

氏名	なるみ そうだい 鳴海 創大
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成26年3月26日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における Anterior Gradient 2 過剰発現-EGFR-TKI 感受性予測因子としての意義-
論文審査委員	主査 教授 一ノ瀬 正和 教授 笹野 公伸 教授 柴原 茂樹 教授 菅原 明

論文内容要旨

EGFR (Epidermal growth factor receptor ; 上皮成長因子受容体) 遺伝子変異陽性肺腺癌症例の一部で EGFR-TKI (tyrosin kinase inhibitor ; チロシンキナーゼ阻害剤) が高い抗腫瘍効果を示すことが報告されている。一方で、EGFR 遺伝子変異以外の効果予測因子は未だ十分に解明されていない。症例ごとに適切な治療法を選択する個別化医療の重要性が増す中で、EGFR 遺伝子変異検索に追加する治療効果予測因子の同定が強く求められている。

はじめに EGFR-TKI 高感受性肺腺癌細胞株においてマイクロアレイ分析、層別クラスター解析を行った。解析結果より Anterior Gradient 2 (AGR2) が EGFR-TKI の感受性に関連する可能性のある遺伝子として示唆され、これについて検討を行った。2000 年から 2006 年に東北大学病院呼吸器外科および宮城県立がんセンターで外科的切除を受けた肺腺癌 147 症例を対象に、AGR2 の免疫反応性について免疫組織化学的手法を用いて評価した。AGR2 の免疫反応性は過去の報告をもとに陽性細胞率 10%以上を陽性と定義し、陽性細胞率スコアと染色強度スコアを積算した Immunoreactive score (IRS) にて定量的に評価した。得られた各臨床検体における AGR2 の免疫反応性と全生存期間、無増悪生存期間、EGFR-TKI 治療効果を含む各臨床病理学的因子との関係を統計学的に検討した。*In vitro* の検討として、EGFR 遺伝子変異陰性肺腺癌株である A549、変異陽性株である LCSC#1、PC-3 の各細胞株における AGR2 発現を定量的 RT-PCR 法およびイムノブロットング法で評価した。また AGR2 の機能評価として PC-3 に AGR2 特異的 small interfering RNA (siRNA) を導入し、AGR2 発現抑制下での EGFR-TKI の腫瘍細胞増殖抑制効果を検討した。

免疫組織化学では AGR2 の免疫反応性は 147 例中 132 例 (89.8%) で陽性であり、49 例すべての EGFR 遺伝子変異陽性症例で認められた。また AGR2 IRS は EGFR 遺伝子変異陽性症例で有意に高値であった ($P < 0.0001$)。一方で、AGR2 低発現群と高発現群間で全生存期間、無増悪生存期間、EGFR-TKI 治療効果について有意な差は認められなかった。*In vitro* での AGR2 発現の検討では、A549 と比較し LCSC#1 および PC3 で AGR2 の mRNA レベルは有意に高値であり ($P = 0.0141$)、EGFR 遺伝子変異陽性株のなかでも PC-3 においてその発現レベルは有意に高値であった ($P = 0.0141$)。同様にタンパクレベルでの AGR2 発現も EGFR 遺伝子変異陽性株で高値であった。また siRNA 導入後の AGR2 発現を抑制した PC-3 において EGFR-TKI (ゲフィチニブ) 投与 24 時間後の細胞生存率は 0.01、0.1、1 μM の各薬剤濃度で有意に増加しており (それぞれ $P = 0.0002$ 、0.0002、 < 0.0001)、EGFR-TKI の抗腫瘍効果減弱が認められた。

マイクロアレイ解析により示された AGR2 は EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌においてその過剰

(書式12)

発現が認められた。*In vitro*の実験結果から、AGR2はEGFR遺伝子変異陽性肺腺癌においてEGFR-TKIの治療効果予測因子となり得る可能性が示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題目上皮成長因子受容体遺伝子変異陽性肺腺癌における Anterior Gradient2 過剰発現
—上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤感受性予測因子としての意義—

所属専攻・分野名医科学専攻内科病態学講座呼吸器内科学分野

氏名鳴海 創大

EGFR (Epidermal growth factor receptor ; 上皮成長因子受容体) 遺伝子変異陽性肺腺癌症例の一部で EGFR-TKI (tyrosin kinase inhibitor ; チロシンキナーゼ阻害剤) が高い抗腫瘍効果を示すことが報告されている。一方で、EGFR 遺伝子変異以外の効果予測因子は未だ十分に解明されていない。症例ごとに適切な治療法を選択する個別化医療の重要性が増す中で、EGFR 遺伝子変異検索に追加する治療効果予測因子の同定が強く求められている。

本研究では、はじめに EGFR-TKI 高感受性肺腺癌細胞株においてマイクロアレイ分析、層別クラスター解析を行った。解析結果より Anterior Gradient 2 (AGR2) が EGFR-TKI の感受性に関連する可能性のある遺伝子として示唆され、これについて検討を行った。2000 年から 2006 年に東北大学病院呼吸器外科および宮城県立がんセンターで外科的切除を受けた肺腺癌 147 症例を対象に、AGR2 の免疫反応性について免疫組織化学的手法を用いて評価した。AGR2 の免疫反応性は過去の報告をもとに陽性細胞率 10%以上を陽性と定義し、陽性細胞率スコアと染色強度スコアを積算した Immunoreactive score (IRS) にて定量的に評価した。得られた各臨床検体における AGR2 の免疫反応性と全生存期間、無増悪生存期間、EGFR-TKI 治療効果を含む各臨床病理学的因子との関係を統計学的に検討した。*In vitro* の検討として、EGFR 遺伝子変異陰性肺腺癌株である A549、変異陽性株である LCSC#1、PC-3 の各細胞株における AGR2 発現を定量的 RT-PCR 法およびイムノブロットング法で評価した。また AGR2 の機能評価として PC-3 に AGR2 特異的 small interfering RNA (siRNA) を導入し、AGR2 発現抑制下での EGFR-TKI の腫瘍細胞増殖抑制効果を検討した。

免疫組織化学では AGR2 の免疫反応性は 147 例中 132 例 (89.8%) で陽性であり、49 例すべての EGFR 遺伝子変異陽性症例で認められた。また AGR2 IRS は EGFR 遺伝子変異陽性症例で有意に高値であった ($P < 0.0001$)。一方で、AGR2 低発現群と高発現群間で全生存期間、無増悪生存期間、EGFR-TKI 治療効果について有意な差は認められなかった。*In vitro* での AGR2 発現の検討では、A549 と比較し LCSC#1 および PC3 で AGR2 の mRNA レベルは有意に高値であり ($P = 0.0141$)、EGFR 遺伝子変異陽性株のなかでも PC-3 においてその発現レベルは有意に高値であった ($P = 0.0141$)。同様にタンパクレベルでの AGR2 発現も EGFR 遺伝子変異陽性株で高値であった。また siRNA 導入後の AGR2 発現を抑制した PC-3 において EGFR-TKI (ゲフィチニブ) 投与 24 時間後の細胞生存率は 0.01、0.1、1 μ M の各薬剤濃度で有意に増加しており (それぞれ $P = 0.0002$ 、0.0002、 < 0.0001)、EGFR-TKI の抗腫瘍効果減弱が認められた。

マイクロアレイ解析により示された AGR2 は EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌においてその過剰発現が認められた。*In vitro* の実験結果から、AGR2 は EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌において EGFR-TKI の治療効果予測因子となり得る可能性が示唆された。

以上の結果は今後の肺癌診療の向上に寄与すると考えられる。よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。