

Fig. 1 Immunohistochemistry of EGFR L858R Point Mutation (Positive)

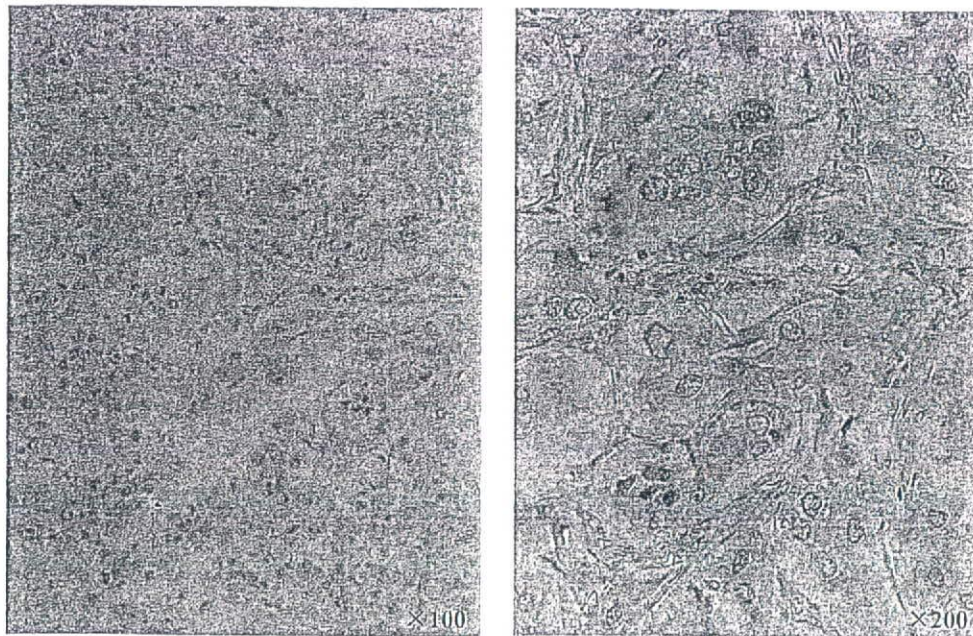


Fig. 2 Immunohistochemistry of EGFR L858R Point Mutation (Negative)

て腺癌で、ゲフィチニブ投与による治療効果は1例 (NE; 投与5日目、副作用により投与中止)、6例はSDであった。direct sequence法でExon 21のpoint mutationを検出した6例は、いずれも免疫染色法にて陽性となった (Table 2)。

考 察

現在、非小細胞肺癌に対してゲフィチニブが臨床的

に用いられており、東洋人・女性・非喫煙者症例とともにEGFR遺伝子変異を有する症例では、高い感受性が期待されている。EGFR遺伝子変異がゲフィチニブの効果予測因子となりうることは、ほぼ確定されており、その遺伝子変異はExon18、Exon19、Exon21に集中している。特に頻度が高いものは、Exon19のdeletionとExon21のpoint mutationで全体の80~90%を占めており、この2種類の遺伝子変異に関しては、こ

Table 2 The results of immunohistochemistry and direct sequence

Age	Gender	Pathological Stage	Pathological Type	Response to treatment	Mutation			Immunostaining	Smoking
					Exon18	Exon19	Exon21	L858R	
66	Female	IB	Adeno	SD					-
63	Male	IIIB	Adeno	SD				-	+
46	Male	IV	Adeno	SD				-	+
53	Male	IB	Adeno	SD				-	-
76	Male	IV	Adeno	SD		+		-	-
59	Male	IIIB	Squamous	NE				-	+
67	Female	IIIA	Squamous	SD				-	-
68	Male	IIIB	Adeno	SD				-	-
67	Female	IIIA	Adeno	NE				-	+
73	Female	IIIB	Adeno	SD		+		-	-
75	Male	IB	Large	PD				-	+
68	Female	IIIA	Adeno	SD			+	+	-
57	Male	IA	Adeno	SD				-	+
70	Male	IB	Adeno	SD			+	+	+
73	Male	IIIB	Squamous	SD				-	-
35	Male	IIIB	Adeno	PR		+		-	-
65	Male	IIIA	Adeno	PR		+		-	+
68	Female	IV	Adeno	NE				+	-
61	Male	IIIB	Adeno	SD				-	+
66	Male	IIIA	Adeno	SD			+	+	+
62	Female	IA	Adeno	NE	+			-	-
55	Female	IIIA	Adeno	SD			+	+	-
59	Female	IIIB	Adeno	SD			+	+	-
58	Male	IB	Adeno	SD				-	+
58	Female	IIIA	Adeno	SD		+		-	+
69	Male	IV	Adeno	NE				-	+
47	Male	IB	Adeno	SD				-	+
65	Female	IIIA	Adeno	SD		+		-	+
44	Male	IIIA	Adeno	PD				-	+
69	Male	IIIA	Squamous	PD				-	+
59	Male	IIIB	Adeno	SD		+		-	+
70	Male	IB	Adeno	PD				-	+
45	Female	IA	Pleomorphic	PD				-	-
52	Male	IA	Adeno	SD			+	+	-
91	Male	IA	Large	NE				-	+
63	Male	IIIB	Adeno	PR		+		-	+
68	Male	IA	Adeno	PD				-	+
45	Female	IA	Adeno	PR				-	-
63	Male	IIIA	Adeno	PR				-	+
64	Female	IB	Adeno	PR				-	-
59	Female	IB	Adeno	SD				-	-
56	Female	IB	Adeno	SD				-	+

Among the 42 cases, 7 cases (16.6%) positive by immunostained with the EGFR L858R antibody while 6 cases (14.3%) were found to have the mutation of Exon21 by the direct sequence method. All of the 6 specimens in which the mutation was detected by the direct sequence method became were positive for immunostaining.

これらの遺伝子変異が導入された細胞株を用いた *in vitro* 試験にて、ゲフィチニブの感受性に関与することが示されている¹⁹⁾²⁴⁾。

ゲフィチニブは、これらの条件を満たす症例については高い奏率が得られているが、その一方で、副作用としての急性肺障害も注目されている。特に喫煙者に対しては、従来の化学療法と比較して3~4倍もの高い発生頻度で生じるとされており、投与する症例をある程度選択することが望ましいと考えられる。非選択的な進行非小細胞肺癌に対する Randomised 比較試験にて、ゲフィチニブの優れた延命効果は示されなかったことから²⁵⁾²⁶⁾、非喫煙者や EGFR 遺伝子変異陽性患者に選択的に投与することが推奨される。

これまで、EGFR 遺伝子変異の有無を確認する一般的な方法として、direct sequence 法が用いられてきたが、今回我々はより簡便かつ安価な方法として、免疫染色法による検出を試みた。direct sequence 法による Exon21 の point mutation 陽性症例は全て免疫染色法でも検出され、免疫染色陽性例で direct sequence 法では陰性だった症例は1例のみであったことから、免疫染色法の高い検出率が示された。今回は示していないが、高い感受性を有するといわれる PCR 法と同等の検出結果であった。

免疫染色法は、特殊な器具や材料、技術などを必要とせず、簡便かつ安価に行えるという点で優れている。しかしながら現在、Exon19 の遺伝子変異を検出する抗体は樹立できていない。このため、免疫染色法による EGFR の遺伝子変異検出は、Exon21 の point mutation に限られている。現在のところ、免疫染色を用いた EGFR 変異遺伝子の検出法は当報告が初めてであり、今後 Exon19 の変異に対する抗体を作成することで、進行性非小細胞肺癌症例における簡便で安定した遺伝子変異検出法として、免疫染色法が確立すると考えられる。当施設でも、Exon19 の遺伝子変異に対する抗体の作成を試みている。

結 語

今回の結果から、EGFR 遺伝子変異検出法として、免疫染色法が従来の direct sequence 法より高い検出率を持つことが示された。免疫染色法は簡便かつ安価であり、今後有用な変異検出法となり得ると考えられる。

文 献

- 1) Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL: Growth factors and cancer. *Cancer Res* 46: 1015-1029, 1986
- 2) Aaronson SA: Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1153, 1991
- 3) Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A: The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews of Cancer* 4: 361-370, 2004
- 4) Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M: A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251: 936-939, 1991
- 5) Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y: Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 77: 25-79, 2000
- 6) Scaltriti M, Baselga J: The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical Cancer Research* 12: 5268-5272, 2006
- 7) Marmor MD, Kochupurakkal BS, Yarden Y: Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 903-13, 2004
- 8) Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232, 1995
- 9) Bunn PA Jr, Franklin W: Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 29: 38-44, 2002
- 10) Normanno N, Maiello MR, De Luca A: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? *Journal of Cellular Physiology* 194: 13-19, 2003
- 11) Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giulì P, Borasio P, Mossetti C, Ardisson F, Lausi P, Scagliotti GV: Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 15: 28-32, 2004
- 12) Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Barón AE, Zeng C, Franklin WA: Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 21: 3798-3807, 2003
- 13) Fujino S, Enokibori T, Tezuka N, Asada Y, Inoue S, Kato H, Mori A: A comparison of epidermal growth factor receptor levels and other prognostic parameters in non-small cell lung cancer. *Eur J*

