

200907010A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(ヒトゲノムテラーマイド研究事業)

「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子
診断法および治療法の開発」

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成22(2010)年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(ヒトゲノムテラーメイド研究事業)

「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子
診断法および治療法の開発」

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成22(2010)年5月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「EML4-ALK 陽性肺がん診断システムの開発」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	5
2.	「EML4-ALKトランスジェニックマウス作成」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・呼吸器内科学 杉山幸比古-----	8
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	10
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	12

「新規融合型がん遺伝子を標的とした肺がんの分子診断法および治療法の開発」
に関する研究

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：我々は完全長 cDNA を効率的に発現させるレトロウィルス cDNA 発現ライブラリー作成法を開発し、これを用いて肺腺がん切除検体から新たな融合型チロシンキナーゼ EML4-ALK を発見した。本研究計画において我々は EML4-ALK が同遺伝子陽性肺がんの主たる発症原因であることを示すと共に、同遺伝子陽性肺がん患者の正確かつ効率の良い診断法開発を目指した。まず EML4-ALK を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。EML4-ALK 発現トランスジェニックマウスは生後僅か 2～3 週で両肺に数百個の肺腺がんを発症したことから、EML4-ALK は例外的に強力ながん遺伝子であることが証明された。また本マウスに ALK 阻害剤を投与することでこれら肺腺がんは速やかに消失し、EML4-ALK が有効な分子標的治療対象であることも併せ確認された。さらに EML4-ALK 陽性肺がんの分子診断法開発のために、EML4 が ALK 遺伝子エクソン 20 に in-frame で融合している全てのエクソンとの間の融合 cDNA を検出する multiplex RT-PCR 法を開発し、これを用いて肺がんの切除検体 360 例におけるスクリーニングを行った。その結果非小細胞肺がんの約 5% に同遺伝子が存在することが示された。またパラフィン包埋標本からの診断を可能にするために、高感度免疫組織染色法 intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法を開発し、実際の臨床検体で大規模スクリーニングを行った。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
杉山幸比古	自治医科大学医学部呼吸器内科学・教授

ErbB2 抗体であるトラスツズマブ（商品名ハーセプチン）が有効なことなどは何れも「悪性腫瘍の主要ながん遺伝子を同定し、その阻害剤を開発すること」が治療上極めて重要であることを明示している。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、日本と米国だけでも年間 20 万人以上が肺がんのために亡くなっている。旧来の抗がん剤による化学療法は殆ど有効でなく、肺がん患者への延命効果が証明された治療剤は少ない。近年、主にアジア人の若年非喫煙者に発症する肺がんの 2～4 割において上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異が認められ、これら肺がんに対して EGFR 阻害剤であるゲフィチニブ（商品名イレッサ）が著効を示すことが報告された。一方 BCR-ABL チロシンキナーゼを有する慢性骨髄性白血病（CML）に ABL 阻害剤である STI-571（商品名グリベック）が著効を示すこと、また ErbB2 チロシンキナーゼの遺伝子重複がある乳がん

に於いて主任研究者らは肺がんにおける主要原因遺伝子を同定する目的で、独自に組換えレトロウィルスを用いた臨床検体のがん遺伝子スクリーニング法を開発した。我々の方法により喫煙歴を有する 62 才男性肺腺がん患者外科切除検体より cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス 3T3 細胞を用いて形質転換フォーカスのスクリーニングを行った結果、新規がん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した（Nature 448: 561-566）。これはちょうど BCR-ABL のように、肺がんにおいても染色体転座の結果活性化型チロシンキナーゼが生じることを示したものであり、今日の CML の診断と治療に BCR-ABL が本質的な役割を担うように、肺がんにおいても EML4-ALK の知見が臨床的に極めて大きな意味を持つことを意味している。

本研究計画で我々は、EML4-ALK の肺がん原因遺伝子としての役割を証明すると

共に、その下流シグナルの同定、さらに EML4-ALK を標的とした分子診断法および分子標的治療法の開発を目指す。

B 研究方法

1) 診断システムの開発

ALK 遺伝子のエクソン 20(チロシンキナーゼ領域の上流)に in-frame で融合しうる EML4 エクソンは計 6 種類存在する。そこでこれらのどの領域から ALK へ融合した cDNA も、全て検出可能なように複数の forward primer を組み合わせた multiplex RT-PCR を開発した。これを用いて大規模に肺がん患者喀痰および肺がん切除検体を用いた RT-PCR 解析を行った。

さらに免疫組織染色法により EML4-ALK を検出可能にするべく、1 次抗体に加えて、抗イディオタイプ 2 次抗体を添加する intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法を開発した。iAEP により上記 RT-PCR 陽性例を全て検出可能にする抗 ALK 抗体を選別し、iAEP 法によるパラフィン包埋標本の大規模スクリーニングを行った。

2) トランスジェニックマウスの作成

Surfactant protein-C (SPC)遺伝子は II 型肺胞上皮特異的に発現するタンパクであり、そのプロモーターフラグメントは肺胞上皮特異的にトランスジーンを発現させるのに有効である。そこで SPC 遺伝子プロモーターの下流に EML4-ALK cDNA を挿入した発現ユニットを作製し、これらを用いたトランスジェニックマウスを作成する。また得られたマウスの病変の評価には、小動物用 CT 装置を用い、系時的に腫瘍サイズ・分布の変化を観察する。また経口接種可能な ALK 阻害剤をマウスに投与しその治療効果を検証する。さらに長期観察後の、肺がんの遠隔転移の有無についても検討した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

1) EML4-ALK陽性肺がん診断システムの開発

EML4遺伝子のエクソン2、11、17、24を始め複数のエクソン上に設置した計8種類のforward primerと、ALKのエクソン20乗に設置したreverse primerを用いた RT-PCRプロトコルを開発し、これを用いて多数の肺がん検体(喀痰+生検標本)からRNAを抽出してPCR解析を行った。計253種類の肺腺がんを解析したところ11検体にEML4-ALKを検出した。さらにiAEP法を用いた免疫組織染色法により、過去のパラフィン包埋検体のみならず新規患者症例についても検討を行った。その結果、8例のALK陽性例を検出することに成功した。その中にはこれまで知られていない新たなEML4-ALKバリエーションが2種類含まれており、いずれについても著明ながん化能を確認した。

さらに上記 ALK 陽性例中には EML4-ALK RT-PCR 陰性例が存在しており、詳細な解析の結果、同症例は ALK の新たな融合型がん遺伝子である KIF5B-ALK を有することが明らかになった。KIF5B-ALK もがん化能を有する融合型キナーゼであることが確認され、EML4-ALK と同様に肺がん発症に中心的な役割を果たすことが予想される。

