

肺腺癌手術における網羅的癌関連遺伝子変異検出の有用性

後 藤 達 哉

新潟大学大学院医歯学総合研究科

生体機能調節医学専攻呼吸循環外科学分野

(主任：土田正則教授)

Usefulness of Comprehensive Cancer-related Gene Mutation Analysis in Surgery for Adenocarcinoma of the Lung

Tatsuya GOTO

Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Masanori TSUCHIDA)

要 旨

【目的】次世代シーケンサー (NGS) の出現により癌関連遺伝子変異・転座の網羅的な検出が可能になった。しかしながら、非小細胞肺癌患者において再発・予後などに関連する臨床的に重要な癌関連遺伝子変異は完全には解明されていない。本研究では、NGS を用いて癌関連遺伝子変異の検索を行い、手術後の再発・予後および再発時の化学療法効果予測の観点から肺腺癌患者において臨床的に有用な癌関連遺伝子変異を明らかにすることを目的とした。

【対象・方法】2008 年 1 月から 2014 年 12 月までに新潟大学医歯学総合病院で原発性肺癌に対して手術が施行された患者の中で、以下の適格規準を満たす患者から任意に対象を選択した。①肺葉切除術以上が施行され完全切除であった、②ホルマリン固定パラフィン包埋切片で 20% 以上の腫瘍部分が存在した、③胸部薄切 CT で腫瘍最大径に対する充実濃度の割合が 0.5 以上であった、④ 150ng 以上の DNA が抽出できた。最終的に 63 例が本研究の対象となった。癌関連遺伝子変異・臨床病理学的因子の再発・予後への影響と、癌関連遺伝子変異の有無で再発時化学療法の効果予測ができるかを統計学的に検討した。

【結果】術後観察期間中央値は 62.8 ヶ月で、男性 43 例／女性 20 例、年齢中央値 66 歳であった。単変量解析で、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2B (CDKN2B) 野生型が変異型と比較して無再発生存率が有意に高かったが、全生存率では有意差を認めなかった。多変量解析では、病理学的 Stage III 期 (ハザード比 2.218, $p = 0.020$) と CDKN2B 変異型 (ハザード比 2.814, $p = 0.002$) が独立した再発予測因子であった。全生存に対してはイベント数が少なく多変量解析は行えなかった。再発治療に関して 13 例でペメトレキセドが投与されていたが、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1B (CDKN1B) 変異型が野生型と比較して無増悪生存期間が有意に長く、それぞれの無増悪生存期間中央値は 18.0 ヶ月と 4.1 ヶ月であった ($p =$

Reprint requests to: Tatsuya GOTO
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
呼吸循環外科学分野

後 藤 達 哉

0.014)。奏功割合はCDKN1B変異型では5例中3例(60%)でCDKN1B野生型では8例中2例(25%)であった。PDが4例であったが、全例CDKN1B野生型であった。

【結論】肺腺癌患者において、CDKN2B変異型が術後再発予測因子である可能性とCDKN1B野生型がペメトレキセド治療抵抗性予測に有用な可能性が示唆された。NGSはドライバー遺伝子変異・転座だけでなく、CDKN1B変異型やCDKN2B変異型のような臨床的に重要な可能性のある遺伝子変異の同定も可能である。

キーワード：肺腺癌，次世代シーケンサー，サイクリン依存性キナーゼ阻害因子1B，サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2B，ペメトレキセド

緒 言

肺癌は、過去数十年で世界的に最も増加傾向のある悪性腫瘍であり、男女ともに癌死の主要な原因の1つである。2018年には約210万人の新規症例が推定され、全ての新規癌症例の11.4%を占めている¹⁾。肺癌の中で最も多く認める組織型は腺癌であり不均一性に富んでいる²⁾³⁾。一般的に初期段階の肺癌に対して外科的切除が主要な治療方法となるが、完全切除されたとしても再発のリスクは高い。しかし、ドライバー遺伝子を標的とする分子標的治療薬の開発が盛んに行われるようになり、進行肺癌や再発時の治療が劇的に変化している。2002年に本邦において、上皮成長因子受容体(EGFR: epidermal growth factor receptor)-チロシンキナーゼ阻害薬(TKI: tyrosine kinase inhibitor)が承認され、その2年後にEGFRに活性化変異(L858RとDel19)のある患者で顕著な腫瘍縮小効果を認めることが報告された⁴⁾⁵⁾。2007年に微小管結合タンパク質様4(EML4: echinoderm microtubule-associated protein-like 4)-未分化リンパ腫キナーゼ(ALK: anaplastic lymphoma kinase)融合遺伝子として発見されたALK融合遺伝子は非小細胞肺癌の3～5%の患者に認められており⁶⁾⁷⁾、ALK-TKIの開発や耐性機序の解明などが進んできている。2017年にはROS癌原遺伝子1、受容体チロシンキナーゼ(ROS1: ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase)融合遺伝子を標的とする治療、続けて2018年にはv-rafマウス肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログB1(BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)遺伝子変異を標的

とする治療が承認された。さらに、間葉上皮転換因子(MET: mesenchymal-epithelial transition factor), Rearranged during Transfection (RET), ヒト上皮細胞増殖因子受容体2型(HER2: human epidermal growth factor type 2)などその他のドライバー遺伝子を標的とする治療開発が盛んに行われており、今後肺癌におけるprecision medicineの確立が加速することが期待される。

現在、次世代シーケンサー(NGS: next-generation sequencing)を用いた遺伝子パネル検査の登場により、がんゲノム解析とその結果に基づくがんゲノム診療が急速に広まっている⁸⁾⁹⁾。NGSは遺伝性疾患や腫瘍の遺伝子突然変異を測定するために多くの研究で使用されている技術である。腫瘍学においては癌関連遺伝子のパネルをシーケンスすることですべての実用的なドライバー遺伝子変異・転座を特定でき、ゲノム変化の網羅的な検出が可能となった。肺腺癌患者においてシーケンスの結果に応じて治療を行うことは予後を改善させることが示されている¹⁰⁾。NGSを利用したprecision medicineは病理学的アプローチから遺伝学的アプローチへのパラダイムシフトをもたらし、より効率的・効果的な治療方法を選択することができ費用対効果を高めることができると期待されている¹¹⁾¹²⁾。しかしながら、非小細胞肺癌患者において再発・予後や分子標的治療以外の再発時治療効果予測に関連する可能性のある癌関連遺伝子変異は完全には解明されていない。