- Cancer 32A : 2070-2074, 1996
- 14) Pavelic K, Banjac Z, Pavelic J, Spaventi S: Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma. *Anticancer Res* 13: 1133-1137, 1993
 - 15) Kanematsu T, Yano S, Uehara H, Bando Y, Sone S: Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patient. *Oncol Res* 13: 289-298, 2003
 - 16) Arteaga CL, Johnson DH: Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Curr Opin Oncol* 13: 491-498, 2001
 - 17) Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Scarlett L, Henthorn L, Richards L: Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 1911-1914, 2001
 - 18) 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, Haber 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
 - 19) 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* 304: 1497-1500, 2004
 - 20) Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13306-13311, 2004
 - 21) 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* 64: 8919-8923, 2004
 - 22) Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T, Maemondo M, Kimura Y, Morikawa N, Watanabe H, Saijo Y, Nukiwa T: Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Clin Oncol* 24: 3340-3346, 2006
 - 23) Asahina H, Yamazaki K, Kinoshita I, Sukoh N, Harada M, Yokouchi H, Ishida T, Ogura S, Kojima T, Okamoto Y, Fujita Y, Dosaka-Akita H, Isobe H, Nishimura M: A phase II trial of gefitinib as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. *Br J Cancer* 95: 998-1004, 2006
 - 24) Arai T, Fukumoto H, Takeda M, Tamura T, Saijo N, Nishio K: Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res* 64: 9101-9104, 2004
 - 25) Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V, Carroll K: Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 366: 1527-1537, 2005
 - 26) Kelly K, Gaspar LE, Chansky K, Albain KS, Crowley J: Low incidence of pneumonitis on SWOG 0023: A preliminary analysis of an ongoing phase III trial of concurrent chemoradiotherapy followed by consolidation docetaxel and gefitinib/placebo maintenance in patients with inoperable stage III non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23s: 634s, 2005

The detection of *EGFR* mutation (L858R) by immunohistochemistry

Yoshinori SAKATA¹⁾, Tatsuo OHIRA¹⁾, Kimitoshi NAWA¹⁾,
Hidehiro INADA¹⁾, Junichi MAEDA¹⁾, Takamoto SAIJYO¹⁾,
Hidetoshi HONDA¹⁾, Masatoshi KAKIHANA¹⁾, Eiji NAKAJIMA¹⁾,
Masaharu NOMURA¹⁾, Masahiro Tsuboi¹⁾, Norihiko IKEDA²⁾,
Takashi HIRANO¹⁾, Harubumi KATO¹⁾

¹⁾First Department of Surgery, Tokyo Medical University

²⁾Respiratory Disease Center Mita Hospital, International University of Health and Welfare

Abstract

Objective. Gefitinib is one of the tyrosine kinase inhibitors and a molecular targeting agent which is effective for non-small cell lung cancer patients. Although 20 or more types of *EGFR* mutations have been reported, the deletion of Exon19 and the point mutation of Exon21 are said to account for 80-90% of all mutation cases. We tried to determine the efficacy of the detection of point mutation of Exon21 by an immunostaining technique which is more convenient method than the conventional direct sequence method.

Materials and Methods. We studied surgically resected tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC) obtained from 42 cases with postoperative recurrence and had been administered Gefitinib. The tissues were examined pathologically by immunohistochemical staining with the antibody for point mutation (L858R) of Exon21 and genetically by the direct sequence method, and the results were compared.

Results. Among the 42 cases, 7 cases (16.6%) were positive for immunostaining with the *EGFR* L858R antibody while 6 cases (14.3%) were found to have the mutation of Exon21 by the direct sequence method. All of the 6 samples where the mutation was detected by the direct sequence method were positive for the immunostaining method.

Conclusion. The immunostaining method was shown to have comparable sensitivity to the direct sequence method in detecting cases with Exon21 point mutation. The immunostaining method can be a low-cost alternative to the conventional method with similar efficacy and greater simplicity.

<Key words> Non-small cell lung cancer, Gefitinib, immunohistochemistry, *EGFR*, L858R

非小細胞肺癌における eIF-4E、VEGF、survivin の発現と臨床意義

名 和 公 敏¹⁾ 垣 花 昌 俊¹⁾ 坂 田 義 詞¹⁾
前 田 純 一¹⁾ 本 多 英 俊¹⁾ 中 嶋 英 治¹⁾
野 村 将 春¹⁾ 大 平 達 夫¹⁾ 坪 井 正 博¹⁾
池 田 徳 彦²⁾ 平 野 隆¹⁾ 加 藤 治 文¹⁾

¹⁾東京医科大学外科学第一講座

²⁾国際医療福祉大学三田病院呼吸器センター

【要旨】 転写調節因子翻訳制御の異常は細胞増殖や癌化と密接に関連している。我々は翻訳開始因子、増殖因子がヒト肺癌においてリンパ節転移や血行性転移に関与する可能性の有無を検討するべく、細胞蛋白合成の開始因子である eIF-4E、血管内皮細胞成長因子の VEGF、抗アポトーシス関連蛋白質の survivin の発現様式を免疫染色で調べ、リンパ節転移などの臨床予後の関連性を肺切除標本よりそれぞれの症例につき検討を行った。survivin および eIF-4E 共に染色陽性群と共に陰性群を比較すると 5 年生存率はそれぞれ 47.8% と 83.5% で両者染色陽性群の予後が有意に悪いことが認められた ($P=0.036$)。またこれらの因子の発現に関し、直接抗癌剤によって蛋白発現を制御しうるかどうか肺癌細胞株を用い検討を行った。シグナル伝達経路で翻訳開始因子 eIF-4E の上流に存在する m-TOR を抑制するラパマイシンを肺癌細胞株に投与することにより eIF-4E の活性は抑制された。またラパマイシンは細胞周期を G1 期で停止させることを確認したことより、ラパマイシンが肺癌の治療の一助となりうると考えられた。m-TOR 阻害剤を用い eIF-4E を抑制することで蛋白翻訳や細胞増殖を抑制しうることから eIF-4E は治療の標的因子として重要であること、また予後因子の指標の一つになりうると思われた。

はじめに

肺癌は初期症状が乏しく早期診断が困難であり、有症状で来院された症例は初診時にはすでに進行していることが多い。さらに、遠隔転移やリンパ節転移をきたしやすく上皮性腫瘍のなかでも治りにくい癌の一つである。肺癌の治療成績に影響する因子として原発巣の進展度とリンパ節、遠隔転移の有無が重要であり、病期分類は予後を反映する重要な因子である¹⁾。分子生物学的研究の進歩により発癌過程や癌の進展に

関係する遺伝子、蛋白が同定されるようになった。細胞周期、遺伝子複製に関わるさまざまな因子がこれらの過程に関与していることが明らかになってきており、これら因子の制御が癌の治療につながると考えられる。癌細胞が抗癌剤や放射線、修復不能な遺伝子損傷から回避して生存し続けていく防御機能にアポトーシスからの回避が挙げられる²⁾。アポトーシスを抑制する蛋白質のひとつに survivin が挙げられる。survivin とは 16.5 kDa からなる抗アポトーシス蛋白の一種で染色体 17q25 に存在する。種々の抗アポト-

2008 年 1 月 22 日受付、2008 年 2 月 5 日受理

キーワード：アポトーシス、蛋白翻訳調節、eukaryotic initiation factor-4E(eIF-4E)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1(4E-BP1)

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第一講座 垣花 昌俊)

Tel: 03-3342-6111 (5070) Fax: 03-3349-0326

シス蛋白の中でも最も単純な構造をしており、抗アポトーシス作用を主に規定する baculovirus IAP repeat (BIR) を1つだけ含む。inhibitor of apoptosis (IAPs) ファミリーに属する抗アポトーシス蛋白8種類のうちの1つでカスパーゼ-3、-7、-9に選択的に結合しカスパーゼの働きを阻害する¹⁶⁾他に、悪性腫瘍細胞の増殖、血管新生に関与していると考えられている¹⁷⁾。survivin は元来、胎生期正常細胞に発現しているが、胎生期を過ぎると survivin の転写は停止し、成人正常組織ではほとんど検出されないとされている¹⁸⁾。近年、大腸癌¹⁹⁾、悪性リンパ腫²⁰⁾など悪性腫瘍における survivin の発現が相次いで報告されており、肺癌においても Western blotting 解析によりその発現が認められ²¹⁾、生存期間との相関が示された²²⁾。survivin 発現量が正常組織と悪性腫瘍との間で差が大きいことから、腫瘍マーカーとしての意義と survivin 蛋白を直接阻害する抗腫瘍治療の分子標的となりうる可能性がある。癌抑制遺伝子である p53 は DNA に損傷を受けた細胞に対し細胞周期の進行を G1 期で停止させ DNA の修復を行うが、修復が不可能な細胞に対してはアポトーシスを誘導するか、あるいは不可逆的に細胞増殖を停止させる老化を誘導し、損傷 DNA を持った細胞の複製を防ぐ機能を持つ²³⁾。この p53 遺伝子は肺癌細胞においては変異を来しており肺癌の多段階発癌過程における早期の段階で重要な役割を果たしていると考えられている²⁴⁾。増殖因子を介するシグナル伝達経路のひとつとして知られているホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI-3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (m-TOR) シグナルの亢進により抗アポトーシス機構が癌細胞の保護に働く。悪性腫瘍において Akt の下流経路に存在する m-TOR を標的とした化学療法は 70-kDa 40S ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) と Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1) の二つの蛋白のリン酸化を阻害し、シグナル伝達経路を遮断することにより抗腫瘍効果を発揮する⁸⁾。細胞増殖は蛋白合成が開始されることで起こる。その際に eukaryotic initiation factor-4E (eIF-4E) が活性化されることで、mRNA による蛋白質の翻訳が開始する。肺癌において成長因子、翻訳開始因子 eIF-4E、抗アポトーシス関連蛋白が肺癌の予後に寄与すると考え、東京医科大学病院呼吸器外科で手術を施行した肺癌症例を対象として細胞蛋白質合成の開始因子 eIF-4E、血管成長因子 VEGF、アポトーシス抑制蛋白 survivin の発現様式

を免疫染色で調べ、これらの因子の発現頻度と予後との関連性について検討を行った。また eIF-4E を抑制することで細胞増殖を抑え、腫瘍の抗アポトーシス機構を回避できると仮説をたて、これら癌関連蛋白質を直接抑制する薬剤、エルロチニブ (erlotinib)、MS-275、PS-341、ラパマイシン (rapamycin) を用い実際に肺癌細胞株において蛋白質レベルの発現の有無を調べ腫瘍抑制に繋がるかを検討したので報告する。

対 象

2001年1月～2002年12月に手術を施行した肺癌切除症例で、病理学的に N0、N1、N2 と診断された症例を対象とし、インフォームドコンセントが得られた全 85 例を対象とした。対象症例の臨床的背景を Table 1 に示した。

方 法

試薬

エルロチニブ (erlotinib; LC Laboratories 社、Massachusetts, USA)、MS-275 (Schering AG 社、Berlin, Germany)、PS-341 (LC Laboratories 社、Massachusetts, USA)、ラパマイシン (rapamycin; Sigma 社、Missouri, USA)、抗 VEGF 抗体 (Abcam 社、Cambridge, UK)、抗 eIF-4E 抗体 (Cell-Signalling 社、Massachusetts, USA)、抗 survivin 抗体 (Cell-Signalling 社、Massachusetts, USA)、抗 caspase-3 抗体 (Cell-Signal-

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients with NSCLCs.