2) EML4-ALK トランスジェニックマウスの作成

SPC トランスジェニックマウス作成後、5 ラインの F1 を樹立し、それぞれにおいて一部のマウスを用いた EML4-ALK の発現確認を行った。Diploid genome あたりの EML4-ALK cDNA コピー数は 3-50 と様々であったが、何れの場合も EML4-ALK mRNA が肺特異的に発現することを確認した。また EML4-ALK の発現量はゲノム中のトランスジーンのコピー数に依存しておらず少ないコピー数でも十分な発現量が確認された。これらマウスは生後数週で両肺に数百個の肺腺がんを同時多発的に発症し、EML4-ALK の驚くべきがん化能が証明された。これら腫瘍を取り出し別のヌードマウス皮下に接種したところ腫瘍はヌードマウスにおいて維持されたことから、トランス

ジェニックマウスに生じた腫瘍は良性でなく、肺腺がんであると確認された。次にこれらマウスをCT装置により系時的に観察したところ、両肺に生じた腫瘍がやがて増大・浸潤していくことが確認された。

これらトランスジェニックマウスに経口接種可能なALK阻害剤を投与し、生体における治療モデル実験を行った。生後4週齢のトランスジェニックマウス計20匹を2群に分け、片方にはALK阻害剤を、もう片方には溶媒のみを一日一度経口接種させた。腫瘍径の変化をCT撮影にて系時的に観察したところ、薬剤投与群においてのみ腫瘍の速やかな消失を確認した。またEML4-ALK陽性細胞をヌードマウスの尾静脈より投与すると両肺に播種し、全てのマウスは1ヶ月以内に死亡してしまうが、同じ処理をしたマウスにALK阻害剤を投与すると肺の播種は生じず、全てのマウスが生存可能となった。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により非小細胞肺がんの約5%がEML4-ALKを有することが判り、これらの症例はALK阻害剤による分子標的治療の対象群になると期待される。実際ALK阻害剤は複数の大手製薬企業により精力的に開発されつつあり、一部は既に第一相臨床試験に入ったものもある。これらの分子標的治療への導入の際にEML4-ALK陽性肺がんを正確かつ感度良く検出することは極めて重要であるが、今回の解析によりEML4遺伝子からALK遺伝子への融合ポイントは複数（計10種類以上）存在することが判った。我々が開発したmultiplex RT-PCR法＋iAEP法の組み合わせは、今後の世界のALK融合型肺がんの臨床診断に重要な役割を果たすと考えられる。

さらにトランスジェニックマウス実験によりEML4-ALKがん遺伝子が、同遺伝子陽性肺がんの主たる発がん原因であること、したがって同遺伝子産物の機能抑制剤が同肺がんの全く新しい分子標的療法となることが証明された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

間野博行

- 1) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T. “ Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte” *Immunol Lett* 127: 135-142, 2010.
- 2) Mano H & Takeuchi K. “ EML4-ALK Fusion in Lung” *Am J Pathol* in press, 2010.
- 3) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. “ Array-based genomic resequencing of human leukemia” *Oncogene* in press, 2010.
- 4) Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H & Suzuki M. “ Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries” *Int J Oncol* 35: 973-976, 2009.
- 5) Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H & Furukawa Y. “ The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro” *Anticancer Res* 29: 4589-4596, 2009.
- 6) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H. “ KIF5B-ALK,

- a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer” *Clin Cancer Res* **15**: 3143-3149, 2009.
- 7) Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H. “ Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos” *RNA* **15**: 1507-1514, 2009.
 - 8) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y. “ Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro” *Cancer Chemother Pharmacol* **64**: 1129-1137, 2009.
 - 9) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H. “ Genome-wide histone methylation profile for heart failure” *Genes Cells* **14**: 69-77, 2009.
 - 10) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H & Ishikawa Y. “ EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset” *Mod Pathol* **22**: 508-515, 2009.
- software” *Jpn J Radiol* **27**: 115-122, 2009.
- 2) Daimon T, Johkoh T, Honda O, Sumikawa H, Ichikado K, Kondoh Y, Taniguchi H, Fujimoto K, Yanagawa M, Inoue A, Tomiyama N, Nakamura H & Sugiyama Y. “ Nonspecific interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease: analysis of CT features to distinguish the various types” *Intern Med* **48**: 753-761, 2009.
 - 3) Mato N, Fujii M, Hakamata Y, Kobayashi E, Sato A, Hayakawa M, Ohto-Ozaki H, Bando M, Ohno S, Tominaga S & Sugiyama Y. “ Interleukin-1 receptor-related protein ST2 suppresses the initial stage of bleomycin-induced lung injury” *Eur Respir J* **33**: 1415-1428, 2009.
 - 4) Shimaoka Y, Tajima S, Fujimoto F, Yamabayashi C, Moriyama H, Terada M, Takada T, Suzuki E, Bando M, Sugiyama Y & Narita I. “ Effects of IS-741, a synthetic anti-inflammatory agent, on bleomycin-induced lung injury in mice” *Lung* **187**: 331-339, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

杉山幸比古

- 1) Daimon T, Fujimoto K, Tanaka K, Yamamoto J, Nishimura K, Tanaka Y, Yanagawa M, Sumikawa H, Inoue A, Honda O, Tomiyama N, Nakamura H, Sugiyama Y & Johkoh T. “ Volume of pulmonary lobes and segments in chronic obstructive pulmonary diseases calculated using newly developed three-dimensional

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書
「EML4-ALK 陽性肺がん診断システムの開発」に関する研究

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：間野らは完全長 cDNA を効率的に発現させるレトロウィルス cDNA 発現ライブラリー作成法を開発し、これを用いて肺腺がん切除検体から新たな融合型チロシンキナーゼ EML4-ALK を発見した。本研究計画において我々は EML4-ALK 陽性肺がんの感度・精度共に良い診断システムを構築するべく、RT-PCR 法と高感度免疫組織染色法の組み合わせによる EML4-ALK 陽性肺がんの診断プロトコルを開発した。RT-PCR は高感度であるが、EML4 が ALK と融合するポイントは多岐にわたるため全ての in-frame fusion を等しく検出可能な multiplex RT-PCR 法が必要となる。また EML4-ALK の発現を制御する EML4 遺伝子プロモーターは活性が低いいため EML4-ALK タンパク量は少なく、旧来の免疫組織染色法では再現性よい EML4-ALK 検出は困難であった。我々は偽陰性無く EML4-ALK を検出可能な高感度免疫組織染色法 iAEP 法を新たに開発した。上記の組み合わせにより、一般的な臨床検体の全てに対応できる新たな EML4-ALK 診断法の構築に成功した。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米先進国におけるがん死数の第一位を占める予後不良の疾患であり、旧来の抗がん剤による化学療法で延命効果が証明された治療剤は少ない。近年、主にアジア人の若年非喫煙者に発症する肺がんの 2～4 割において上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異が認められ、これら肺がんに対して EGFR 阻害剤であるゲフィチニブが著効を示すことが報告された。一方 BCR-ABL チロシンキナーゼを有する慢性骨髄性白血病に ABL 阻害剤である STI-571 が著効を示すことなども、「悪性腫瘍の主要がん遺伝子を同定し、その阻害剤を開発すること」が有効な治療剤開発の上で極めて重要であることを明示している。そこで申請者らは肺がんにおける主要原因遺伝子を同定する目的で、独自に組換えレトロウィルスを用いた臨床検体のがん遺伝子スクリーニング法を開発した。本法を用いて喫煙歴を有する 62 才男性肺腺がん患者外科切除検体より cDNA 発現レトロウィルスライブラリーを構築し、マウス 3T3 細胞を用いて形質転換フォーカスのスクリーニングを行った結果、新規がん遺伝子 EML4-ALK を発見することに成功した（*Nature* 448: 561-566）。本研究ではこれらの知見を用いて、肺がんの高感度分子診断法および有効な分子標的療法の開発を目指す。