本研究では、NGSを用いて肺腺癌患者における癌関連遺伝子変異を検出し、術後再発・予後および再発時の化学療法効果予測の観点から癌関連遺伝子変異の臨床的有用性について検討した。

対象と方法

対象

2008年1月から2014年12月までに新潟大学医歯学総合病院で原発性肺腺癌に対して手術を施行された患者の中で、以下の4つの適格規準を満たす患者から任意に対象を選択した。①肺葉切除術以上が施行され完全切除であった、②ホルマリン固定パラフィン包埋切片で腫瘍細胞含有率が20%以上であった、③胸部薄切CTで腫瘍最大径に対する充実濃度の割合が0.5以上であった、④150ng以上のDNAが抽出できた。最終的に63例が本研究の対象となった。対象患者について、以下の臨床病理学的データを収集した：手術時年齢・性別・喫煙指数・術前CEA値・手術アプローチ（胸腔鏡下または開胸）・組織学的グレード・脈管侵襲・病理学的Stage。

本試験は新潟大学における人を対象とする研究等倫理審査委員会において審査承認されている（No.2019-0010）。肺癌の進行度分類は肺癌取扱い規約第7版に準拠している¹³⁾。全ての患者において手術検体を研究に使用することのインフォームド・コンセントは得られている。

肺腺癌の術後経過観察は新潟大学医歯学総合病院外来で呼吸器外科医によって行われた。患者が新潟大学医歯学総合病院を受診出来ない場合や自宅が遠い場合には患者の自宅近くの病院で呼吸器外科医がフォローアップした。患者は術後3ヶ月毎に外来受診をしていただき、身体診察・腫瘍マーカーを含めた血液検査、そして胸部レントゲン検査を行った。胸部または胸腹部単純CT検査は6ヶ月または12ヶ月毎に施行し、術後経過観察は少なくとも5年間実施した。再発兆候を認めた場合、必要に応じて体幹部造影CT検査、頭部造影CTまたはMRI検査、気管支鏡検査、そして¹⁸F-FDG PET/CT検査を用いて全身評価を行った。再発時は基本的に新潟大学医歯学総合病院内のカンサーボードで治療方針を決定するが、局所再発に対しては放射線治療を行い、遠隔再発に対しては再発時の最新の肺癌診療ガイドラインに準拠して呼吸器内科医によって薬物療法が行われ

た。ペメトレキセド治療は、「プラチナ製剤＋ペメトレキセド±ベバシズマブおよび維持療法」または「ペメトレキセド±ベバシズマブおよび維持療法」とし、EGFR-TKIと同時に投与されていた場合はペメトレキセド治療に含めなかった。

シーケンスライブラリーの準備と網羅的ゲノムシーケンシング

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を外科的に切除された検体を処理して作成し、分析に使用した。腫瘍細胞含有率はヘマトキシリン・エオジン染色されたプレパラートを用いて新潟大学医歯学総合病院の病理医により評価され、20%以上の場合に染色されていないスライドをマクロダイセクションして腫瘍部分を濃縮した。BiOstic FFPE Tissue DNA Isolation Kit（Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA）を使用してゲノムDNAを抽出した。サンプル準備、ゲノムシーケンシング、そしてその後の分析は全てCLIA/CAP-accredited laboratory（KEW, Inc., Cambridge, MA）で実施された。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片からゲノムDNA（150ng）をライブラリーに変換し、CANCERPLEX（KEW, Inc.; Cambridge, MA）を使用して415遺伝子パネル用に濃縮した。CANCERPLEXは臨床的に検証された遺伝子パネルであり、様々な癌に関連していることが知られている415個の遺伝子を選択した。シーケンスは、イルミナMiSeq及びNextSeqを使用して平均深度500倍で行われた。そして、独自のバイオインフォマティクスプラットフォームとナレッジベースを使用してゲノムデータを処理し、ゲノム異常を特定した。なお、NGSを用いた網羅的な癌関連遺伝子変異の検出方法は、佐藤らの方法¹⁴⁾と同様である。

統計学的解析

2群間比較はフィッシャーの正確検定とスチューデントのt検定を用いて解析した。無再発生存と全生存に対する各遺伝子変異と臨床病理学的因子の影響を評価するためにCox回帰分析を用い

て単変量解析および多変量解析を行った。手術時年齢の中央値は66歳であり、66歳以上と未満で2群に分けた。喫煙指数のカットオフ値は過去の報告¹⁵⁾で使用した600に設定し、600以上は重喫煙とした。術前CEA値のカットオフ値は正常上限の5.8ng/mLに設定した。無再発生存期間は手術日から再発または全死亡した日までの時間と定義し、全生存期間は手術日から全死亡までの時間と定義した。無増悪生存期間は抗癌剤治療開始から腫瘍の進行(PD: progressive disease)または全死亡までの期間と定義した。化学療法の治療効果判定はRECISTガイドライン version1.1¹⁶⁾を用いて評価し、奏功割合は完全奏功(CR: complete response)または部分奏功(PR: partial response)の割合、病勢コントロール率はCRまたはPRまたはnon-CR/non-PDまたは安定(SD: stable disease)の割合とした。生存曲線はカプラン・マイヤー法を用いて作成し、生存曲線の比較はログランク検定を用いて解析した。なお、

$p < 0.05$ を統計学的に有意であると判断し、全ての統計学的解析はSPSS Version 25.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行った。

結 果

患者背景

術後観察期間中央値は62.8ヶ月であった(範囲: 6.8～129.0ヶ月)。63例の臨床病理学的特徴を表1に示す。男性は43例で女性は20例であり、手術時年齢中央値は66歳であった(範囲: 39～84歳)。2葉切除が2例に施行されていたが、肺全摘はなかった。病理学的Stage IA期が2例、IB期が24例、IIA期が16例、IIB期が5例、そしてIIIA期が16例と手術例全体の病理病期と比較して進行症例が多かった。

各遺伝子変異の再発・予後への影響

無再発生存と全生存における臨床病理学的因子

表1 Clinicopathological characteristics of adenocarcinoma patients using NGS.