	No. of Patients (n=85)	%
Gender		
Males	50	59
Females	35	41
Age (yr)		
Median(range)	64(27~82)	
Histology		
Squamous cell carcinoma	22	26
Adenocarcinoma	53	62
Other	10	12
Stage at diagnosis		
I	32	38
II	22	26
III	30	35
IV	1	1

ling Technology 社、Massachusetts、USA)、抗 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体 (Cell-Signaling Technology 社、Massachusetts、USA)、抗 eIF-3h 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社、Santa Cruz、California USA)

A 臨床材料

1) 組織片作製

手術により採取された肺組織は直ちに 10% 緩衝ホルマリン溶液を用いて固定した後パラフィン包埋した。パラフィン包埋した組織を 4 μ m 厚に薄切し連続切片を作製した。

2) 免疫染色

薄切した標本を脱パラフィン後、3% 過酸化水素・メタノール液を用いて内因性ペルオキシダーゼを阻止し、0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 内で 10 分間マイクロウェーブ処理を行った後、抗原性を賦活化した。抗 VEGF 抗体 (X50) 抗 eIF-4E 抗体 (X50)、抗 survivin 抗体 (X100) を用いて染色を行った。その後 diaminobenzidine (DAB) を用いて発色を行い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

3) 免疫染色判定法

eIF-4E、survivin、VEGF は腫瘍細胞と薄切切片に含まれる非腫瘍細胞のうち上皮成分との発現度の差を比較した。腫瘍細胞に強い発現を認める症例を陽性例とした。腫瘍細胞と非腫瘍細胞に同程度あるいは非腫瘍細胞に強く発現している症例を陰性例とした。腫瘍細胞に強い発現を認める割合を全体の細胞と比較することでスコア化し 50% 以上のものを陽性例、25% 以下のものを陰性例とした。

4) 統計的処理法

eIF-4E、survivin および VEGF の発現形式と生存期間の関係を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。また、eIF-4E と survivin の組み合わせによる発現形式と生存期間の関係も Kaplan-Meier 法を用いて検討した。それぞれ、有意差は Log Rank (Mantel-Cox)(カイ 2 乗) 検定を用いて算出した。

B 肺癌細胞株

1) 細胞

ヒト由来の肺癌細胞株および中皮腫細胞株 NCI-H28、-H69、-H157、-H290、-H292、H358、-H417、-H513、-H647、-H661、H1334、-H1648、-H1793、-H2122、A549、ヒト由来腎癌細胞株 SKRC17、SKRC39、ヒト胎児由来腎細胞株 (human embryonic kidney cell line) F1293T-Rex を用いた。これら細胞株

を 5%FCS 添加 RPMI1640 培地を用い、5%CO₂、37°C で培養した。

2) 細胞周期の定量

1 \times 10⁶/ml の細胞を 100 mm ディッシュに播敷し、各抗癌剤を添加し 48 時間培養した後に細胞回収し、それらをサポニンおよび propidium iodide (PI) を用いて染色し、フローサイトメーターで定量化した。

3) ウェスタンブロット解析

肺癌細胞株に各抗癌剤を添加し培養した後に蛋白抽出溶液 (RIPA buffer; 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.2, containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin) に浮遊させ、超音波細胞破碎装置を使用して細胞膜を破碎した後、15,000 回転 10 分間遠心し、蛋白を回収した。得られた蛋白を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて解析を行った。抗体は抗 caspase-3 抗体 (X2000)、抗 PARP 抗体 (X2000)、抗 eIF-3h 抗体 (X500) をそれぞれ用いた。

4) m7-GTP-sepharose 沈降

上記 3) で得られた蛋白をさらに 7-Methyl GTP Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Science 社、New Jersey、USA) と共に 4°C 下に 3 時間沈降させた。そののち再び蛋白を回収し、得られた蛋白で SDS-PAGE を行い、4E-BPI および eIF-3h の発現解析を行った。

結 果

肺癌切除標本における各蛋白発現

正常肺および肺癌組織における蛋白発現を抗 eIF-4E 抗体、抗 survivin 抗体、抗 VEGF 抗体を用いて免疫組織化学法で解析した。eIF-4E、survivin、VEGF のそれぞれは、正常肺組織内では細気管支上皮細胞の管腔側のみが弱く染色され¹⁴⁾²⁰⁾³⁰⁾、それに対し肺癌組織では、多くの癌細胞の細胞質がびまん性に強く染色される。我々の検討においても同様の染色結果が示された (Fig. 1)。500 個の腫瘍細胞数を数え、染色陽性細胞数が 50% 以上の症例を陽性例とした場合 survivin の陽性例は 85 症例中 37 症例 (44%) で認められた。Log Rank (Mantel-Cox) (カイ 2 乗) 検定を用いて算出した有意確率は ($P < 0.148$) であった。eIF-4E の陽性例は、85 症例中 51 症例 (60%) で認められた。有意確率は ($P < 0.125$) であった。VEGF の陽性例は 85 症例中 40 例 (47%) で認められた。有意確率は ($P < 0.083$) であり、いずれにおいても有意差は認められなかった。



VEGF eIF-4E survivin

Fig. 1 Expression of eIF-4E (a), survivin (b), and VEGF (c) protein in non-small cell lung carcinomas. The normal epithelium cells showed only weak staining. All proteins are expressed in cytoplasm.

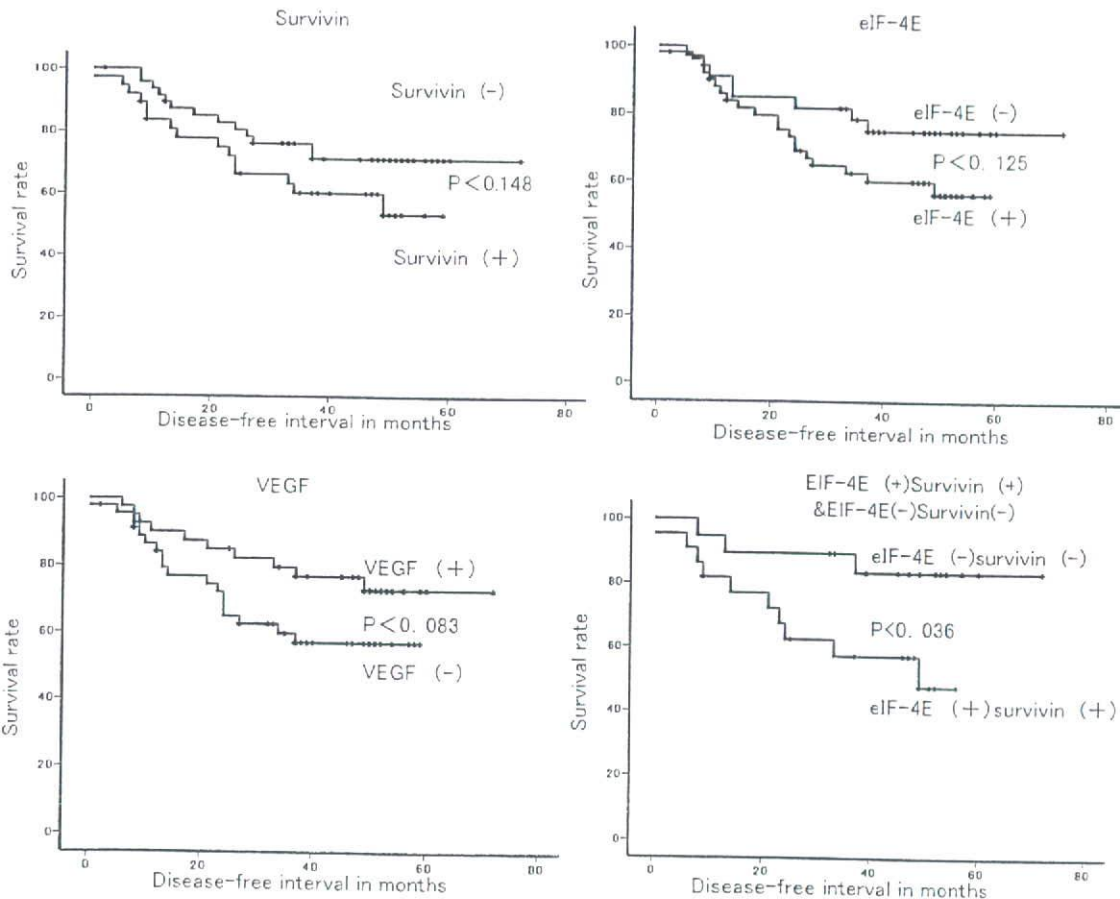


Fig. 2 Kaplan-Meier disease-free curves for (a) 48 survivin-negative and 37 survivin-positive, (b) 34 eIF-4E-negative and 51 eIF-4E-positive, (c) 45 VEGF-negative and 40 VEGF-positive, and (d) 19 both eIF-4E and survivin-negative and 22 both eIF-4E and survivin-positive in NSCLCs.