B 研究方法

ALK 遺伝子のエクソン 20（チロシンキナーゼ領域の上流）に in-frame で融合しうる EML4 エクソンは計 6 種類存在する。そこでこれらのどの領域から ALK へ融合した cDNA も、全て検出可能なように複数の forward primer を組み合わせた multiplex RT-PCR を開発した。これを用いて大規模に肺がん患者喀痰および肺がん切除検体を用いた RT-PCR 解析を行った。

さらに免疫組織染色法により EML4-ALK を検出可能にするべく、1 次抗体に加えて、抗イディオタイプ 2 次抗体を添加する intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP) 法を開発した。iAEP により上記 RT-PCR 陽性例を全て検出可能にする抗 ALK 抗体を選別し、iAEP 法によるパラフィン包埋標本の大規模スクリーニングを行った。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学の生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C 研究結果

EML4 遺伝子のエクソン 2、11、17、24 を始め複数のエクソン上に設置した計 8 種類の forward primer と、ALK のエクソン 20 乗に設置した reverse primer を用いた RT-PCR プロトコルを開発し、これを用いて多数の肺がん検体（喀痰＋生検標本）か

らRNAを取り出してPCRを行った。計253種類の肺腺がんを解析したところ計11検体にEML4-ALKを検出した。さらにiAEP法による免疫組織染色を過去のパラフィン包埋検体のみならず新規患者症例についても行った。その結果、8例のALK陽性例を検出することに成功した。その中にはこれまで知られていない新たなEML4-ALKバリエーションが2種類含まれており、いずれについても著明ながん化能を確認した。

さらに上記ALK陽性例中にはEML4-ALK RT-PCR陰性例が存在しており、詳細な解析の結果、同症例はALKの新たな融合型がん遺伝子であるKIF5B-ALKを有することが明らかになった。KIF5B-ALKもがん化能を有する融合型キナーゼであることが確認され、EML4-ALKと同様に肺がん発症に中心的な役割を果たすことが予想される。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により非小細胞肺がんの約5%がEML4-ALKを有することが判り、さらに別の融合型ALKであるKIF5B-ALKも発見された。これらの症例はALK阻害剤による分子標的治療の対象となると期待される。実際ALK阻害剤は複数の大手製薬企業により精力的に開発されつつあり、一部は既に第一相臨床試験に入ったものもある。これらの分子標的治療への導入の際にEML4-ALK陽性肺がんを正確かつ感度良く検出することは極めて重要であるが、今回の解析によりEML4遺伝子からALK遺伝子への融合ポイントは複数（計10種類以上）存在することが判った。我々が開発したmultiplex RT-PCR法+iAEP法の組み合わせは、今後の世界のALK融合型肺がんの臨床診断に重要な役割を果たすと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K &

Ishida T. “ Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte” *Immunol Lett* 127: 135-142, 2010.

- 2) Mano H & Takeuchi K. “ EML4-ALK Fusion in Lung” *Am J Pathol* in press, 2010.
- 3) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A & Mano H. “ Array-based genomic resequencing of human leukemia” *Oncogene* in press, 2010.
- 4) Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H & Suzuki M. “ Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries” *Int J Oncol* 35: 973-976, 2009.
- 5) Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H & Furukawa Y. “ The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro” *Anticancer Res* 29: 4589-4596, 2009.
- 6) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H. “ KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer” *Clin Cancer Res* 15: 3143-3149, 2009.
- 7) Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H. “ Potential role of miR-29b in modulation of

Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos” *RNA* 15: 1507-1514, 2009.

- 8) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y. “ Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro” *Cancer Chemother Pharmacol* 64: 1129-1137, 2009.
- 9) Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H. “ Genome-wide histone methylation profile for heart failure” *Genes Cells* 14: 69-77, 2009.
- 10) Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H & Ishikawa Y. “ EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset” *Mod Pathol* 22: 508-515, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

「EML4-ALK トランスジェニックマウス作成」に関する研究

分担研究者： 杉山 幸比古 自治医科大学医学部 教授

研究要旨：EML4-ALK は我が国において発見された肺腺がんの新規がん遺伝子であり、染色体転座 inv(2p)の結果、EML4 遺伝子と ALK 遺伝子とが融合することにより生じる。本来 ALK 遺伝子は受容体型チロシンキナーゼをコードしているが、EML4 と融合することでその酵素活性が恒常的に上昇し、がん化を導くと考えられる。本研究計画において我々は、EML4-ALK が具体的に生体内において発がんの主たる原因であることを確認するために同遺伝子を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。EML4-ALK 発現トランスジェニックマウスは生後僅か 2～3 週で両肺に数百個の肺腺がんを発症したことから、EML4-ALK が同遺伝子陽性肺がんの主たる発がん原因であることが証明された。さらに EML4-ALK 発現トランスジェニックマウスに ALK 酵素活性阻害剤を投与すると肺がんは速やかに消失したことから、ALK 特異的阻害剤は EML4-ALK 陽性肺がんの新たな分子標的療法薬になると期待される。また同トランスジェニックマウスの肺がんは遠隔転移を起こさないことより、肺がんの転移には EML4-ALK 以外の別の遺伝子変異が必要であると考えられた。

A 研究目的

肺がんは我が国及び欧米におけるがん死因の第一位を占める極めて予後不良の疾患である。近年「非喫煙者・女性・アジア人」の非小細胞肺がんに上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が発見され、同遺伝子異常を有する症例の一部に EGFR 阻害剤である gefitinib が有効であることが示された。しかしながら肺がんの主体を占める喫煙者における同疾患の具体的ながん化機構は殆ど不明であった。申請者らは完全長 cDNA を効率的に発現させるレトロウイルス cDNA 発現ライブラリーを構築する手法を開発し、これを用いて喫煙者に生じた肺腺がん切除検体から新たな融合型がん遺伝子 EML4-ALK を発見した (*Nature* 448:561-566, 2007)。本遺伝子はヒト 2 番染色体短腕中の短い逆位のために生じた融合型新規遺伝子であり、微少管結合タンパク EML4 の N 末側約半分と受容体型チロシンキナーゼ ALK の細胞内領域 (キナーゼドメインを含む) とが融合したタンパクを産生する事になる。また EML4 と融合することで ALK のキナーゼ酵素活性が著明に上昇し、極めて強いがん化能を獲得することも確認された。

