164例の肺腺癌のうち74例（45%）に *EGFR* 遺伝子変異を認め、exon18の変異が1例、exon19が33例、exon20が7例、exon21が33例であった。*Kras* 遺伝子変異は16例（10%）に認め、codon12に15例、codon13に1例であった。メチルについては *P16* 遺伝子に31例、*RASSF1A* 遺伝子に53例、*APC* 遺伝子に69例、*RARβ* 遺伝子に60例、*CDH13* 遺伝子に48例認められた。これらの結果をもとに、Genetic, Epigenetic 異常の関係について解析した。単変量解析では *EGFR* 変異症例において *P16* 遺伝子、*CDH13* 遺伝子のメチル化の頻度が *EGFR* 野生型症例と比較して有意に低く（*P16*, $P < 0.0001$; *CDH13*, $P = 0.003$ ），また MI も *EGFR* 変異症例で *EGFR* 野生型症例よりも有意に低かった（ $P = 0.0007$ ）。*EGFR* 変異症例は女性、非喫煙者にも有意に多いことから、*EGFR* 遺伝子変異とメチル化の関係について性別、喫煙量を補正した多変量解

析を行った。多変量解析においても単変量解析同様、*EGFR* 変異と *P16*, *CDH13* 遺伝子のメチル化、MI 値の逆相関の関係を認めた（表 1）。特に *EGFR* 変異と *P16* 遺伝子のメチル化の両者が存在する症例は 2 例のみであった。

Kras 変異とメチル化の関係についても同様の解析を行った。単変量解析では *Kras* 変異症例において *P16* 遺伝子のメチル化の頻度が *Kras* 野生型症例と比較して有意に高く（*P16*, $P < 0.0001$ ），MI も *Kras* 変異症例で野生型症例と比べ有意に高かった（ $P = 0.022$ ）。多変量解析では単変量解析と同様の結果を *Kras* 変異と *P16* 遺伝子メチル化の関係において認め（ $P = 0.007$ ），MI においては有意差には至らなかったが傾向を認めた（ $P = 0.086$ ）（表 1）。

考 察

今回の研究から、*EGFR* 変異症例では *EGFR* 野生型症例と比較し、*P16*, *CDH13* 遺伝子のメチル化が低頻度であり、また全体的なメチル化の指標である MI が低いことが明らかになった。対照的に、*Kras* 変異症例では *P16* 遺伝子のメチル化が高頻度であり、MI も高い、という結果を得た。これらの結果から Genetic, Epigenetic 含め、肺腺癌の癌化における分子異常は肺

表 1 *EGFR*・*K-RAS* 遺伝子変異とメチル化の関係

	(Mu)/(W)	<i>EGFR</i> OR (95% CI)	P-value	(Mu)/(W)	<i>Kras</i> OR (95% CI)	P 値
Methylation status						
<i>P16</i>						
(U)	72/61	1.00 (Reference)		8/125	1.00 (Reference)	
(M)	2/29	0.07 (0.02-0.33)	0.001	8/23	4.93 (1.54-15.7)	0.007
<i>RASSF1A</i>						
(U)	55/56	1.00 (Reference)		9/102	1.00 (Reference)	
(M)	19/34	0.76 (0.36-1.63)	0.49	7/46	1.39 (0.46-4.19)	0.56
<i>APC</i>						
(U)	45/50	1.00 (Reference)		9/86	1.00 (Reference)	
(M)	29/40	1.21 (0.59-2.48)	0.61	7/62	0.87 (0.29-2.59)	0.8
<i>RARβ</i>						
(U)	45/59	1.00 (Reference)		9/95	1.00 (Reference)	
(M)	29/31	0.97 (0.47-2.01)	0.94	7/53	1.50 (0.50-4.53)	0.47
<i>CDH13</i>						
(U)	61/55	1.00 (Reference)		9/107	1.00 (Reference)	
(M)	13/35	0.34 (0.15-0.77)	0.009	7/41	1.78 (0.59-5.36)	0.302
Methylation Index						
one unit increase		0.70 (0.52-0.95)	0.023		1.46 (0.95-2.25)	0.086