しかし、survivin と eIF-4E の組み合わせの中で survivin 陽性かつ eIF-4E 陽性 22 例 (26%) と survivin 陰性かつ eIF-4E 陰性例 19 例 (22%) との間における有意確率は ($P < 0.036$) であり、ともに陽性である群は陰性の群に比べて予後が悪い結果となった (Table 2)。

細胞周期解析およびアポトーシス解析

使用した抗癌剤、すなわちプロテアゾーム阻害薬

PS-341 は G2/M 期で⁷⁾、m-TOR 阻害薬ラパマイシン⁸⁾、HDAC 阻害薬 MS-275⁹⁾、チロシンキナーゼ受容体阻害剤エルロチニブ²⁵⁾ はそれぞれ、細胞周期を G1 期で停止することが知られている。H460、A549、H358 細胞株に対して、細胞周期の検討を行ったところ、ラパマイシン治療に対し、H460 細胞の G1 期は 29.12% から 68.59%、A549 細胞の G1 期は 44.95% から 77.20%、H358 細胞の G1 期は 38.15% から 81.50% と、

それぞれG1期の細胞の割合が増加する事を認めた (Table 3)。エルロチニブによる治療を行った細胞もG1期での細胞周期の停止を認めた (Table 3)。PS-341ではG2/M期の停止を顕著に認めなかった。MS-275においてはA549細胞を用い細胞周期の検討を行った。用量依存性にG1期停止の比率の増加を認めた (Fig. 3D)。ついでウェスタンブロット解析を用いてMS-275が細胞に対してアポトーシスを誘導している

かを検討した。検討はカスパー-3とPoly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の断片化の検出を行うことにより判定を行った。MS-275を2 μ M、5 μ M、10 μ Mと濃度を増加させると断片化するカスパー-3およびPARPの量の増幅を認めた。さらに5 μ Mにおいて治療後24時間、36時間、48時間治療した後に同様にカスパー-3とPARPの断片化を解析したところ、同様に時間依存的に断片化の増幅を認めた (Fig. 3E, F)。

Table 2 The results of immunohistochemistry staining.

category	No. of patients	%
survivin	(n=85)	
(+)	37	44
(-)	48	56
eIF-4E	(n=85)	
(+)	51	60
(-)	34	40
VEGF	(n=85)	
(+)	40	47
(-)	45	53
survivin-eIF-4E	(n=41)	
(+), (+)	22	54
(-), (-)	19	46

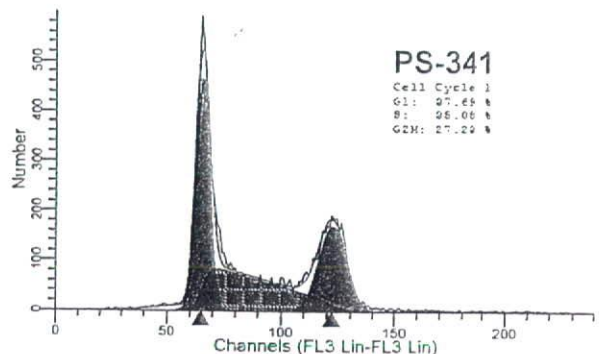
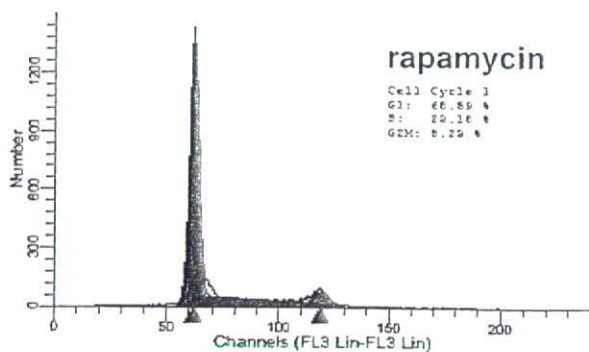
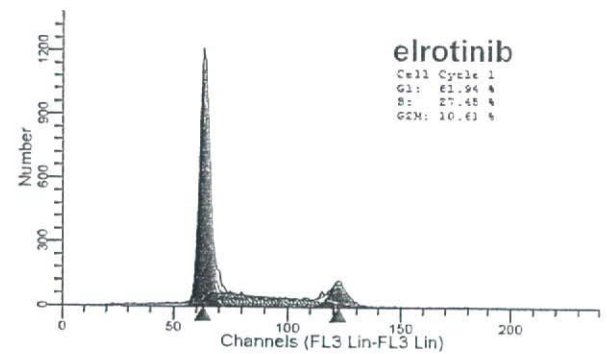
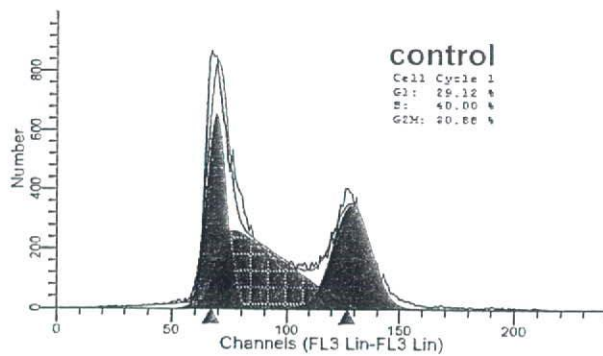
翻訳開始因子

各種の成長因子により活性化されるPI3K/Akt/mTORシグナルの亢進が悪性腫瘍細胞の増殖、抗アポトーシスに寄与すると報告されている¹⁰⁾。Aktの下流

Table 3 Cell cycle analysis

	H460 control	rapamycin	elrotinib	PS-341
G1 (%)	29.12	68.59	61.94	37.69
S (%)	40.00	23.18	27.45	35.08
G2/M (%)	30.88	8.23	10.61	27.23
	A549 control	rapamycin	elrotinib	PS-341
G1 (%)	44.95	77.20	73.89	45.90
S (%)	36.74	15.73	17.58	35.22
G2/M (%)	18.32	7.07	8.53	18.88
	H358 control	rapamycin	elrotinib	PS-341
G1 (%)	38.15	81.50	76.21	40.14
S (%)	35.33	12.32	15.81	34.46
G2/M (%)	26.52	6.18	7.98	25.40

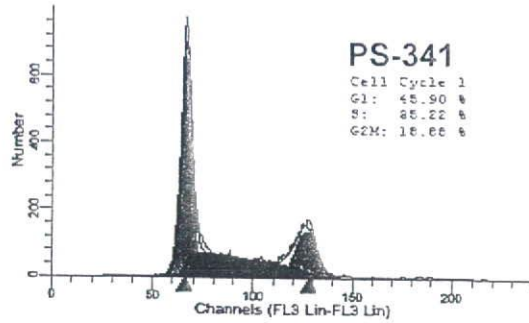
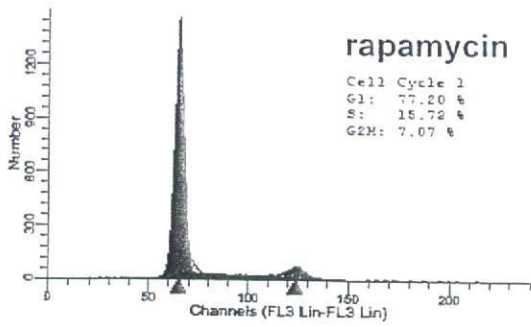
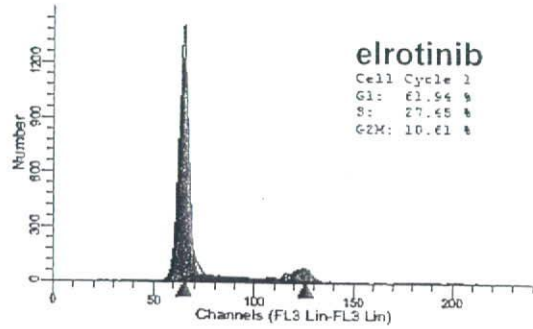
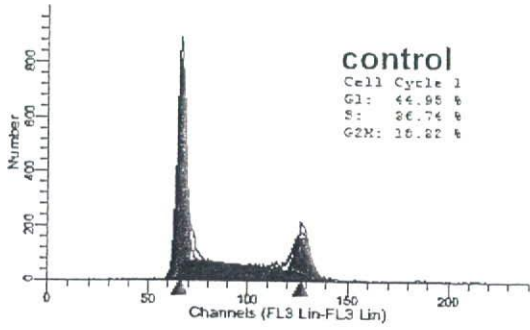
A. H460 cells