本研究計画ではこれらの知見に基づいて、本融合遺伝子を肺胞上皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、成体における EML-ALK のがん化能を検証することを目指す。

B 研究方法

Surfactant protein-C (SPC)遺伝子は II 型肺

胞上皮特異的に発現するタンパクであり、そのプロモーターフラグメントは肺胞上皮特異的にトランスジーンを発現させるのに有効である。そこで SPC 遺伝子プロモーターの下流に EML4-ALK cDNA を挿入した発現ユニットを作製し、これらを用いたトランスジェニックマウスを作成する。また得られたマウスの病変の評価には、小動物用 CT 装置を用い、系時的に腫瘍サイズ・分布の変化を観察する。また経口接種可能な ALK 阻害剤をマウスに投与しその治療効果を検証する。さらに長期観察後の、肺がんの遠隔転移の有無についても検討した。

(倫理面への配慮)

該当しない

C 研究結果

SPC トランスジェニックマウス作成後、5 ラインの F1 を樹立し、それぞれにおいて一部のマウスを用いた EML4-ALK の発現確認を行った。Diploid genome あたりの EML4-ALK cDNA コピー数は 3-50 と様々であったが、何れの場合も EML4-ALK mRNA が肺特異的に発現することを確認した。また EML4-ALK の発現量はゲノム中のトランスジーンのコピー数に依存しておらず少ないコピー数でも十分な発現量が確認された。これらマウスは生後数週で両肺に数百個の肺腺がんを同時多発的に発症し、EML4-ALK の驚くべきがん化能が証明された。これら腫瘍を取り出し別のヌードマウス皮下に接種したところ腫瘍はヌードマウスにおいて維持されたこと

から、トランスジェニックマウスに生じた腫瘍は良性でなく、肺腺がんであると確認された。次ぎにこれらマウスを CT 装置により系時的に観察したところ、両肺に生じた腫瘍がやがて増大・播種していくことが確認された。

これらトランスジェニックマウスに経口接種可能な ALK 阻害剤を投与し、生体における治療モデル実験を行った。生後 4 週齢のトランスジェニックマウス計 20 匹を 2 群に分け、片方には ALK 阻害剤を、もう片方には溶媒のみを一日一度経口接種させた。腫瘍径の変化を CT 撮影にて系時的に観察したところ、薬剤投与群においてのみ腫瘍の速やかな消失を確認した。また EML4-ALK 陽性細胞をヌードマウスの尾静脈より投与すると両肺に播種し、全てのマウスは 1 ヶ月以内に死亡してしまうが、同じ処理をしたマウスに ALK 阻害剤を投与すると肺の播種は生じず、全てのマウスが生存可能となった。

D&E. 考察及び結論

我々の解析により EML4-ALK がん遺伝子が、同遺伝子陽性肺がんの主たる発がん原因であることだけでなく、実際に同遺伝子産物の酵素活性を抑制する化合物が、EML4-ALK 陽性肺がんの全く新しい分子標的療法となる事を直接証明した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daimon T, Fujimoto K, Tanaka K, Yamamoto J, Nishimura K, Tanaka Y, Yanagawa M, Sumikawa H, Inoue A, Honda O, Tomiyama N, Nakamura H, Sugiyama Y & Johkoh T. “ Volume of pulmonary lobes and segments in chronic obstructive pulmonary diseases calculated using newly developed three-dimensional software” *Jpn J Radiol* **27**: 115-122, 2009.
- 2) Daimon T, Johkoh T, Honda O, Sumikawa H, Ichikado K, Kondoh Y, Taniguchi H, Fujimoto K, Yanagawa M, Inoue A, Tomiyama

N, Nakamura H & Sugiyama Y.

“ Nonspecific interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease: analysis of CT features to distinguish the various types” *Intern Med* **48**: 753-761, 2009.

- 3) Mato N, Fujii M, Hakamata Y, Kobayashi E, Sato A, Hayakawa M, Ohto-Ozaki H, Bando M, Ohno S, Tominaga S & Sugiyama Y.
“ Interleukin-1 receptor-related protein ST2 suppresses the initial stage of bleomycin-induced lung injury” *Eur Respir J* **33**: 1415-1428, 2009.
- 4) Shimaoka Y, Tajima S, Fujimoto F, Yamabayashi C, Moriyama H, Terada M, Takada T, Suzuki E, Bando M, Sugiyama Y & Narita I.
“ Effects of IS-741, a synthetic anti-inflammatory agent, on bleomycin-induced lung injury in mice” *Lung* **187**: 331-339, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Hatano S, Ninomiya H, Motoi N, Mun MY, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Mano H & Ishikawa Y.	EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset	Mod Pathol	22	508-515	2009
Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K & Mano H.	Genome-wide histone methylation profile for heart failure	Genes Cells	14	69-77	2009
Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H & Furukawa Y.	Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro	Cancer Chemother Pharmacol	64	1129-1137	2009
Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y & Mano H.	Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos	RNA	15	1507-1514	2009
Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y & Mano H.	KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer	Clin Cancer Res	15	3143-3149	2009
Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H & Furukawa Y.	The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro	Anticancer Res	29	4589-4596	2009
Wada T, Yamashita Y, Saga Y, Takahashi K, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Fujiwara S, Soda M, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Enomoto M, Takada S, Mano H & Suzuki M.	Screening for genetic abnormalities involved in ovarian carcinogenesis using retroviral expression libraries	Int J Oncol	35	973-976	2009
Mano H & Takeuchi K.	EML4-ALK Fusion in Lung	Am J Pathol			2010
Susaki K, Kitanaka A, Dobashi H, Kubota Y, Kittaka K, Kameda T, Yamaoka G, Mano H, Mihara K & Ishida T.	Tec protein tyrosine kinase inhibits CD25 expression in human T-lymphocyte	Immunol Lett	127	135-142	2010

自治医科大学

杉山幸比古 業績リスト

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Daimon T, Fujimoto K, Tanaka K, Yamamoto J, Nishimura K, Tanaka Y, Yanagawa M, Sumikawa H, Inoue A, Honda O, Tomiyama N, Nakamura H, Sugiyama Y & Johkoh T	Volume of pulmonary lobes and segments in chronic obstructive pulmonary diseases calculated using newly developed three-dimensional software	Jpn J Radiol	27	115-122	2009
Daimon T, Johkoh T, Honda O, Sumikawa H, Ichikado K, Kondoh Y, Taniguchi H, Fujimoto K, Yanagawa M, Inoue A, Tomiyama N, Nakamura H & Sugiyama Y	Nonspecific interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease: analysis of CT features to distinguish the various types	Intern Med	48	753-761	2009
Mato N, Fujii M, Hakamata Y, Kobayashi E, Sato A, Hayakawa M, Ohto-Ozaki H, Bando M, Ohno S, Tominaga S & Sugiyama Y	Interleukin-1 receptor-related protein ST2 suppresses the initial stage of bleomycin-induced lung injury	Eur Respir J	33	1415-1428	2009