Characteristic		All patients
Total		N = 63
Age [years], median ± SD		66 ± 11
Sex	Male / Female	43 / 20
Smoking index, median ± SD		420 ± 601
Preoperative serum CEA [ng/mL], median ± SD		5.4 ± 10.3
Surgical procedure	Lobectomy	61
	Bilobectomy	2
Surgical approach	Thoracotomy	41
	VATS	22
Pathological stage	IA	2
	IB	24
	IIA	16
	IIB	5
	IIIA	16

NGS, next-generation sequencing; N, number; SD, standard deviation; CEA, carcinoembryonic antigen; VATS, video-assisted thoracic surgery.

と各遺伝子変異の影響を評価した（表2）。なお、遺伝子変異が12個未満のものは有意な結果が得られなかったため記載を省略している。単変量解析では、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2B（CDKN2B）野生型が変異型と比較して無再発生存率が有意に高かったが（図1； $p = 0.004$ ）、全生存率では有意差を認めなかった。他には、組織学的グレード3、脈管侵襲あり、病理学的 Stage III 期、そして TP53 変異型で無再発生存率が低い傾向にあった。全生存率に関しては、重喫煙、組織学的グレード3、脈管侵襲あり、そして病理学的 Stage III 期で有意に低かったが全て臨床病

理的因子であり、遺伝子変異においては EGFR 野生型とサイクリン依存性キナーゼ阻害因子1B（CDKN1B）野生型で低い傾向を認めるのみであった（それぞれ $p = 0.066$, $p = 0.095$ ）。多変量解析では、病理学的 Stage III 期（ハザード比 2.218, $p = 0.020$ ）と CDKN2B 変異型（ハザード比 2.814, $p = 0.002$ ）が独立した再発予測因子であった。全生存に対してはイベント数が少なく多変量解析は行えなかった。CDKN2B において、変異型の症例では術前 CEA 値が有意に低く早期症例が多い傾向にあったが、再発症例と再発時に TKI で治療されていた症例が多かった（表3）。

表2 Univariate and multivariate cox proportional hazard analysis of RFS and OS for the 63 lung adenocarcinoma patients.

Variable		N	5-year RFS [%]	Univariate		Multivariate		5-year OS [%]	Univariate	
				HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value		HR (95% CI)	p-value
Total		63	37.7					63.0		
Sex	Male	43	42.4	Reference				60.3	Reference	
	Female	20	27.8	1.442 (0.760-2.734)	0.263			68.3	1.094 (0.510-2.348)	0.817
Age	< 66	35	34.3	Reference				62.0	Reference	
	≥ 66	28	39.9	0.915 (0.492-1.702)	0.778			64.9	1.253 (0.603-2.602)	0.546
Smoking index	< 600	37	39.0	Reference				74.8	Reference	
	≥ 600	26	37.3	1.286 (0.689-2.400)	0.430			45.0	2.167 (1.052-4.463)	0.036
CEA	< 5.8	35	37.6	Reference				63.9	Reference	
	≥ 5.8	28	37.9	1.026 (0.553-1.905)	0.934			61.9	0.878 (0.422-1.826)	0.727
Surgical approach	Thoracotomy	41	40.6	Reference				61.4	Reference	
	VATS	22	31.8	0.939 (0.492-1.794)	0.849			65.7	0.894 (0.418-1.913)	0.773
Histological grade	G1 / G2	48	43.7	Reference				68.3	Reference	
	G3	15	20.0	1.341 (0.965-1.865)	0.081			46.7	2.297 (1.084-4.867)	0.030
Vascular invasion	Absent	39	45.2	Reference				73.7	Reference	
	Present	24	24.3	0.586 (0.313-1.098)	0.095			43.2	2.474 (1.186-5.157)	0.016
Pathological stage	I / II	47	44.9	Reference		Reference		68.4	Reference	
	III	16	15.6	1.915 (0.993-3.693)	0.052	2.218 (1.137-4.327)	0.020	47.7	2.461 (1.169-5.183)	0.018
EGFR	Wild	34	32.1	Reference				48.9	Reference	
	Mutation	29	43.5	0.630 (0.338-1.178)	0.148			80.6	0.490 (0.229-1.049)	0.066
TP53	Wild	37	46.0	Reference				65.7	Reference	
	Mutation	26	25.6	1.800 (0.972-3.335)	0.062			59.4	1.044 (0.506-2.155)	0.907
CDKN1B	Wild	44	36.4	Reference				59.1	Reference	
	Mutation	19	41.4	0.878 (0.439-1.755)	0.713			71.9	0.464 (0.189-1.143)	0.095
CDKN2B	Wild	46	47.6	Reference		Reference		62.3	Reference	
	Mutation	17	11.8	2.499 (1.298-4.811)	0.006	2.814 (1.442-5.492)	0.002	64.7	1.299 (0.606-2.785)	0.502
PTEN	Wild	49	37.1	Reference				65.6	Reference	
	Mutation	14	40.0	0.966 (0.445-2.097)	0.931			53.9	1.186 (0.506-2.783)	0.695
ARID1A	Wild	49	31.6	Reference				62.1	Reference	
	Mutation	14	61.2	0.514 (0.216-1.224)	0.133			67.5	0.776 (0.296-2.033)	0.605
RBI	Wild	51	39.2	Reference				64.6	Reference	
	Mutation	12	31.3	1.427 (0.656-3.103)	0.369			56.3	0.849 (0.324-2.222)	0.738

Note: Only those genes mutated in more than 10 patients were analysed. N, number; RFS, recurrence-free survival; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; OS, overall survival.