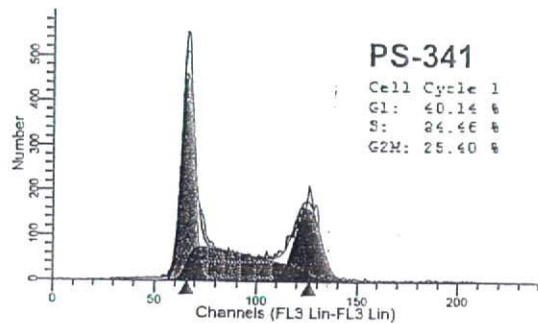
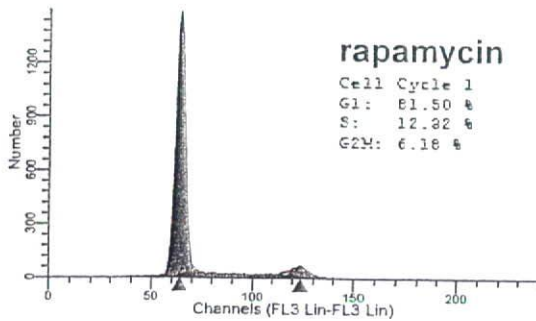
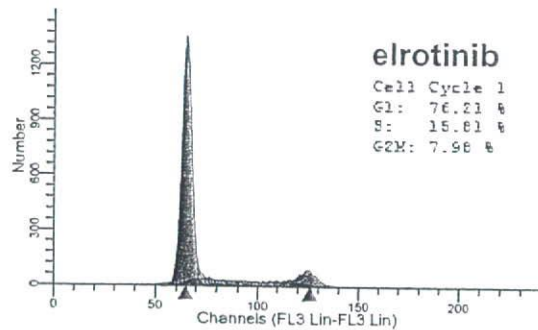
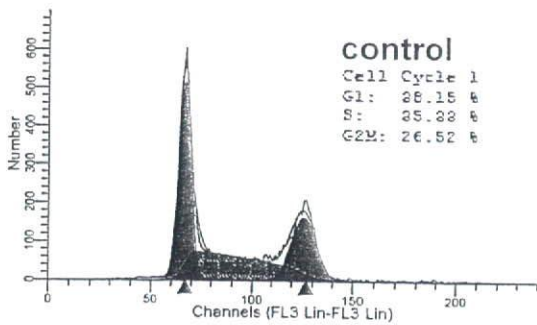
経路に存在する m-TOR はマクロライド系抗生物質のラパマイシンの標的蛋白質として同定され、p70S6K と 4E-BP1 をリン酸化するセリンスレオニン

キナーゼである。4E-BP1 は eIF-4E と結合し eIF-4E による転写を抑制しているが 4E-BP1 がリン酸化されると eIF-4E と離れ eIF-4E は eIF-4G、eIF-4A と

B.A549 cells



C.H358 cells



共に eIF-4F 複合体を形成しキャップ依存性の転写を開始する。ラパマイシンが m-TOR を抑制すると 4E-BP1 はリン酸化されないことより eIF-4F 複合体が形成されずキャップ依存性転写量は減少し、40S リボゾームに結合する eIF-3h もキャップ構造と複合体を形成することはない²³⁾。そこで、肺癌細胞株をラパマイシンに 72 時間接触させた後に回収し m7-GTP セ

ファロースビーズと共に沈降させ、4E-BP1 の出現量とキャップ構造と複合体を形成する eIF-3h 量を SDS-PAGE により観察した (Fig. 5)。(a) リン酸化 4E-BP1 量はラパマイシンにより減少した。(b) eIF-3h のキャップ構造への結合量は減少した。

D. A549 cells

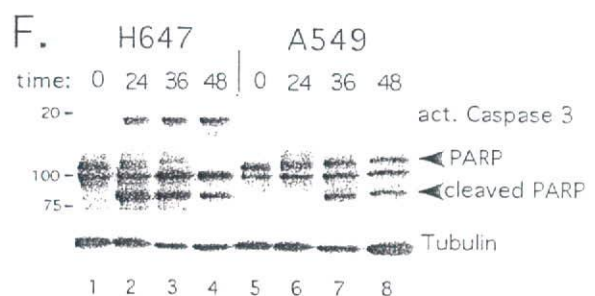
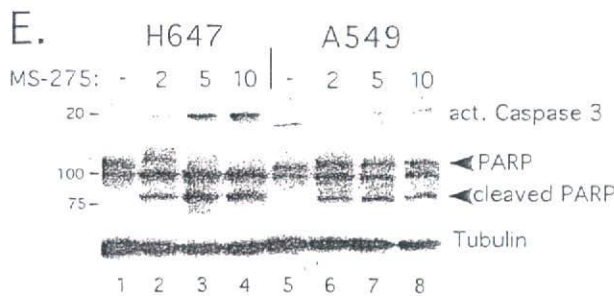
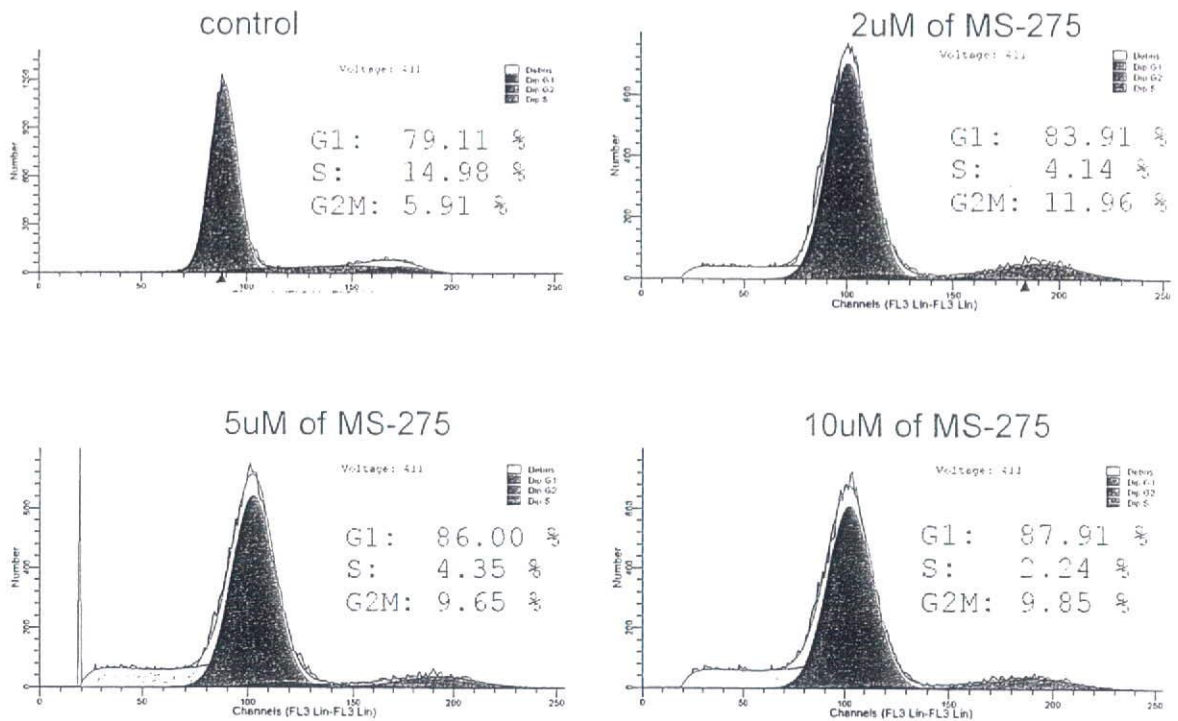


Fig. 3 Therapeutic agents induce cell growth arrest and apoptosis. (AtoC) Erlotinib and rapamycin induce G1 phase arrest in NSCLC cells but PS-341 does not induce G2/M phase arrest clearly. (D) A549 cells demonstrated an accumulation of G1 phase after 48 hours MS-275 exposure, and this accumulation is dose-dependent. A549 were treated for 48 hours with the indicated doses of MS-275. The indicated NSCLC cell lines were incubated with medium (controls), MS-275 (5 μM) rapamycin (10 nM) and erlotinib (10 μM) for 48 h, as indicated. The percentage of accumulation cells was determined by flow cytometry using dual staining with Saponin and propidium iodide. (E and F) MS-275 induces apoptosis in sensitive NSCLC cell lines. Two cell lines deemed moderately sensitive (H647, IC50=1.74 ± 0.3 μM) and resistant (A549, IC50=3.42 ± 0.9 μM) to MS-275 were examined for biochemical changes indicative of apoptosis. (E) Cultures were treated for 36 hours with the indicated doses of MS-275, then protein lysates analyzed by Western blot for activated caspase 3 and poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage. (F) Cell lines were treated for increasing times, as indicated, using 5 μM MS-275. Activation of caspase 3 and PARP cleavage was assayed as in (E). Tubulin provided loading controls.

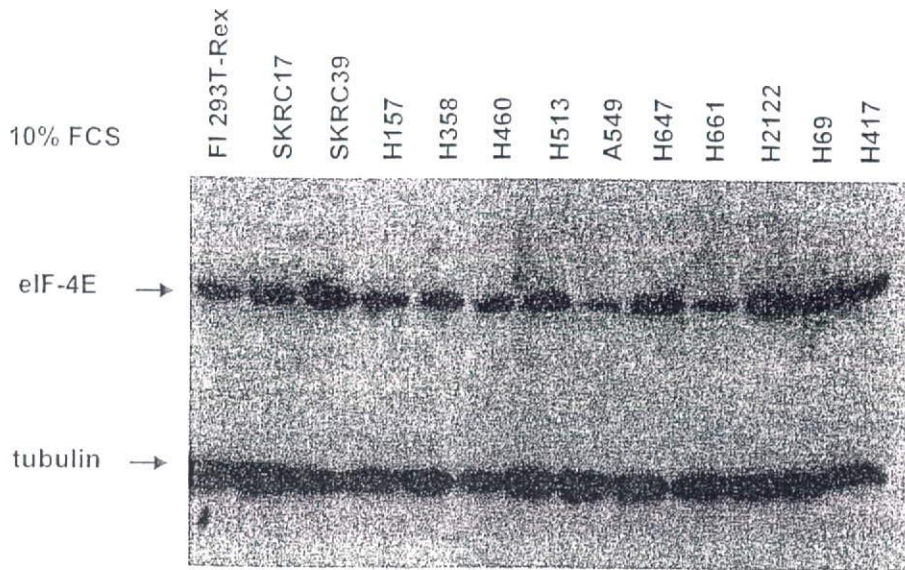


Fig. 4 eIF-4E expression in NSCLC cell lines. eIF-4E protein levels were measured in 13 cell lines, as indicated. Each lane contained 10 μ g of protein lysate from exponentially growing cells. SKRC17 and SKRC39 are renal cell carcinoma cells. HEK 293 is a human embryonic kidney cell line. A tubulin provided a loading control.