Volume of pulmonary lobes and segments in chronic obstructive pulmonary diseases calculated using newly developed three-dimensional software

Tadahisa Daimon · Kiminori Fujimoto · Keisuke Tanaka
Junya Yamamoto · Kanako Nishimura · Yuko Tanaka
Masahiro Yanagawa · Hiromitsu Sumikawa
Atsuo Inoue · Osamu Honda · Noriyuki Tomiyama
Hironobu Nakamura · Yukihiko Sugiyama
Takeshi Johkoh

Received: October 17, 2008 / Accepted: November 25, 2008
© Japan Radiological Society 2009

Abstract

Purpose. The aim of this study was to measure the volume of each pulmonary segment by volumetric computed tomography (CT) data using a newly developed three-dimensional software application and to identify the differences between those with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and controls.

Materials and methods. CT scans of 11 COPD patients and 16 controls were included. The volume of each pulmonary segment was measured by each of two operators to evaluate the reproducibility of the software. This measured volume was then divided by the total lung volume to revise individual variations.

Results. Volumes of the right (rt) S2, rt S5, left (lt) S1 + S2, lt S3, and lt S5 were significantly larger in COPD patients than in controls ($P < 0.05$). Regarding the ratio of the volume of each pulmonary segment per total lung volume, the areas of rt S2 and lt S1 + S2 were significantly larger in COPD patients than in controls ($P < 0.05$), whereas lt S10 was significantly smaller in COPD patients than in controls ($P < 0.05$).

Conclusion. We measured the volume of each pulmonary segment based on volumetric CT data using this software. In addition, we demonstrated that the upper lung volume of COPD subjects was larger than that of controls, whereas the lower lung volumes were almost the same.

T. Daimon · Y. Tanaka · M. Yanagawa · H. Sumikawa ·
A. Inoue · O. Honda · N. Tomiyama · H. Nakamura
Department of Radiology, Osaka University Graduate School of
Medicine, Suita, Japan

K. Tanaka · J. Yamamoto · K. Nishimura
Department of Medical Physics, Osaka University Graduate
School of Medicine, Suita, Japan

T. Daimon (✉) · Y. Sugiyama
Department of Medicine, Division of Pulmonary Medicine, Jichi
Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi
329-0498, Japan
Tel. +81-285-58-7350; Fax +81-285-44-3586
e-mail: tada0605@jichi.ac.jp

K. Fujimoto
Department of Radiology, Kurume University School of
Medicine, Kurume, Japan

T. Johkoh
Department of Radiology, Kinki Central Hospital, Itami, Japan

Key words Chronic obstructive pulmonary disease ·
Computed tomography · Pulmonary segment

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease state characterized by airflow limitation that is not fully reversible.¹ The chronic airflow limitation in COPD is caused by a mixture of small airway disease (obstructive bronchiolitis) and parenchymal destruction (emphysema), the relative contributions of which vary from person to person. Chronic inflammation causes remodeling and narrowing of the small airways. Destruction of the lung parenchyma, also by inflammatory processes, leads to the loss of alveolar attachments to the small airways. A diagnosis of COPD should be confirmed by an objective measure of airflow limitation.¹

Airflow limitation is measured by spirometry, as this is the most widely available, reproducible, and standardized test of lung function. Forced expiratory volume in 1 s (FEV₁)/forced vital capacity (FVC) < 70% and a post-bronchodilator FEV₁ < 80% predicted confirms the presence of airflow limitation that is not fully reversible. The four-stage classification based on postbronchodilator FEV₁ of COPD severity used throughout the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guideline¹ provides an educational tool and a general indication of the approach to management.

Computed tomography (CT) in COPD is used to evaluate emphysema by detecting low attenuation areas (LAAs); thus, the role of CT has been well established.^{2–4} Recent progress in CT technology has made it possible to detect and quantify faint airway abnormalities.^{5–7} Longitudinally increasing changes in LAA in smoking-induced lung disease have been observed, predominantly in the upper lung field.⁸ However, there are no reports of having evaluated pulmonary segmentation volumes using CT in any pulmonary disease, including COPD.

The aim of this study was to measure the volume of each pulmonary segment based on volumetric CT data using a newly developed software application and to identify the differences between those with COPD and controls.

Materials and methods

Subjects

Between November 2005 and May 2006, a series of 11 consecutive patients with COPD and 16 controls who

underwent pulmonary function tests and CT at our institutions were entered into the study. The patients with COPD included 10 men and 1 woman aged 68 ± 5 years (mean $\pm$ SD) (range 59–77 years). The subjects were either current smokers ($n = 8$) or former smokers ($n = 3$). The controls included 6 men and 10 women aged 54 ± 15 years (mean $\pm$ SD) (range 19–72 years). The subjects were either current smokers ($n = 3$) or had never smoked ($n = 16$). The institutional review board gave full approval and waived informed consent for our retrospective study.

A diagnosis of COPD was made based on the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guideline.¹ Subjects who had an allergic diathesis, an episodic wheeze, or a history of bronchial asthma were excluded from this study. Patients with COPD in various clinical stages according to the GOLD criteria (stage I, $n = 6$; stage II, $n = 2$; stage III, $n = 1$; stage IV, $n = 2$) were enrolled. The subjects' characteristics are shown in Table 1.

Pulmonary function tests

Pulmonary function tests were performed within a month before CT or after CT. The spirometric measurements were made on a pneumotachograph (Chestac-33; Chest, Tokyo, Japan). The results of the pulmonary function tests met the requirements of the Japanese Respiratory Society guidelines,⁹ which are similar to those of the American Thoracic Society (ATS). FEV₁ and FVC were measured before and 15 min after inhalation of a short-acting β_2 -agonist (20 μ g procaterol hydrochloride). The vital capacity (VC) and FEV₁ were expressed as a percentage of predicted values according to the prediction