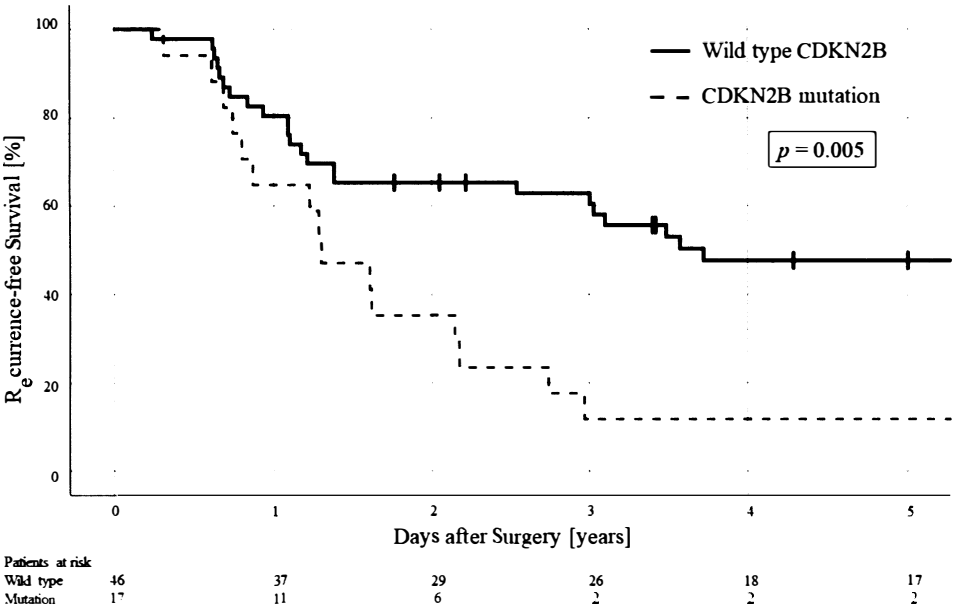


図1 Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival of the patients with CDKN2B mutation and those with wild type CDKN2B.

表3 Clinicopathological characteristics of patients with wild type CDKN2B or CDKN2B mutation.

Characteristic		Wild type CDKN2B	CDKN2B mutation	p-value
		N = 46	N = 17	
Age [years], median ± SD		66 ± 11	65 ± 10	0.670
Sex	Male / Female	22 / 14	12 / 5	1.000
Smoking index, median ± SD		410 ± 628	480 ± 516	0.739
Preoperative serum CEA [IU/L], median ± SD		5.8 ± 11.6	3.3 ± 3.2	0.017
Surgical approach	Thoracotomy	33	8	
	VATS	13	9	0.082
Pathological stage	IA	0	2	0.070
	IB	17	7	0.777
	IIA	11	5	0.747
	IIB	5	0	0.312
	IIIA	13	3	0.522
Number of patients with recurrence		23	15	0.008
Number of patients using TKIs for recurrence		4	7	0.006

N, number; SD, standard deviation; CEA, carcinoembryonic antigen; VATS, video-assisted thoracic surgery; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

表4 Univariate analysis of PFS in patients with recurrence who received pemetrexed.

Genes	Category	N	1-year PFS [%]	p-value ^a	HR (95% CI)	p-value ^b
Total		13	23.1			
TP53	Wild	4	25.0			
	Mutation	9	22.2	0.839	1.134 (0.336-3.828)	0.839
CDKN2B	Wild	6	16.7			
	Mutation	7	28.6	0.546	0.699 (0.217-2.247)	0.548
CDKN1B	Wild	8	0.0			
	Mutation	5	60.0	0.014	0.164 (0.033-0.810)	0.027
EGFR	Wild	9	22.2			
	Mutation	4	25.0	0.502	0.639 (0.171-2.388)	0.506

Note: Only those genes mutated in more than 4 patients were analysed. aLog-rank test. bCox proportional hazard regression model. N, number; PFS, progression-free survival; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

再発時のペメトレキセド治療と遺伝子変異の関係

術後再発していた症例は63例中38例(60%)であり、再発治療として13例でペメトレキセド治療が施行されていた。1st lineでペメトレキセド治療が施行されていたのは6例、2nd lineで施行されていたのは6例、そして3rd lineで施行されていたのは1例であった。2nd line以降で投与されていた7例のうち、1st lineで4例にEGFR-TKIが投与されていた。

ペメトレキセド治療と各遺伝子変異との関係性を評価した(表4)。なお、遺伝子変異が4個未満のものは省略した。CDKN1B変異型が野生型と比較して無増悪生存期間が有意に長く、それぞれの無増悪生存期間中央値は18.0ヶ月と4.1ヶ月であった(図2; $p = 0.014$)。他の遺伝子変異では有意差は認めなかった。次に、13例の治療効果判定をウォーターフォールチャートで示す(図3)。奏功割合はCDKN1B変異型では5例中3例(60%)でCDKN1B野生型では8例中2例(25%)であり、病勢コントロール割合はCDKN1B変異型では5例中5例(100%)でCDKN1B野生型では8例中4例(50%)であった。CDKN1BとEGFRが共に変異型の症例が2例あったが、治療効果は良好で

あった。PDが4例であったが、興味深いことに4例全てがCDKN1B野生型であった。

13例中5例(38%)がPRであったが、そのうち2例がCDKN1B野生型であり、この2例の臨床経過の詳細を記す。症例9はpT2aN1M0 Stage IIA期であり、術後補助化学療法としてシスプラチン+ビノレルピンを投与された。術後約13ヶ月で両側肺転移再発し、カルボプラチン+テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウムを投与されるも約7ヶ月でPD判定であった。2nd lineとしてペメトレキセド単剤が投与されたが、9ヶ月後に両側肺転移の増悪認めPD判定であった。症例11はpT1bN2M0 Stage IIIA期であったが、術後補助化学療法は本人拒否のため施行されなかった。術後約9ヶ月で縦隔リンパ節再発し、シスプラチン+ドセタキセル+胸部放射線治療施行されたがGrade4発熱性好中球減少症のため治療変更となった。2nd lineとしてペメトレキセド+バシズマブ投与されるも7ヶ月後に縦隔および鎖骨下リンパ節腫大と両側悪性胸水認めPD判定となった。PRの中でCDKN1B野生型患者であった2例において、ペメトレキセド治療が有効であった期間は1年未満であった。