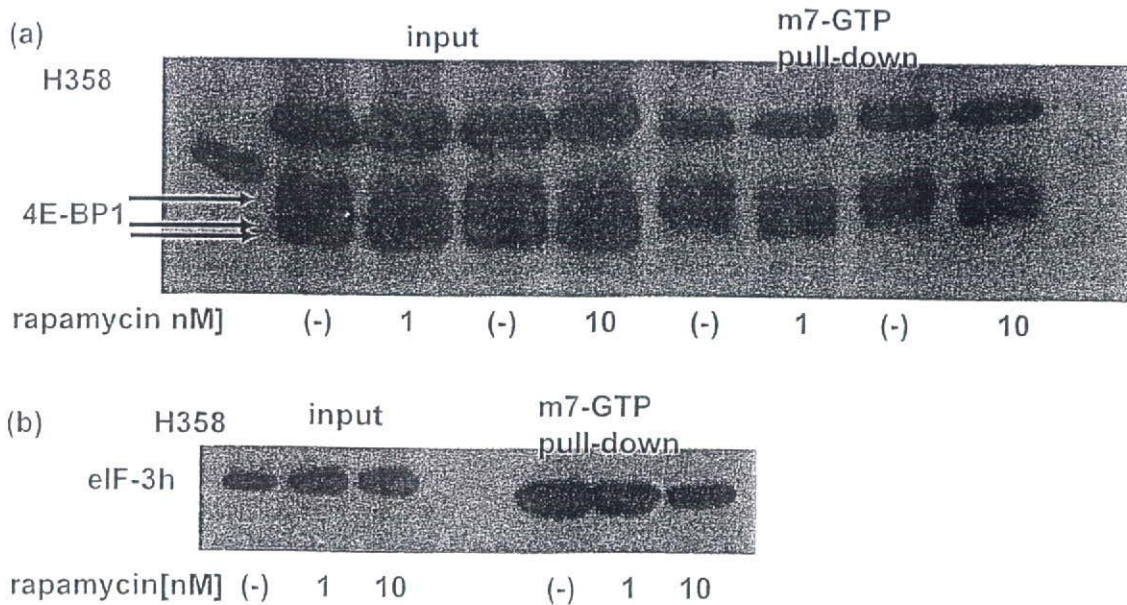


Fig. 5 rapamycin decreases the phosphorylation of 4E-BP1. (a and b) H358 cells were treated with vehicle (DMSO) or with increasing concentrations of rapamycin as indicated and harvested after 48 hours. Proteins were resolved by SDS electrophoresis and expression was examined by immunoblotting with antibodies specific for eIF-3h, and 4E-BP1. Cells were treated as described above and harvested after 48 hours. Protein expression was examined by immunoblotting with antibodies specific for eIF-3h and 4E-BP1. eIF-4E was affinity precipitated with m7GTP-sepharose 3 hours at 4°C after treatment. Affinity-precipitated proteins were resolved by SDS-electrophoresis and analyzed by immunoblotting with antibodies specific for eIF-3h and 4E-BP1.

考 察

全ての病期を含めた非小細胞肺癌の5年生存率は13%であるが、外科的に切除されたI期、II期のみで集計すると47%にまで改善する¹¹⁾。このことから外科的に肺癌を治療する方法は非小細胞肺癌の予後を左右

する重要な因子の一つとして挙げられる。病期は、T因子、N因子、M因子の組み合わせより成り立ち、I期で2通り、II期で3通りの組み合わせから成る。I期、II期の外科的切除例の半数以上が再発していることから、同じ病期でもTNM因子の組み合わせなど多様な予後因子が存在していることが予想され

る¹¹⁾。分子マーカーとして様々な蛋白、遺伝子が転移や予後の評価に用いられているが複数のマーカーの組み合わせが候補として挙げられている¹²⁻¹⁴⁾。治療の標的として、またマーカーとして両者に有用であるものが予後因子として評価しうるものと考え、その候補として増殖因子を介するシグナル伝達経路のなかで代表的なものの一つである PI3K/Akt/m-TOR シグナルに着目した。このシグナル伝達経路は、蛋白翻訳調節因子のみならず抗アポトーシス因子にも影響を及ぼしていることから、それらに関連する VEGF、survivin、eIF-4E を対象として予後との関連を検討した。肺癌切除標本における VEGF の免疫染色の結果と 5 年生存率との間に有意な相関関係は認められなかった。血管新生は発生、組織修復、炎症や腫瘍の進展など数多くの生理学的、病理的過程で重要な役割を果たしている。サイトカイン、成長因子、その他の多くのメディエーターが血管造成に関与している。組織の血管新生の間、内皮細胞は、細胞外マトリックス成分や他の内皮細胞に接着するが、これは血管造成には必須の過程である。血管内皮成長因子 (VEGF) は内皮細胞に特異的な分裂誘導物質であり、血小板由来成長因子 (PDGF) と約 20% 構造上の相同性を示す直接的メディエーターである。VEGF は *in vivo* で血管新生を誘導し、*in vitro* では内皮細胞の増殖を促進し、血管の浸透性を高める¹⁵⁾。血管新生のメディエーターによる内皮細胞の刺激、あるいは細胞接着分子を経由する内皮細胞の接着は細胞膜を貫通する様々のシグナル伝達メカニズムを活性化し、次いで毛細管形成を引き起こす。正常細胞の血管新生と同様に悪性腫瘍細胞は VEGF をはじめとする血管新生因子を産生し、血管内皮細胞の増殖および遊走を促進し、宿主血管を腫瘍内へ誘導し、血管を発達させることにより増殖を続ける¹⁵⁾。このことから血管新生は悪性腫瘍の増殖に不可欠であり、転移を起こす際の進入路となりうると思われる。今回対象とした症例の再発形式を詳細に検討し免疫染色結果との相関を比較する必要があると考えられた。survivin、eIF-4E 共に単独で染色陽性であったものでは予後に相関は認められなかったが、survivin と eIF-4E の両者とも染色陽性群と両者とも陰性群を比較すると両者とも陽性群において生存率が低下することが確認された。悪性腫瘍の発現過程においても、悪性腫瘍が生存し続けるためにも複数の因子を要することは間違いなく、一連のシグナル伝達経路において予後に相関する因子を確認できたことは

興味深い。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 MS-275 を培地に添加し肺癌細胞を培養したところ細胞は G1 期において細胞分裂を停止した。同時にウェスタンブロット解析にてアポトーシスの誘導が起きていることが確認された。survivin はカスパー-3 を阻害するが MS-275 によってカスパー-3 の活性が上昇していることから、MS-275 が survivin の活性を抑制することでカスパー-3 の活性を上昇させている可能性が考えられる。増殖因子を介し、細胞増殖、分化、細胞の走化性、血管新生などに関与しているシグナル伝達経路のひとつとして知られている PI-3K/Akt/m-TOR シグナルの亢進により抗アポトーシス機構が癌細胞の保護に働く¹⁰⁾²³⁾。PI-3K が活性化されるとホスファチジルイノシトール-3 リン酸 [PI(3, 4, 5)P₃] が産生され、[PI(3, 4, 5)P₃] はセリンスレオニンキナーゼである Akt と結合してその活性化を促進する。Akt の下流経路に存在する m-TOR はマクロライド系抗生物質のラパマイシンの標的蛋白質として同定され²³⁾、p70S6K と 4E-BP1 をリン酸化するセリンスレオニンキナーゼである²⁴⁾。Akt の下流経路に存在する m-TOR を標的とした化学療法はこの二つの蛋白質のリン酸化を阻害し、シグナル伝達経路を遮断することにより効果を発揮する⁸⁾²⁵⁾。多くの腫瘍細胞において cyclinD、p53、pRB、p16、p27 の異常や、PI-3K の活性化の亢進が観察されるので、m-TOR 阻害剤は有効な抗腫瘍薬剤として期待できる。遺伝子の発現には DNA から mRNA への遺伝情報の転写と mRNA からタンパク質への翻訳の二つの過程がある²⁶⁾。これまでは主に、転写レベルでの研究が多くされてきたが、翻訳レベルでの調節も細胞の増殖、分化に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた²⁾²⁷⁾。悪性腫瘍細胞が VEGF などの成長因子や cyclin D1 によって刺激を受けると蛋白合成が開始されるが、その蛋白質の翻訳が、eIF-4E と mRNA の 5'-末端に存在するキャップ構造 (7mGTP) と結合することにより開始される²⁸⁾²⁹⁾。eIF-4E は普遍的な蛋白翻訳の開始因子であるが、翻訳制御の異常と、キャップ依存性の翻訳開始因子による蛋白翻訳量の増加を調べることが腫瘍発育のメカニズムとして重要な課題と考えられ、Lazaris-Karatzas ら³⁰⁾ により eIF-4E は proto-oncogene であることが指摘された。この結果を踏まえ、eIF-4E が多くの乳癌、結腸癌および頭頸部癌に過剰発現し、腫瘍の悪性度や患者の予後とも相関すると報告された³¹⁾。さらに eIF-4E の発現量の増加は腫瘍の