Table 1. Characteristics of COPD patients and controls

Characteristic	Patients with COPD (mean)	Controls (mean)
Age (years)	68 ± 5	$54 \pm 15^*$
Height (cm)	166 ± 7	158 ± 9
Weight (kg)	58 ± 7	60 ± 13
Smoking index (pack-years)	98.0 ± 144.7	$21.7 \pm 1.4^*$
VC (l)	3.42 ± 0.95	3.15 ± 1.07
VC (% predicted)	103.0 ± 24.8	111.6 ± 18.7
FEV ₁ (l)	1.89 ± 0.93	2.42 ± 0.85
FEV ₁ /FVC (%)	53.6 ± 19.4	$77.7 \pm 6.37^*$
FEV ₁ (% predicted)	75.5 ± 35.6	$107.1 \pm 18.1^*$
RV/TLC (%)	31.2 ± 10.4	26.7 ± 7.82
DLco/VA (ml/min/mmHg/l)	4.73 ± 1.27	4.85 ± 0.87

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; VC, vital capacity; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; RV, residual volume; TLC, total lung capacity; DLco, carbon monoxide diffusion in the lung; VA, alveolar ventilation

Data are shown as means $\pm$ SD

FVC and FEV₁ tests were performed after the inhalation of a short-acting β_2 -agonist

* $P < 0.05$ vs controls

equations of the Japanese Respiratory Society.⁹ Lung volumes, total lung capacity (TLC), functional residual capacity (FRC), and residual volume (RV) were measured by the helium closed-circuit method. Carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) and DLCO divided by alveolar volume (VA) were measured with the single-breath method according to the pulmonary function test guidelines of the Japanese Respiratory Society.⁹ The percent predicted values for DLCO and DLCO/VA were determined using the method of Nishida et al.¹⁰

Computed tomography techniques

All CT scans were performed at the end of inspiration with the patient in the supine position; no intravenous contrast material was used. All CT images were acquired on a 16-detector row CT scanner (LightSpeed Ultra system; GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Scanning parameters were 120 kVp and 200 mA. Scanning was performed using a pitch of 1.375:1.0, a 0.6-s scanning time per rotation, a table speed of 13.75 mm/rotation, and a detector configuration of 0.625×16 mm. The CT data for each phase were retrospectively reconstructed using a standard algorithm at a reconstruction interval of 0.625 mm with 0.625 mm section thickness (window level -600 HU; window width 1500 HU). The imaging data were transferred automatically to a workstation (Virtual Place version 2.03; Aze, Tokyo, Japan) in a 512×512 pixel format online.

Outline of software for calculation of volume of pulmonary segments

For this study, we developed new software for measuring the volumes of pulmonary segments. The software was produced as a plug-in of Virtual Place version 2.03 (Aze) with Visual Studio .NET 2003 C++ (Microsoft, Edmond, WA, USA). The lung three-dimensional (3D) images from CT were obtained by threshold processing (Fig. 1). At first, both lungs were separated into two or three lobes along the lung interlobar fissures. We used the sheet filter, a 3D line enhancement filter, that was developed with the aim of discriminating line structures from other structures and recovering line structures of various widths.¹¹ Furthermore, we improved the sheet filter to emphasize only the fissures (Fig. 2). Emphasized fissures (Fig. 2) had some holes and areas lacking in each extracted fissure. Therefore, emphasized fissures were interpolated by the thin plate spline method. The thin plate spline method, a general algorithm for interpolation in multidimensional space, is a conventional tool for surface interpolation over scattered data.^{12,13} The inter-

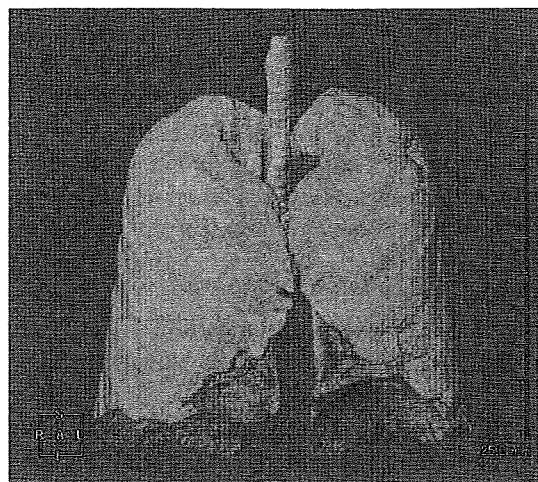


Fig. 1. Lung mask image. Three-dimensional (3D) computed tomography (CT) images of the lung were obtained by threshold processing

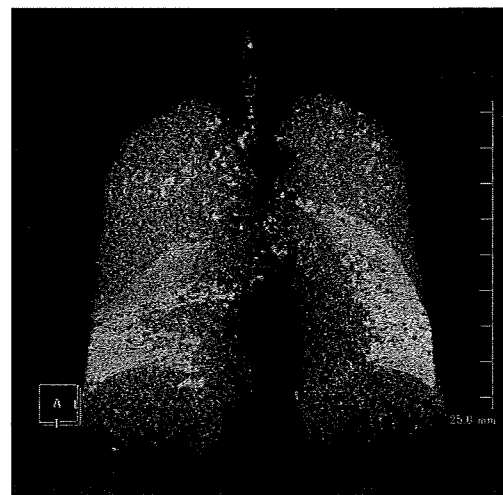


Fig. 2. Emphasized image by the sheet filter method. Note that the emphasized image had many areas of noise

polated fissures were then used as boundary surfaces between lobes (Figs. 3, 4).

Borders of segments were anatomically defined as the virtual surfaces where subsegmental veins run. Thus, to determine the borders, we first used previously developed vessel-tracking software. The details of vessel-tracking software show a user how to set the initial tracking point and orientation, and the software then automatically tracks center lines and determines branch and terminal points as well as new points and orientations at the detected branch points for restarting the tracking. The operator sets the initial tracking point of the subsegmental veins on a CT image (Fig. 5) and saves

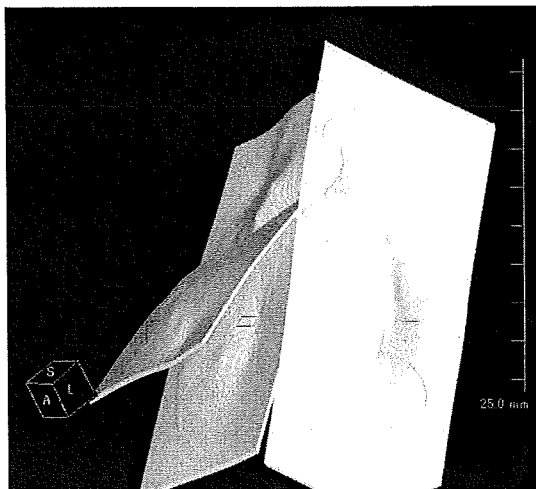


Fig. 3. Interpolated fissures. Processed image with the thin plate spline method from an extracted fissure image