OR, オッズ比（性別、喫煙量で補正）；CI, 信頼区間；(M), メチル化あり；(U), メチル化なし；(Mu), 変異あり；(W), 変異なし

腺癌の進展において単に不規則におこり蓄積しているのではなく、むしろ必要に応じ系統的におこることが示唆された。特に *P16* 遺伝子と *EGFR*, *Kras* 遺伝子の関係は興味深い。*Kras* 変異による癌化には *Kras* 変異単独の異常だけでなく、*P53*, *P16* 遺伝子など Senescence 関連の遺伝子・蛋白異常の必要性が示唆されているが¹⁷⁾、本研究の結果はこの知見と合致すると思われる。対照的に *EGFR* 遺伝子変異はシグナル伝達経路の上流の異常であるため、その異常は下流のシグナル経路の多岐におよび、癌化の過程で他の分子異常の必要性が低いといえよう。すなわち、*EGFR* 遺伝子と *Kras* 遺伝子変異は互いに排他的であるが、*EGFR* 変異肺癌、*Kras* 変異肺癌という概念に基づけば、*EGFR* 変異肺癌は腫瘍として他の分子の異常が比較的少ない癌であり、*Kras* 変異肺癌は DNA のメチル化などさまざまな異常が蓄積された癌であることが推測される (図2)。さらに、*EGFR* 変異肺癌は *EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤に対し、劇的な効果を示す。“Addiction to Oncogene” の概念によると、ある Oncogene の活性化に癌細胞の依存度が高ければ高いほど (この場合は変異型 *EGFR* 蛋白が Oncogene)、その Oncogene の働きを阻害した際の、抗腫瘍効果が高いことがいわれている¹⁸⁾。*EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤に高い感受性を持っている肺癌は変異型 *EGFR* 蛋白に強く依存しており、*EGFR* 遺伝子異常以外には癌細胞が癌細胞でありつづけるための他の重要な異常

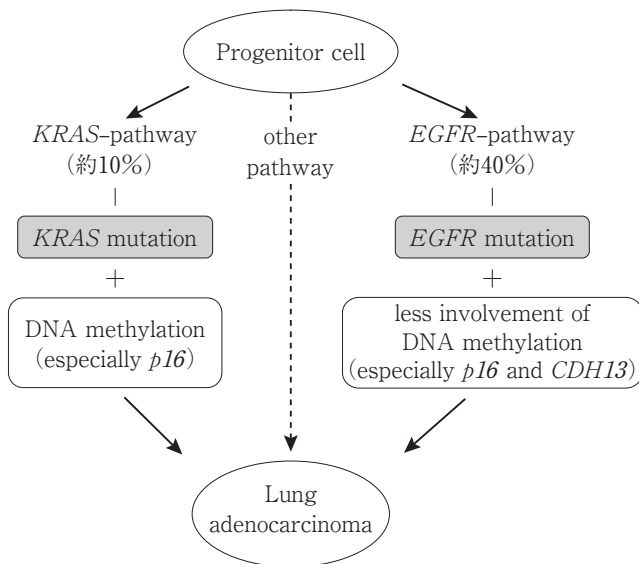


図2 肺腺癌の発生・進展における *EGFR* 変異, *Kras* 変異, DNA メチル化の関係

が乏しい腫瘍と考えられる。逆に *EGFR* 変異肺癌であっても他の癌関連遺伝子の異常をきたしていれば、変異型 *EGFR* 蛋白の阻害だけでは十分な抗腫瘍効果を得ることが出来ない可能性がある。また、今回の検討で示された *Kras* 変異肺癌の如く他の分子異常を有している癌細胞に対しては単一の異常分子を標的にするのではなく、いくつかの手段・薬剤による治療法が確立される必要があると考えられる。

以上、本研究の結果を示し、そこから分子腫瘍学的観点からみた肺腺癌の機構と治療戦略について解説した。肺腺癌の分子生物学的異常は上記のように *EGFR* 変異症例が約40%, *Kras* 変異症例が約10%と約半分の症例で主な経路が明らかになった感がある。しかしながら、残りの50%については *EGFR*, *Kras* 遺伝子の異常はない肺腺癌であり、将来の研究の成果が待たれるところである。今後、さらに、基礎的研究の知見を臨床に応用する、または臨床の現象から基礎研究のヒントを得る、“bench to bed and bed to bench” ともいふべき基礎医学と臨床医学の密接な関係の構築が重要と思われる。

文 献

- 1) Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun, MJ : Cancer statistics, 2006. CA : Cancer J Clin (2006) 56, 106-130.
- 2) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, 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.
- 3) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, et al. : *EGFR* mutations in lung cancer : correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science (2004) 304, 1497-1500.
- 4) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, 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.
- 5) Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF : The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. Hum Mutat (2003) 21, 229-239.
- 6) Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, Harada K, Ariyoshi Y, Takahashi T,

- Sugio K, Brambilla E, Gilcrease M, et al. : DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* (2001) 1, 61-67.
- 7) Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO, McLerran D, Feng Z, Fukuyama Y, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Tsukuda K, Sugio K, Shimizu N, Shimizu K, et al. : Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* (2003) 103, 153-160.
- 8) Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J, Dmitrovsky E : Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* (1993) 53, S2379-2385.
- 9) Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE : Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* (2006) 20, 1496-1510.
- 10) Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, Hataoka S, Shinoda M, Takahashi T, Yatabe Y : Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* (2005) 23, 2513-2520.
- 11) Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T : Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer : biological and clinical implications. *Cancer Res* (2004) 64, 8919-8923.
- 12) Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, Ichimura K, Tsuda T, Yano M, Tsukuda K, Tabata M, Ueoka H, et al. : The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* (2005) 11, 1167-1173.
- 13) Shigematsu H, Gazdar AF : Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* (2006) 118, 257-262.
- 14) Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP : Alterations in DNA methylation : a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* (1998) 72, 141-196.
- 15) Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB : A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature genetics* (2002) 31, 141-149.
- 16) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB : Methylation-specific PCR : a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93, 9821-9826.
- 17) Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW : Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* (1997) 88, 593-602.
- 18) Weinstein IB : Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* (2002) 297, 63-64.