増殖を助け、抗アポトーシスに寄与することも指摘された³²⁻³⁴⁾。m-TOR 阻害剤であるラパマイシンを培地に添加し肺癌細胞を培養したところと G1 期に細胞周期は停止した。さらにラパマイシンは蛋白質合成開始因子である eIF-4E の翻訳開始を抑制する 4E-BP1 のリン酸化量を減少させた。mRNA キャップ構造に eIF-3h は結合し mRNA の転写翻訳を担うが²⁴⁾、ラパマイシンの 4E-BP1 リン酸化抑制効果により eIF-3h のキャップ構造への結合を抑制した。成長因子の受容体のチロシンリン酸化酵素を阻害する薬剤は肺癌において目覚ましい治療効果をもたらすが、その効果の一つに細胞を G1 期に停止させることが挙げられる³⁵⁾³⁶⁾。チロシンリン酸化阻害剤であるエルロチニブを用いた実験で我々はエルロチニブが肺癌細胞株を G1 期に停止させることを確認した。このことよりエルロチニブは成長因子から始まるシグナル伝達経路を停止させその下流の m-TOR からの蛋白質翻訳開始因子へのシグナルも抑制しうることを示唆された。我々の免疫染色の結果と予後の関連性を比較すると、eIF-4E および survivin 発現が予後に寄与しうることから、肺癌に対する化学療法の薬剤の選択として、アポトーシスを誘導する薬剤と m-TOR 阻害剤との組み合わせが、肺癌において新しい抗癌剤治療の可能性として期待しうるかもしれないと考えられた。また m-TOR 阻害剤を用い eIF-4E を抑制することにより、蛋白質翻訳や細胞増殖を抑制しうることから eIF-4E は治療の標的因子として重要であること、かつ、予後因子の指標の一つになりうると思われた。

謝 辞

本研究の一部は、財団法人東京医大がん研究事業団がん研究助成金の研究助成により行われたことを記しここに謝意を表します。また本研究の免疫染色を遂行するにあたり、当教室の龔雲波先生より多大な尽力を頂いたことをあわせて深謝致します。

文 献

- 1) Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, Nakanishi Y, Tsuchiya R, Shimokata K, Inoue H, Nukiwa T, Miyaoka E: A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 3: 46-52, 2008
- 2) Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000
- 3) Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310, 2000
- 4) Sengupta S, Harris CC: p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 44-55, 2005
- 5) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246: 491-494, 1989
- 6) Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, Pilotti S, Cariani CT, Pastorino U, Porta GD, Pierotti MA: Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* 52: 6079-6082, 1992
- 7) Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R: Mechanisms of Proteasome Inhibitor PS-341-induced G2-M-Phase Arrest and Apoptosis in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res* 9: 1145-1154, 2003
- 8) Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ: p53/p21 cooperate in enforcing rapamycin-induced G1 arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res* 61: 3373-3381, 2001
- 9) Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O: A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4592-4597, 1999
- 10) Nicholson KM, Anderson NG: The Akt/PKB signaling pathway in human malignancy. *Cell signal* 14: 381-395, 2002
- 11) Flehinger BS, Kimmel M, Melamed MR: The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer; Implication for screening. *Chest* 101: 1013-1018, 1992
- 12) Strauss GM: Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 11: 409-434, 1997.
- 13) Moldvay J, Scheid P, Wild P, Nabil K, Siat J, Borrelly J, Marie B, Farré G, Labib T, Pottier G, Sesboué R, Bronner C, Vignaud JM, Martinet Y, Martinet N: Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 1125-1134, 2000
- 14) Mineo TC, Ambrogio V, Baldi A, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B, Tonini G: Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 57: 591-597, 2004
- 15) Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C: Macrophages and angiogenesis. *J*

- Leukoc Biol 55 : 410-422, 1994
- 16) Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiere DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC : IAP-Family Protein survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anti-cancer Drugs. *Cancer Res* 58 : 5315-5320, 1998
 - 17) Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL : Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology* 2 : 1-10, 2001
 - 18) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC : A novel anti-apoptotic gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3 : 917-921, 1997.
 - 19) Kawasaki H, Altieri DC, Lu C-D, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N : Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 58 : 5071-5074, 1998
 - 20) Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ : Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 96 : 1921-1925, 2000
 - 21) Kuo PC, Liu HF, Chao JI : survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 279 : 55875-55885, 2004
 - 22) Shinohara ET, Gonzalez A, Massion PP, Chen H, Li M, Freyer AS, Olson SJ, Andersen JJ, Shyr Y, Carbone DP, Johnson DH, Hallahan DE, Lu B : Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 103 : 1685-1692, 2005
 - 23) Chiu MI, Katz H, Berlin V : RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 12574-12578, 1994
 - 24) Hay N, Sonenberg N : Upstream and downstream of m-TOR. *Genes Dev* 18 : 1926-1945, 2004
 - 25) Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB : rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res* 55 : 1982-1988, 1995
 - 26) Crick F : Central dogma of molecular biology. *Nature* 227 : 561-563, 1970
 - 27) Clemens MJ, Bommer UA : Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol* 31 : 1-23, 1999
 - 28) Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, and Park CS : Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor-behavior and growth. *J Surg Oncol*, 84 : 166-172, 2003
 - 29) Stoneley M, Willis AE : Cellular internal ribosome entry segments : structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23 : 3200-3207, 2004
 - 30) Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N : Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345 : 544-547, 1990
 - 31) De Benedetti A, Graff JR : eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23 : 3189-3199, 2004
 - 32) Li S, Sonenberg N, Gingras AC, Peterson M, Avdulov S, Polunovsky VA, Bitterman PB : Translational Control of Cell Fate: Availability of Phosphorylation Sites on Translational Repressor 4E-BP1 Governs Its Proapoptotic Potency. *Mol Cell Biol* 22 : 2853-2861, 2002
 - 33) Graff JR, Zimmer SG : Translational control and metastatic progression: Enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis* 20 : 265-273, 2003
 - 34) Zimmer SG, DeBenedetti A, Graff JR : Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res* 20 : 1343-1351, 2000
 - 35) Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, Coldren C, Barón A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna J, Bunn PA Jr : Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin Cancer Res* 12 : 7117-7125, 2006
 - 36) Ling YH, Li T, Yuan Z, Haigentz M Jr, Weber TK, Perez-Soler R : Erlotinib, an effective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27 (KIP1) up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 72 : 248-258, 2007

Clinical analysis of resectable non-small cell lung cancers and determination the level of eIF-4E, survivin and VEGF

Kimitoshi NAWA¹⁾, Masatoshi KAKIHANA¹⁾, Yoshinori SAKATA¹⁾,
Junichi MAEDA¹⁾, Hidetoshi HONDA¹⁾, Eiji NAKAJIMA¹⁾,
Masaharu NOMURA¹⁾, Tatsuo OHJIRA¹⁾, Masahiro TSUBOI¹⁾,
Norihiko IKEDA²⁾, Takashi HIRANO¹⁾, Harubumi KATO¹⁾

¹⁾First Department of Surgery, Tokyo Medical University Faculty of Medicine

²⁾Respiratory Disease Center Mita Hospital, International University of Health and Welfare

Abstract

The expression of eIF-4E, survivin and VEGF was immunohistochemistry investigated in 85 surgically resected non-small cell lung cancers (NSCLCs), and the results of expression status were correlated with patient clinical data. Using Kaplan-Meier survival curves, for the survivin negative and eIF-4E negative staining had a significantly better survival than either the survivin positive and the eIF-4E positive staining group (83.5% versus 47.8%, $P=0.036$). We hypothesized that the induction of prohibiting the PI3K/AKT/m-TOR signaling pathway may lead to reduce tumor progression. We demonstrated that the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (erlotinib), m-TOR inhibitor (rapamycin), and histone deacetylase inhibitor (MS-275) induced cell growth inhibition in human NSCLCs cells were accompanied by G1/S phase arrest. We showed the suppression level of inhibitory eIF-4E binding protein (phospho-4E-BP1) rapamycin. This immunohistochemical study suggests that both eIF-4E and survivin may be a therapeutic target and a marker of tumor recurrence. Furthermore, the results provide insights into the cell cycle effects of erlotinib and rapamycin may be used as potential surrogate endpoints of drug action in clinical studies.

〈Key words〉 apoptosis, translation initiation, eukaryotic initiation factor-4E (eIF-4E), vascular endothelial growth factor (VEGF), Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1)

Comparative genomic hybridization 法と genomic DNA microarray 法による 肺癌細胞株遺伝子異常の比較解析

緒方 昭彦¹⁾ 中村 治彦²⁾ 保坂 誠¹⁾
 佐治 久¹⁾ 萩原 優¹⁾ 川崎 徳仁¹⁾
 池田 徳彦³⁾ 加藤 治文¹⁾

¹⁾東京医科大学外科学第一講座
²⁾国際医療福祉大学熱海病院呼吸器外科
³⁾国際医療福祉大学三田病院呼吸器センター

【要旨】 肺癌細胞株から抽出した DNA を検体として comparative genomic hybridization (CGH) 法と genomic DNA microarray 法による肺癌細胞株遺伝子異常の比較解析を行った。

解析には、非小細胞肺癌由来である PC-1、PC-3、PC-7、PC-10、PC-14 の 5 種類を用い、これら細胞株から抽出した DNA を CGH 法と genomic DNA microarray 法で遺伝子解析を行った。今回使用した DNA チップはヒト癌において増幅が報告された 59 種類の遺伝子をプローブとした。