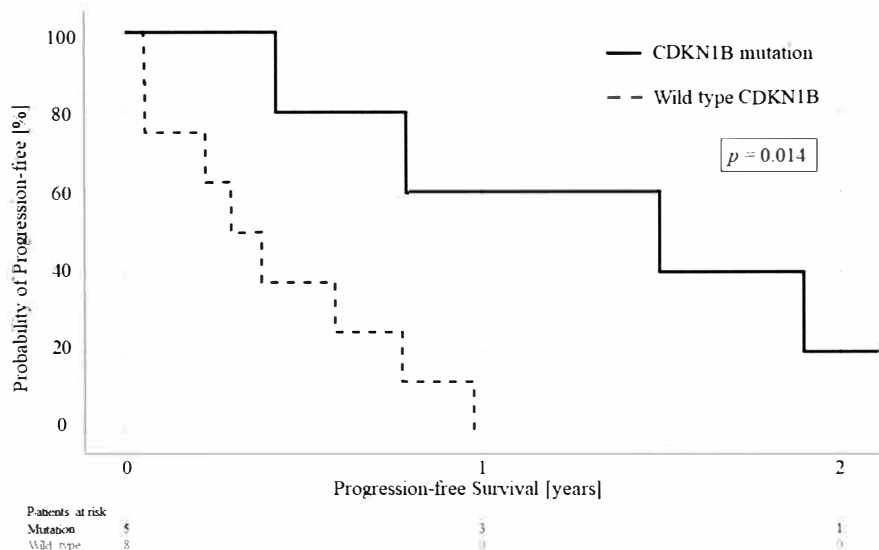


図2 Effect of genomic alterations on clinical outcomes in the patients who received pemetrexed for recurrence. Kaplan-Meier curves for progression-free survival of patients with CDKN1B mutation and those with wild type CDKN1B.

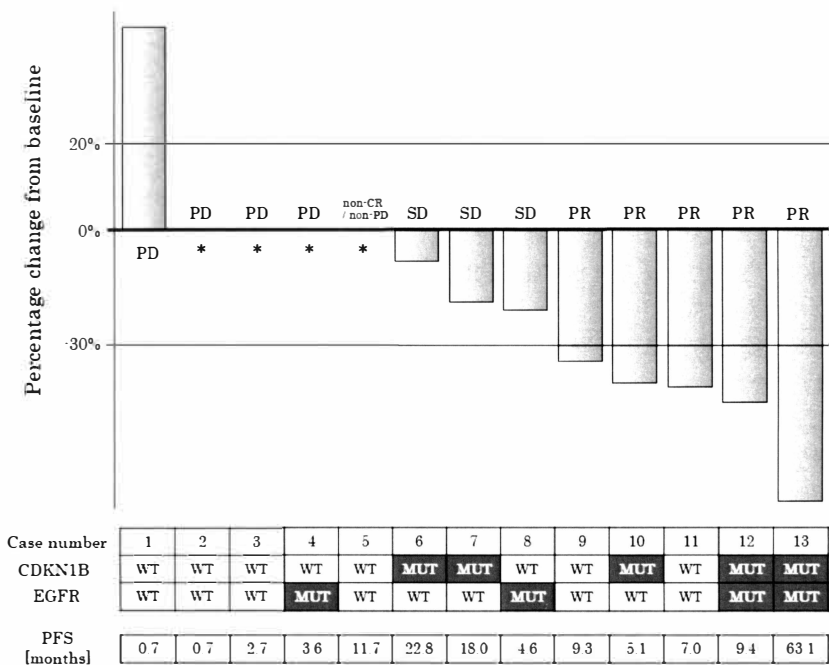


図3 Clinical response of patients treated with pemetrexed for recurrence. The waterfall plot shows the best percentage change in target lesions from baseline. The asterisk indicates patients without a measurable recurrent lesion prior to pemetrexed use. PD, progressive disease; CR, complete response; SD, stable disease; PR, partial response; WT, wild type; MUT, mutated; PFS, progression-free survival.

考 察

ドライバー遺伝子変異・転座を標的とする分子標的治療薬の開発が盛んに行われているが、肺腺癌患者においてドライバー遺伝子以外の癌関連遺伝子の臨床的な重要性はまだ明らかではない部分が多い。本研究では、肺腺癌完全切除後の患者における網羅的な癌関連遺伝子変異の検出の臨床学的有用性について検討した。まず、CDKN2B 変異型の肺腺癌患者は CDKN2B 野生型の患者と比較して無再発生存率が有意に低かった。CDKN2B 遺伝子は、細胞周期の G1 期の進行に重要となるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4 及び CDK6 を阻害する CDK 阻害因子である p15INK4b をコードする。CDKN2B が位置する 9p21.3 遺伝子座を含む染色体 9p の欠失は、癌抑制遺伝子である Rb をリン酸化し不活性型へ誘導することや腫瘍発生に関連していることが報告されている^{17) 18)}。そして、非小細胞肺癌においては、早期に欠失が起こることがあり予後と関連する可能性が示唆されている^{19) - 21)}。しかし、CDKN2B 遺伝子の不活性化は腫瘍の成長への影響は小さいと考えられており²²⁾、十分に研究されていないのが現状である。今回、無再発生存との関係性が見出されたが、全生存との関係は明らかではなかった。これは、本研究において CDKN2B 変異型の肺腺癌患者の方が分子標的治療薬で治療されていた割合が高かったためと考えられる。CDKN2B 変異型の肺腺癌患者にドライバー遺伝子変異・転座が多い可能性や再発時の治療が効きやすい可能性もあり、さらに症例を蓄積して検討することが望まれる。