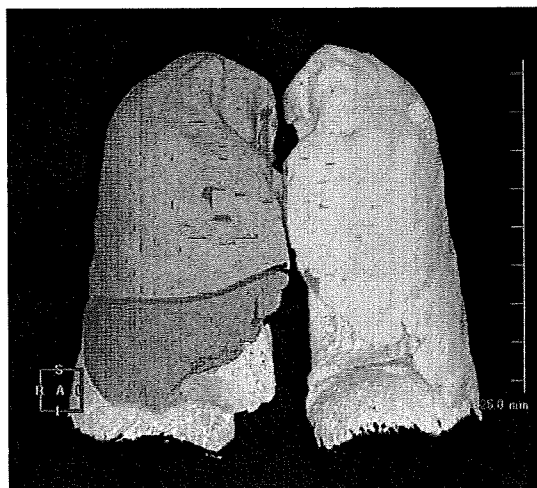


Fig. 4. Lung lobe image at the 3D workstation. The lung mask image (Fig. 1) was divided into lung lobes using interpolated fissures. The right lung was divided into three lobes and the left one into two lobes

the tracking root of each subsegmental vein in XML format (Fig. 6). The virtual surfaces of segments are formed from the saved tracking roots of the subsegmental veins and are interpolated using the thin plate spline method. Using these borders, the lung lobes are divided into pulmonary segments on a 3D image (Fig. 7). Voxels of each pulmonary segment can then be calculated automatically and described as the volume of the pulmonary segment. Furthermore, with the multiplanar reconstruction imaging (MPR) view, the user can view the image of the colored pulmonary segment (Fig. 8).

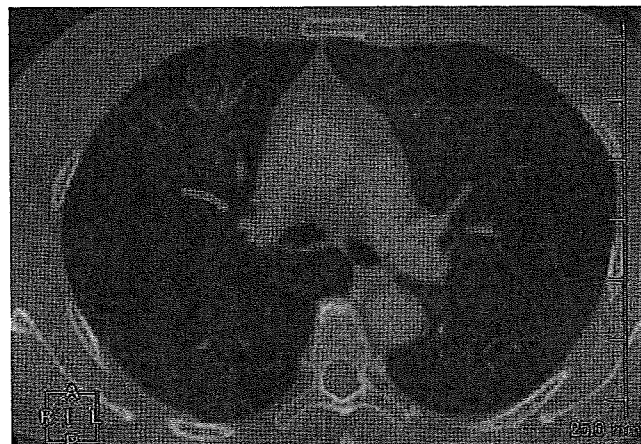


Fig. 5. Tracking root (gray line) of a subsegmental vein on a CT image

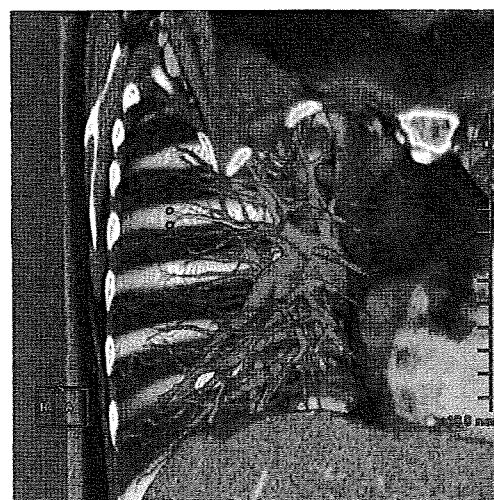


Fig. 6. Image of a tracing purpose subsegmental vein. The tracking root of a subsegmental vein is shown in XML format

Analysis of pulmonary segmentation volume

The CT scans were randomized, and then each volume of pulmonary segment was measured by each of two operators (developer and chest radiologist) independently to evaluate the reproducibility of this software. The operators were unaware of any clinical findings other than the patient's age and sex. Data for each volume of the pulmonary segment measured by the software was analyzed for statistical differences between the COPD group and the controls. Furthermore, each volume of the pulmonary segment was divided by the total of the two lung volumes to revise individual variations.

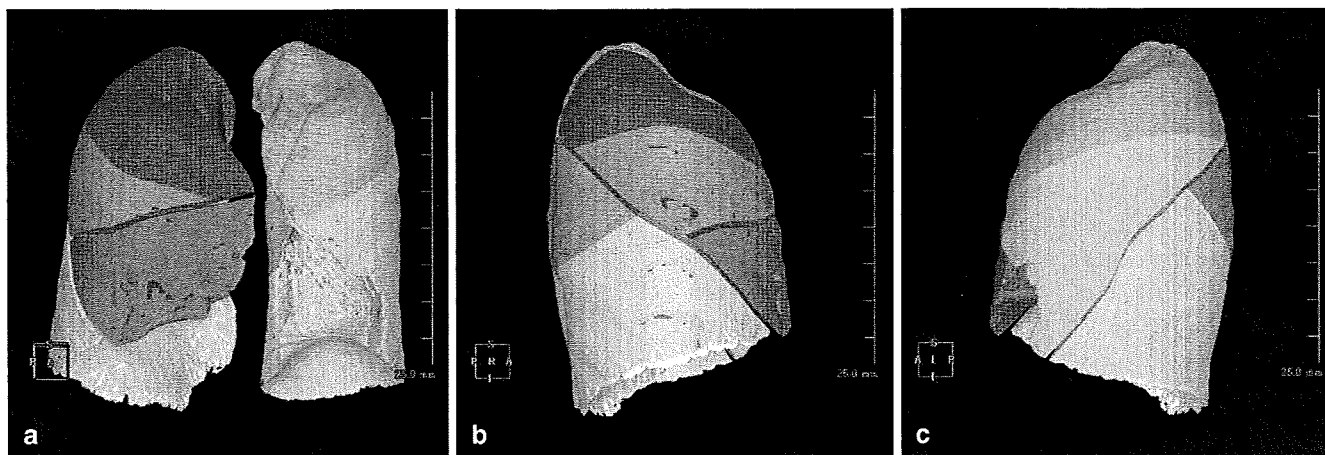


Fig. 7. Pulmonary segment images at a 3D workstation. The lung lobe image (Fig. 4) was divided into pulmonary segments using traced subsegmental vein data. **a** Front view. **b** Right view. **c** Left view



Fig. 8. Multiplanar reconstruction (MPR) fusion images of a coloring pulmonary segment. **a** Axial view. **b** Sagittal view. **c** Coronal view

Statistical analysis

The reproducibility of this software was analyzed with a Bland-Altman plot, using Excel (Microsoft) software. Furthermore, correlation of two data points was analyzed using Pearson's correlation coefficient. The data of the developer are shown as the mean $\pm$ SD. Differences between two variables were assessed using the Mann-Whitney U-test. All statistical analyses were performed with statistical software (SPSS, version 12.0J; SPSS, Tokyo, Japan).

Results

Reproducibility of software

The results of the Bland-Altman plot between the two operators are shown in Fig. 9. The x-axis of this graph displays the mean of two pulmonary segmentation

volumes. The y-axis displays the difference between the two pulmonary segmentation volumes. The mean difference between the two operators was 0 cm³ (Fig. 9). The limits of reproducibility were -83.33 and 83.33 cm³ (mean $\pm$ 2 SD) (Fig. 9). There was statistically good correlation between the data ($P < 0.001$, $r = 0.948$).