増幅を両者で認めた癌遺伝子は PDGFRA, EGFR, PGY1, MET, H-ras, PAK1 であった。

二法による解析結果は部分的な一致は示したが、完全な一致とはならなかった。この二法による遺伝子異常の解析はそれぞれ臨床応用できると考えられた。

はじめに

近年、ヒトゲノム解析の進歩により、癌の遺伝子異常が次々と明らかになり、癌が遺伝子病であると考えられるに至った。癌細胞においては、正常な増殖制御が失われており、細胞内のシグナル伝達系の異常をはじめ、細胞周期制御にかかわる遺伝子、癌抑制遺伝子、DNA 修復遺伝子などの変異が原因となって発生、進展すると考えられている¹⁻³⁾。肺癌における遺伝子異常の報告は主として進行肺癌や樹立された肺癌細胞株を用いた遺伝子解析で同定されてきた⁴⁾⁵⁾。主たる報告として、癌遺伝子では MYC、K-ras、EGFR 癌遺伝

子などの活性化を高頻度に認める⁶⁾⁷⁾。癌抑制遺伝子としては、第 3 番染色体短腕上の fragile histidine triad (FHIT)、RASSF1A、レチノイン酸レセプター β や第 11 番染色体長腕上の TSLC1、p53、Rb などの不活化が高頻度に認められるとの報告がある⁸⁾⁹⁾。

CGH 法はゲノム全体の DNA コピー数の増減を簡便に検出出来る手法で、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法の応用として 1992 年に Kallioniemi らによって開発された技術である¹⁰⁻¹²⁾。検索対象である癌細胞から抽出した高分子 DNA と正常細胞から抽出した DNA をそれぞれ別々の蛍光色素で標識し、両者を正常ヒト中期染色体標本に対して競合的にハイ

2008 年 1 月 23 日受付、2008 年 2 月 6 日受理

キーワード: comparative genomic hybridization (CGH) 法、genomic DNA microarray 法、肺癌細胞株、癌遺伝子、癌抑制遺伝子

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第一講座 緒方 昭彦)

Tel: 03-3342-6111 内線 (5070) Fax: 03-3349-0326

ブリダイズさせることで、各染色体領域の癌細胞 DNA コピー数の変化を蛍光強度比として検出する。癌細胞 DNA を緑色、正常 DNA を赤色に標識すると DNA コピー数増加領域は緑色に、コピー数減少領域は赤色に染色される。これらを、画像解析装置を用いて解析し、増幅と欠失を定量化する。

一方、genomic DNA microarray 法は Brown らが 1996 年に発表した¹³⁾。スライドガラス上にプローブとなる DNA 断片を微小なスポットとして配列し、これに対して異なる蛍光色素で標識した 2 種類の DNA を競合的にハイブリダイズさせる。CGH 法の原理と同様に癌細胞 DNA を緑色で標識し正常 DNA を赤色で標識すれば専用の解析装置により、スポットの発する蛍光強度比から癌細胞の有する遺伝子コピー数の増減が検出できる。この方法の特徴は一度の実験で最大数万もの遺伝子を解析出来る点である。

本研究においては、上記の二つの手法を用いて、教室で樹立し継代中の肺癌細胞株を対象として、DNA コピー数の異常を染色体領域別に検出可能な comparative genomic hybridization (CGH) 法と、同様に個別の遺伝子コピー数の変化を検出可能な genomic DNA microarray 法の二法により解析し両方法を比較検討することを目的とした。

研究材料および方法

解析細胞株：対象とした肺癌細胞株は我々の教室で樹立した腺癌株 3 種、PC-3、PC-7、PC-14 と扁平上皮癌株 2 種、PC-1、PC-10 である¹⁴⁾。

DNA 抽出： 1×10^7 個の細胞を TEN 緩衝液 (10 mM Tris、10 mM EDTA、100 mM NaCl、pH 8.0) に浮遊させ最終濃度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように proteinase K、65°C で 1 時間、37°C で一晩、プロテアーゼ処理を行った。この溶液に等量のフェノール・クロロホルム (1:1) 混液を加え混和した後、室温で 3,000 rpm、10 分間の遠心分離し、上層に等量のクロロホルムを加え 70% エタノール中で脱塩し、2 倍量の 99.5% エタノールを加え、緩やかに攪拌して高分子 DNA を析出させ、遠沈採取した DNA を TEN 緩衝液に溶解して検体とした。

Comparative genomic hybridization (CGH) 法

DNA を蛍光色素で標識した。肺癌細胞株から抽出した DNA を SpectrumGreen[®] (Vysis, USA) で、正常ヒト DNA を SpectrumRed[®] (Vysis, USA) で標識した。すなわち、DDW 7.5 μl 、癌細胞 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10

μl に対して 0.2 mM 蛍光標識 deoxyuridine triphosphate (dUTP) 5 μl 、0.1 mM deoxythymidine triphosphate (dTTP) 5 μl 、deoxynucleotide triphosphate 混合液 (dNTP mix) 10 μl 、10 倍希釈 nick translation 緩衝液 5 μl 、nick translation 酵素 10 μl を加えて総量 50 μl とし、攪拌後、15°C で 3 時間反応させた後、70°C 10 分間加温して酵素を失活させた。

Spectrum Green 標識検体 DNA 200 ng (10 μl)、Spectrum Red 標識ヒト正常ゲノム DNA 100 ng (1 μl)、ヒト Cot-1 DNA 10 ng (10 μl)、3M 酢酸ナトリウム 2.1 μl 、100% エタノール 52 μl 混和後、4°C、12,000 rpm で 30 分間遠沈し、DNA を沈殿させ、これをプローブ DNA とした。これに CGH 用 hybridization 緩衝液 (Vysis, USA) 7 μl 、蒸留水 3 μl を加え混和し、73°C で 5 分間加温しあらかじめ 70% formamide 溶液中で 73°C、5 分間反応後アルコール系列で脱水、風乾したヒト正常染色体分裂中期標本スライドと反応させた。37°C で 72 時間反応させた後、50% formamide 溶液中で 45°C、10 分間づつ 3 回洗浄し 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液で DNA を対比染色しカバーガラスをかけて検体スライドとした。画像は OLYMPUS 社の BX50 で取り込み画像解析システム CytoVision[™] System (Applied Imaging LTD, UK) で解析した。緑色と赤色の蛍光強度比が 1.2 以上をコピー数の増加、0.8 以下をコピー数の減少領域と判定した。

Genomic DNA microarray 法

肺癌細胞株から抽出した DNA を先述した nick translation 法を用いて Alexa-488-5-dUTP (Molecular Probes, USA) で緑色に、正常ヒトゲノムは Alexa-594-5dUTP で赤色に蛍光標識した。これら両標識 DNA を混和し、CGH 法と同様の前処置を行い、プローブ DNA とした。

AmpliOnc I Microarray (Vysis, USA) と上記プローブ DNA を 37°C で 18 時間反応させた後 50% formamide 溶液中で 40°C、10 分間づつ 3 回、saline sodium citrate (SSC) で室温、5 分間、4 回洗浄した。

Microarray を乾燥させ、DAPI IV 溶液 (Vysis, USA) を滴下しカバーガラスで封入して、検体スライドとした。

スライドガラス上の各スポットの緑色と赤色の蛍光強度比はこの microarray 専用で作製された GenoSencer Reader (Vysis, USA) で解析し、緑/赤比 1.5 以上を増幅と判定した。なおこのシステムでは欠

失は感度に問題があるため判定対象としなかった。

今回使用した DNA チップ上には人の癌において増幅が報告されている 59 種類の癌遺伝子をプローブ DNA として解析した。

判定

CGH 法では緑色と赤色の蛍光強度の比 (r) から各染色体領域のコピー数の増減を判定する。 $r < 0.8$ ではコピー数の減少と判定し、 $r > 1.2$ ではコピー数の増加と判定¹¹⁾¹⁵⁾。

Genomic DNA microarray 法では $r > 1.5$ で増幅と捕らえ判定した¹⁵⁾¹⁶⁾。

結 果

1. CGH 法による解析結果

5 種肺癌細胞株の CGH 法による解析結果をマッピングした (Fig. 1)。

各肺癌細胞株の染色体上の DNA コピー数異常領域を増幅 (Table 1A)、および欠失 (Table 1B) に分けて示した。

増幅を示した染色体異常領域には、これまで報告さ

れている肺癌に關与する主な癌遺伝子の *c-kit*(4q12)、*EGFR*(7p12)、*c-Myc*(8q24)、*cyclinD1*(11q13)、*K-ras*(12p12) などの癌遺伝子を複数の肺癌細胞株で認めた。*c-kit*(4q12) は PC-1、PC-3、PC-7 に認めた。*EGFR*(7p12) は PC-7、PC-10 で認めた。*c-Myc*(8q24) は PC-7、PC-14 で認めた。*cyclinD1*(11q13) は PC-1、PC-14 で認めた。*K-ras* (12p12) は PC-3、PC-7、PC-14 で認めた。その他、増幅を示した染色体異常領域で、複数の細胞株に共通してみられた領域は 3p11、3q24、6p25、7p22、8p23、9q34、11p15、13q34、16q11、16q21 などであった。

欠失を示した染色体異常領域には、これまで報告されている肺癌に關与する主な癌抑制遺伝子の *RASSF1A*(3p21)、*BLU*(3p21)、*SEMA3B*(3p21) は PC-7 に認めた。*p16^{INK4a}*、*p14^{ARF}* (9p21) は PC-14 に認めた。*PTEN* (10q23) は PC-14 に認めた。*PPP2R1B* (11q23)、*TSLC1* (11q23) は PC-7 に認めた。*SMAD2* (18q21)、*SMAD4* (18q21) は PC-3、PC-7、PC-14 に認めた。*LKB1/STK118* (19p13) は PC-3、PC-10 に認めた。その他、欠失を示した染色体異常領域で、複数



Fig. 1 Summary of the karyotypes of non-small cell lung cancer cell lines based on various CGH analyses. Vertical lines on the left of each chromosome ideogram represent losses, whereas those on the right correspond to gains.