本研究では、肺腺癌で最も多いドライバー遺伝子変異である EGFR 遺伝子変異の再発・予後への影響は不透明であった。EGFR 変異型の肺腺癌患者は EGFR 野生型の患者と比較して全生存率は高い傾向があったが無再発生存率では有意差は認めなかった。EGFR 遺伝子変異が肺腺癌の再発予測因子・予後因子であるとの報告が多いが^{23) - 25)}、外科的に切除された非小細胞肺癌患者の予後因子ではないとの報告もある²⁶⁾。この不一

致は様々な要因が考えられる。一つ目は喫煙状況であり、非喫煙の非小細胞肺癌患者は EGFR 遺伝子変異を有する可能性が高いが喫煙歴のある非小細胞肺癌患者と比較して全生存率が高い^{27) 28)}。本研究では、EGFR 変異型と野生型の喫煙指数中央値はそれぞれ 0 と 700 であり、確かに EGFR 変異型で非喫煙者が多かった。二つ目は組織学的サブタイプの違いであり、EGFR 遺伝子変異は肺胞置換部分を有する肺腺癌で多いが^{29) 30)}、微少浸潤性腺癌や浸潤癌性腺癌の中で肺胞置換部分が大きい置換型腺癌は予後が良好である³¹⁾。よって、EGFR 変異型と EGFR 野生型の肺腺癌患者では臨床病理学的特徴が異なっている。本研究は肺癌取扱い規約第 7 版に準拠しておりサブタイプが不明な症例が多く、サブタイプの違いによる解析は行えなかった。逆に、EGFR 遺伝子変異によって腫瘍の悪性化が促進されとの報告もあり^{32) 33)}、これらの再発・予後を比較するためには適切な層別化と統計学的解析が必要であると考えられる。

肺腺癌完全切除後の再発時に化学療法を施行された患者において、遺伝子変異と無増悪生存率の関連を調査した。本研究では、CDKN1B 変異型の肺腺癌患者がペメトレキセド治療を施行された場合、CDKN1B 野生型の患者と比較して無増悪生存率が有意に高かった。肺腺癌の EGFR 遺伝子変異の有無がペメトレキセド併用化学療法の無増悪生存に影響を与えることが報告されているが³⁴⁾、ペメトレキセド治療を受けた肺腺癌患者に対する CDKN1B 遺伝子の重要性についての報告はない。EGFR 変異型の非小細胞肺癌細胞株は EGFR 野生型と比較して、チミジル酸シンターゼ発現レベルが低いことが知られている³⁵⁾。チミジル酸シンターゼ発現レベルはペメトレキセドに対する感受性に影響を与え、チミジル酸シンターゼ発現の増加がペメトレキセドに対する耐性を引き起こす主な原因である^{36) 37)}。よって、EGFR 遺伝子変異の有無はペメトレキセド治療の治療効果予測因子である可能性がある。本研究において、EGFR 遺伝子変異の有無で無増悪生存率に有意差は認めなかったが、これは症例数が

少なかったためと考える。癌抑制遺伝子である CDKN1B によってコードされる p27Kip1 は CDK を強力に阻害して G1 期から S 期への細胞周期の進行を促進する³⁸⁾。p27Kip1 レベルの低下は EGFR 過剰発現を引き起こし、悪性化が促進され予後不良につながる^{39) 40)}。EGFR 遺伝子変異は EGFR 過剰発現やシグナル伝達の活性化を引き起こして腫瘍形成と悪性化が促進されることが知られているが^{32) 33)}、EGFR 過剰発現とチミジル酸シンターゼ発現レベルの関係はわかっておらず、さらなる研究が望まれる。具体的には、症例数を増やしての検討と EGFR 蛋白発現量・チミジル酸シンターゼ発現量の測定・解析が必要である。本研究では、併用抗癌剤の影響を加味する必要があるが他に有意な結果は得られなかった。他癌腫におけるシスプラチン耐性と p27Kip1 発現の関連についての報告^{41) 42)}はあるが、腫瘍の細胞組成の複雑さを反映して薬剤耐性に対する p27Kip1 の影響は多様である⁴³⁾。プラチナ製剤耐性と遺伝子変異に関しての報告はほとんどなく、併用抗癌剤の影響を検討するためにもさらなる症例の蓄積が望まれる。

肺腺癌におけるドライバー遺伝子以外の遺伝子変異を検討した報告は少なく、その点からも本研究の意義が深いと考えている。NGS を用いた遺伝子パネル検査が日常診療で行われるようになってきており、今後さらに癌関連遺伝子の臨床的有用性の検討は進むと考えられる。しかし、本研究にはいくつかの不十分な点がある。第一に、症例数が少ない後ろ向き研究であることが挙げられる。研究目的の遺伝子パネル検査は費用面が高額という課題があり、症例数を増やすのが困難であった。第二に、NGS を用いる上で選択バイアスが避けられないことである。検体量が多めに必要となるため進行期の患者が選択される傾向にあることに加え、連続した症例では行うことができない。第三に、解析した検体が原発巣であり再発巣での遺伝子変異検出ではないことである。肺癌において原発巣と転移巣では遺伝的に異なっている部分があり⁴⁴⁾、再発治療の治療効果を検討する上では転移巣・再発巣の遺伝子変異検索も必要と

なる。

最後に、本研究では2つの注目すべき知見があった。1つ目は CDKN2B 野生型が変異型と比較して無再発生存率が有意に高かったということであり、2つ目は CDKN1B 野生型の場合にはペメトレキセド治療抵抗性の可能性があることである。

結 論

本研究では、肺腺癌患者において NGS を用いて癌関連遺伝子変異・転座を検出し、ドライバー遺伝子以外の遺伝子変異の臨床的有用性を検討した。CDKN2B 野生型の患者は無再発生存率が高く、CDKN1B 野生型の患者は再発時のペメトレキセド治療抵抗性を示した。症例をさらに蓄積していくことにより、未だ明確ではない肺腺癌患者における遺伝子変異の臨床的有用性を検討していくことが今後の課題である。

