

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第602号	氏名	橋本崇史
審査委員会委員	主査氏名	白尾 国昭 	
	副査氏名	清田 文彦 	
	副査氏名	平松 和史 	
論文題目 Intratatumoral heterogeneity of copy number variation in lung cancer harboring L858R via immunohistochemical heterogeneous staining (肺癌における EGFR L858R 変異蛋白免疫染色の不均一性を示した腫瘍のコピー数異常の腫瘍内不均一性)			
論文掲載雑誌名 Lung Cancer 124 (2018) 241-247			
論文要旨 <p>上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor: EGFR)を有する進行肺癌において、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)を使用したとしても多くは約1年で増悪(耐性)する。本研究の目的は、EGFR L858R 陽性肺癌を対象に、免疫組織化学的腫瘍内不均一性が EGFR-TKI 耐性獲得に及ぼす影響を解明することである。</p> <p>2014年1月から2015年12月に大分大学 呼吸器外科で切除が行われた肺癌のうち、EGFR の L858R 変異陽性をリアルタイム PCR で検出した 20 例を対象とした。免疫組織化学染色は L858R 変異特異的のウサギモノクローナル抗体(Cell Signaling Technology)を用い、染色強度(スコア 0-3)と面積割合により評価を行った。L858R 蛋白の不均一発現を認めた腫瘍において、染色強度の異なる部位から核酸をそれぞれ抽出し、NGS ターゲットシーケンスを行い、単塩基変異(Single Nucleotide variations: SNVs)とコピー数変異(Copy number variations: CNVs)を解析、比較した。また、細胞増殖を ki-67 labeling index にて、アポトーシスを TUNEL 染色にて評価した。</p> <p>20 例のうち 3 例で L858R 変異蛋白の不均一染色を認めた。3 例の NGS ターゲットシーケンスについて、Case 1 では IHC 陽性部で、陰性部と比較して EGFR コピー数と CCNE1 コピー数の増加を認めた。Case 2 では、IHC 陽性部で、陰性部と比較して EGFR コピー数と MDM2 コピー数の増加を認めた。SNVs については 3 例とも差を認めなかった。また、Case 1 では L858R 染色陽性部で ki-67 labeling index の増加を認め、case 2 では L858R 染色陽性部でアポトーシスの亢進を認めた。</p> <p>著者らは、Case 1, 2 では、EGFR コピー数の差が、L858R 蛋白の不均一を生じたと考えた。また、共変異として CCNE1 や MDM2 の CNVs が腫瘍内で不均一に生じており、これが細胞増殖やアポトーシスの頻度に影響を与え、結果的に EGFR-TKI の耐性に関わっている可能性があるとした。</p> <p>以上本研究の結論として、EGFR L858R 免疫染色の腫瘍内不均一性を示したこれらの症例は、特定の遺伝子コピー数が不均一であることに起因して不均一な細胞活性を表している可能性を示した。</p> <p>本研究は、EGFR L858R 免疫染色の腫瘍内不均一性が特定の遺伝子コピー数の不均一を引き起こすものであり、これが EGFR-TKI の効果(耐性)に影響を与える可能性を示唆した。本研究は肺がん薬物療法において大きな問題である耐性機序の解明に役立つ有用な研究と考えられた。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 橋本 崇史

論 文 題 目

Intratumoral heterogeneity of copy number variation in lung cancer harboring L858R via immunohistochemical heterogeneous staining.

(肺癌における EGFR L858R 変異蛋白免疫染色の不均一性を示した腫瘍のコピー数異常の腫瘍内不均一性)

要 旨

【背景と目的】上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor: EGFR)を有する進行肺癌においては、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)が有効である。しかし、EGFR-TKI が奏効した症例においても、その多くは約1年で増悪し、耐性となることが知られている。一方、腫瘍内不均一性はいくつかの癌で報告されているが、EGFR 陽性肺癌における研究は殆どされていない。我々は、EGFR L858R 陽性肺癌における腫瘍内不均一性を検討するため、免疫組織化学的に解析し、不均一性を示した腫瘍について次世代シーケンス(NGS)でターゲットシーケンスを施行し、腫瘍内不均一性が、EGFR-TKI 耐性獲得に及ぼす影響を解明することを目的に、以下の検討を行った。

【対象と方法】2014年1月から2015年12月に大分大学 呼吸器外科で切除が行われた肺癌のうち、EGFR の L858R 変異陽性をリアルタイム PCR で検出した 20 例を対象とした。免疫組織化学染色は

L858R 変異特異的ウサギモノクローナル抗体(Cell Signaling Technology)を用い、染色強度 (スコア 0-3)と面積割合により評価を行った。L858R 蛋白の不均一発現を認めた腫瘍において、染色強度の異なる部位から核酸をそれぞれ抽出し、NGS ターゲットシーケンスを行い、単塩基変異(Single Nucleotide variations: SNVs)とコピー数変異(Copy number variations: CNVs)を解析、比較した。また、細胞増殖を ki-67 labeling index にて、アポトーシスを TUNEL 染色にて評価した。

【結果】 20 例のうち 3 例で L858R 変異蛋白の不均一染色を認めた。不均一染色を示した症例の NGS ターゲットシーケンスでは、Case 1 で IHC 陽性部で、陰性部と比較して EGFR コピー数と CCNE1 コピー数の増加を認めた。Case 2 では、IHC 陽性部で、陰性部と比較して EGFR コピー数と MDM2 コピー数の増加を認めた。SNVs については 3 例とも差を認めなかった。Case 1 では L858R 染色陽性部で ki-67 labeling index の増加を認め、case 2 では L858R 染色陽性部でアポトーシスの亢進を認めた。

【考察】 Case 1, 2 では、EGFR コピー数の差が、L858R 蛋白の不均一を生じたと考えられる。また、共変異として CCNE1 や MDM2 の CNVs が腫瘍内不均一に生じており、細胞増殖やアポトーシスの頻度に影響を与えていた。このような CNVs の腫瘍内不均一性は EGFR-TKI の耐性に関わっている可能性がある。

【結論】 EGFR L858R 免疫染色の腫瘍内不均一性を示したこれらの症例は、特定の遺伝子コピー数が不均一であることに起因して、細胞活性が不均一な効果を表していることを示唆した。