Pulmonary segmentation volume

The pulmonary segment volumes in patients with COPD and the controls are shown in Table 2. In the upper lobe of the right lung, the volume of the posterior segment, S2, in patients with COPD was significantly larger than in the controls ($P < 0.05$) (COPD vs. control subjects 235 ± 92 vs. 122 ± 50 cm³). In the middle lobe, the volume of the medial segment, S5, in patients with COPD was significantly larger than that in the controls ($P < 0.05$) (COPD vs. control subjects: 352 ± 116 vs. 231 ± 94 cm³). In the lower lobe of the right lung, the volumes of all segments in patients with COPD did not differ from

Fig. 9. Bland-Altman plot of the pulmonary segmentation volume. This graph was plotted to compare two results of the calculated pulmonary segmentation volume. Horizontal axis indicates the mean of two results. Vertical axis indicates the difference between two results. *Dashed line*, mean difference in volume; *dotted-dashed line*, mean difference ± 2 SD

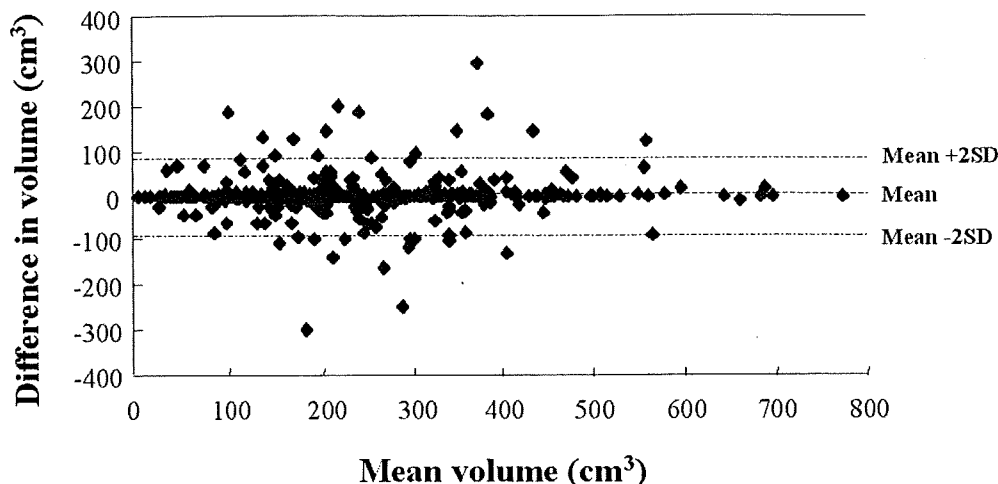


Table 2. Pulmonary segmentation volume of COPD patients and controls

Segmentation	Patients with COPD (<i>n</i> = 11)	Controls (<i>n</i> = 16)	<i>P</i>
Right lung	(cm ³)	(cm ³)	
Upper lobe			
S1	466 ± 191 (9.6% ± 3.2%)	334 ± 93 (9.3% ± 2.3%)	0.076 (0.980)
S2	235 ± 92 (4.9% ± 1.5%)	122 ± 50 (3.5% ± 1.8%)	0.002* (0.032*)
S3	357 ± 130 (7.7% ± 2.7%)	269 ± 98 (7.5% ± 2.7%)	0.114 (0.786)
Middle lobe			
S4	110 ± 59 (2.3% ± 1.1%)	102 ± 46 (2.9% ± 1.7%)	0.675 (0.444)
S5	352 ± 116 (7.4% ± 1.8%)	231 ± 94 (6.3% ± 2.0%)	0.020* (0.191)
Lower lobe			
S6	235 ± 59 (5.1% ± 1.5%)	234 ± 114 (6.2% ± 2.0%)	0.604 (0.191)
S7	64 ± 43 (1.4% ± 0.9%)	66 ± 43 (1.7% ± 0.9%)	0.980 (0.289)
S8	235 ± 84 (4.9% ± 1.4%)	207 ± 93 (5.5% ± 1.5%)	0.267 (0.416)
S9	188 ± 88 (4.0% ± 1.8%)	179 ± 94 (4.8% ± 1.9%)	0.711 (0.312)
S10	276 ± 103 (5.8% ± 1.5%)	255 ± 102 (6.9% ± 1.7%)	0.604 (0.109)
Left lung			
Upper lobe			
S1+2	451 ± 123 (9.7% ± 2.1%)	300 ± 101 (8.1% ± 1.2%)	0.001* (0.014*)
S3	404 ± 162 (8.3% ± 2.3%)	270 ± 101 (7.5% ± 2.3%)	0.026* (0.361)
S4	208 ± 96 (4.5% ± 2.0%)	143 ± 51 (4.0% ± 1.5%)	0.057 (0.824)
S5	266 ± 113 (5.6% ± 2.1%)	178 ± 88 (4.8% ± 1.8%)	0.028* (0.227)
Lower lobe			
S6	228 ± 62 (4.9% ± 1.4%)	188 ± 77 (5.1% ± 1.5%)	0.191 (0.748)
S8	218 ± 109 (4.6% ± 1.8%)	160 ± 78 (4.2% ± 1.4%)	0.175 (0.604)
S9	259 ± 103 (5.4% ± 1.8%)	238 ± 119 (6.4% ± 2.6%)	0.587 (0.416)
S10	190 ± 87 (3.9% ± 1.4%)	210 ± 129 (5.6% ± 2.4%)	0.941 (0.034*)

Data are shown as means $\pm$ SD

Data in parentheses are percentages of the pulmonary segmentation volume divided by the total of both lung volumes

Data in parentheses for the *P* value are against data divided by the total of both lung volumes

**P* < 0.05 vs controls

those of the controls. In the upper lobe of the left lung, the volumes of the apicoposterior segment, S1+2, the anterior segment, S3, and the inferior lingular segment, S5, in patients with COPD were significantly larger than in the controls (*P* < 0.05) (S1+2: COPD vs. control subjects 451 $\pm$ 123 vs. 300 $\pm$ 101 cm³; S3: COPD vs. control subjects 404 $\pm$ 162 cm³ vs. 270 $\pm$ 101 cm³; S5: COPD vs. control subjects 266 $\pm$ 113 cm³ vs. 178 $\pm$ 88 cm³). In the

lower lobe of the left lung, the volumes of all segments in patients with COPD did not differ from those of the controls.

Regarding each volume of pulmonary segment/total lung volume ratio, the areas of the right (rt) S2 and left (lt) S1+2 in COPD patients were significantly larger than those in the controls (*P* < 0.05) (rt S2: COPD vs. control subjects 4.9% $\pm$ 1.5% vs. 3.5% $\pm$ 1.8%; lt S1+2: COPD