謝 辞

本研究を行うにあたり御指導賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科分野・土田正則教授と佐藤征二郎助教に深謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) Ferlay J, Colombar M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pinerou M, Znaor A and Bray F: Estimating global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144: 1941-1953, 2019.
- 2) Ishikawa Y, Nakagawa K, Hayashi J and Tsuchiya E: Different subtypes of human lung adenocarcinoma caused by different etiological factors. Evidence from p53 mutational spectra. *Am J Pathol* 157: 2133-2141, 2000.
- 3) Takeuchi T, Tomida S, Yatabe Y, Kosaka T, Osada H, Yanagisawa K, Mitsudomi T and Takahashi T: Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin*

- Oncol 24: 1679-1688, 2006.
- 4) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J and Naber DA: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139, 2004.
 - 5) Sordella R, Bell DW, Haber DA and Settleman J: Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305: 1163-1167, 2004.
 - 6) 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 and Mano H: Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448: 561-566, 2007.
 - 7) Shaw AT and Engelman JA: ALK in Lung Cancer: Past, Present, and Future. *J Clin Oncol* 31: 1105-1111, 2013.
 - 8) Jameson JL and Longo DL: Precision medicine—personalized, problematic, and promising. *N Engl J Med* 372: 2229-2234, 2015.
 - 9) Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, Srinivasan P, Gao J, Chakravarty D, Devlin SM, Hellmann MD, Barron DA, Schram AM, Hameed M, Dogan S, Ross DS, Hechtman JF, Delair DF, Yao J, Mandelker DL, Cheng DT, Chandramohan R, Mohanty AS, Ptashkin RN, Jayakumaran G, Prasad M, Syed MH, Rema AB, Liu ZY, Nafa K, Borsu L, Sadowska J, Casanova J, Bacares R, Kiecka IJ, Razumova A, Son JB, Stewart L, Baldi T, Mullaney KA, Al-Ahmadie H, Vakiani E, Abeshouse AA, Penson AV, Jonsson P, Camacho N, Chang MT, Won HH, Gross BE, Kundra R, Heins ZJ, Chen HW, Phillips S, Zhang H, Wang J, Pchoa A, Wills J, Eubank M, Thomas SB, Gardos SM, Reales DN, Galle J, Durany R, Cambria R, Abida W, Cercek A, Feldman DR, Gounder MM, Hakimi AA, Harding JJ, Iyer G, Janjigian YY, Jordan EJ, Kelly CM, Lowery MA, Morris LG, Omuro AM, Raj N, Razavi P, Shoushtari AN, Shukla N, Soumerai TE, Varghese AM, Yaeger R, Coleman J, Bochner B, Riely GJ, Saltz LB, Scher HI, Sabbatini PJ, Robson ME, Klimstra DS, Taylor BS, Baselga J, Schultz N, Hyman DM, Arcila ME, Solit DB, Ladanyi Marc and Berger MF: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23: 703-713, 2017.
 - 10) Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, Varella-Garcia M, Franklin WA, Aronson SL, Su PF, Shyr Y, Camidge DR, Sequist LV, Glisson BS, Khuri FR, Garon EB, Pao W, Rubin C, Schiller J, Haura EB, Socinski M, Shirai K, Chen H, Giaccone G, Ladanyi M, Kugler K, Minna JD and Bunn PA: Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 311: 1998-2006, 2014.
 - 11) Roy S: Molecular Pathology Informatics. *Surg Pathol Clin* 8: 187-194, 2015.
 - 12) Goldstein DA, Shaib WL and Flowers CR: Costs and effectiveness of genomic testing in the management of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 29: 175-183, 2015.
 - 13) 日本肺癌学会編：肺癌取扱い規約。改訂第7版，金原出版，東京，2010.
 - 14) Sato S, Nagahashi M, Koike T, Ichikawa H, Shimada Y, Watanabe S, Kikuchi T, Takada K, Nakanishi R, Oki E, Okamoto T, Akazawa K, Lyle S, Ling Y, Takabe K, Okuda S, Wakai T and Tsuchida M: Impact of Concurrent Genomic Alterations Detected by Comprehensive Genomic Sequencing on Clinical Outcomes in East-Asian Patients with EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma. *Sci Rep* 8: 1005, 2018.
 - 15) Koike T, Goto T, Kitahara A, Sato S, Saitoh M, Hashimoto T, Namura O, Takahashi M, Toyabe S and Tsuchida M: Characteristics and timing of recurrence during postoperative surveillance

- after curative resection for lung adenocarcinoma. *Surg Today* 47: 1469-1475, 2017.
- 16) Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D and Verweij J: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1) . *Eur J Cancer* 45: 228-247, 2009.
 - 17) Q Tu, J Hao, X Zhou, L Yan, H Dai, B Sun, D Yang, S An, L Lv, B Jiao, C Chen, R Lai, P shi and X Zhao: CDKN2B deletion is essential for pancreatic cancer development instead of unmeaningful co-deletion due to juxtaposition to CDKN2A. *Oncogene* 37: 128-138, 2018.
 - 18) Schuster K, Venkateswaran N, Rabellino A, Girard L, Pena-Llopis S and Scaglioni PP: Nullifying the CDKN2AB Locus Promotes Mutant K-ras Lung Tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 12: 912-923, 2014.
 - 19) Kishimoto Y, Sugio K, Hung JY, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD and Gazdar AF: Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87: 1224-1229, 1995.
 - 20) Kim TM, Yim SH, Lee JS, Kwon MS, Ryu JW, Kang HM, Fiegler H, Carter NP and Chung YJ: Genome-Wide Screening of Genomic Alterations and Their Clinicopathologic Implications in Non-Small Cell Lung Cancers. *Clin Cancer Res* 11: 8235-8242, 2005.
 - 21) Tomizawa Y, Adachi J, Kohno T, Hamada K, Saito R, Noguchi M, Matsuno Y, Hirohashi S, Yamaguchi N and Yokota J: Prognostic Significance of Allelic Imbalances on Chromosome 9p in Stage I Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 1139-1146, 1995.
 - 22) Latres E, Malumbres M, Sotillo R, Martin J, Ortega S, Martin-Caballero J, Flores JM, Cordon-Cardo C and Barbacid M: Limited overlapping roles of P15 (INK4b) and P18 (INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J* 19: 3496-3506, 2000.
 - 23) Marks JL, Broderick S, Zhou Q, Chitale D, Li AR, Zakowski MF, Kris MG, Rusch VW, Azzoli CG, Seshan VE, Ladanyi M and Pao W: Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 3: 111-116, 2008.
 - 24) Park IK, Hyun K, Kim ER, Park S, Kang CH and Kim YT: The prognostic effect of the epidermal growth factor receptor gene mutation on recurrence dynamics of lung adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 54: 1022-1027, 2018.
 - 25) Ito M, Miyata Y, Kushitani K, Yoshiya T, Kai Y, Tsutani Y, Mimura T, Konishi K, Takeshima Y and Okada M: Increased risk of recurrence in resected EGFR-positive pN0M0 invasive lung adenocarcinoma. *Thoracic Cancer* 9: 1594-1602, 2018.
 - 26) Zhang Z, Wang T, Zhang J, Cai X, Pan C, Long Y, Chen J, Zhou C and Yin X: Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review With Meta-Analysis. *PLoS One* 9: e106053, 2014.
 - 27) Yoshino I, Kawano D, Oba T, Yamazaki K, Kometani T and Maehara Y: Smoking Status as a Prognostic Factor in Patients with Stage I Pulmonary Adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 81: 1189-1193, 2006.
 - 28) Sardari Nia P, Weyler J, Colpaert C, Vermeulen P, Van Marck E and Van Schil P: Prognostic value of smoking status in operated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 47: 351-359, 2005.
 - 29) Matsumoto S, Iwakawa R, Kohno T, Suzuki K, Matsuno Y, Yamamoto S, Noguchi M, Shimizu E and Yokota J: Frequent EGFR mutations in noninvasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int J Cancer* 118: 2498-2504, 2006.
 - 30) Blons H, Cote JF, Le Corre D, Riquet M,

- Fabre-Guilevin E, Laurent-Puig P and Danel C: Epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer are linked to bronchioloalveolar differentiation. *Am J Surg Pathol* 30: 1309-1315, 2006.
- 31) Yanagawa N, Shiono S, Abiko M, Ogata S, Sato T and Tamura G: New IASLC/ATS/ERS classification and invasive tumor size are predictive of disease recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 8: 612-618, 2013.
- 32) Ciardiello F and Tortora G: A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7: 2958-2970, 2001.
- 33) Arteaga CL: The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 19: 32s-40s, 2001.
- 34) Wu SG, Yang CH, Yu CJ, Lee JH, Hsu YC, Chang YL, Shih JY and Yang PC: Good response to pemetrexed in patients of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations. *Lung Cancer* 72: 333-339, 2011.
- 35) Giovannetti E, Lemos C, Tekle C, Smid K, Nannizzi S, Rodriguez JA, Ricciardi S, Danesi R, Giaccone G and Peters GJ: Molecular Mechanisms Underlying the Synergistic Interaction of Erlotinib, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, with the Multitargeted Antifolate Pemetrexed in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Mol Pharmacol* 73: 1290-1300, 2008.
- 36) Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Marini L, Tacca MD and Danesi R: Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 68: 110-118, 2005.
- 37) Sigmond J, Backus HH, Wouters D, Temmink OH, Jansen G and Peters GJ: Induction of resistance to the multitargeted antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression. *Biochem Pharmacol* 66: 431-438, 2003.
- 38) Bhatia B, Malik A, Fernandez-L A and Kenney AM: p27 (Kip1), a double-edged sword in Shh-mediated medulloblastoma: Tumor accelerator and suppressor. *Cell Cycle* 9: 4307-4314, 2010.
- 39) Belletti B and Baldassarre G: New light on p27 (kip1) in breast cancer. *Cell Cycle* 11: 3701-3702, 2012.
- 40) Fang Y, Wang Y, Wang Y, Meng Y, Zhu J, Jin H, Li J, Zhang D, Yu Y, Wu XR and Huang C: A new tumour suppression mechanism by p27^{Kip1}: EGFR down-regulation mediated by JNK/c-Jun pathway inhibition. *Biochem J* 463: 383-392, 2014.
- 41) Le TV, Seo Y, Ryu CJ, Lee HR and Park HJ: Increased expression of p27 is associated with the cisplatin resistance in gastric cancer cell line YCC-3. *Arch Pharm Res* 33: 1127-1132, 2010.
- 42) Zhang Y, Yu JJ, Tian Y, Li ZZ, Zhang CY, Zhang SF, Cao LQ, Zhang Y, Qian CY, Zhang W, Zhou HH, Yin JY and Liu ZQ: eIF3a improve cisplatin sensitivity in ovarian cancer by regulating XPC and p27Kip1 translation. *Oncotarget* 6: 25441-25451, 2015.
- 43) Iadevaia V, Wouters MD, Kanitz A, Matia-González AM, Laing EE and Gerber AP: Tandem RNA isolation reveals functional rearrangement of RNA-binding proteins on CDKN1B/p27^{Kip1} 3'UTRs in cisplatin treated cells. *RNA Biol* 17: 33-46, 2020.
- 44) Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, Van Allen EM, Lawrence MS, Horowitz PM, Cibulskis K, Ligon KL, Tabernero J, Seoane J, Martinez-Saez E, Curry WT, Dunn IF, Paek SH, Park SH, McKenna A, Chevalier A, Rosenberg M, Barker FG 2nd, Gill CM, Van Hummelen P, Thorner AR, Johnson BE, Hoang MP, Choueiri TK, Signoretti S, Sougnez C, Rabin MS, Lin NU, Winer EP, Stemmer-Rachamimov A, Meyerson M, Garraway L, Gabriel S, Lander

ES, Beroukhir R, Batchelor TT, Baselga J, Louis DN, Getz G and Hahn WC: Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals

Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discov* 5: 1164-1177, 2015.
(令和3年1月13日受付)

