

## 論 文 要 旨

## EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer

肺癌における上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異と  
ヒトパピローマウイルスとの関連

加 藤 卓 也

## 【序論および目的】

ヒトパピローマウイルス(HPV)は子宮頸癌の原因ウイルスであることが明らかになっており、特に高リスク型の HPV-16,18 は国際がん研究機関(IARC)によって Group 1 (ヒトへの発癌性あり)と分類されている。また肺癌においても、癌細胞に HPV ゲノムが検出されることが報告されており、肺癌発生過程における HPV の関連が示唆されている。2001年、台湾の研究グループは、女性で非喫煙者の肺腺癌症例において HPV-16,18 ゲノムが高頻度に検出されることを報告した。一方、我々の先行研究では、分子標的薬ゲフィチニブ治療が奏効した肺腺癌症例において、高リスク型 HPV ゲノムの検出頻度が有意に高かった。腺癌、女性、非喫煙者、東洋人といった特徴を持つ症例では、ゲフィチニブ治療への反応が良いことが知られているが、これらの臨床病理学的特徴は、台湾の報告における、高リスク型 HPV 陽性肺癌症例の特徴と類似している。一方、特定の上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異を有する症例において治療奏効例が多いことが明らかとなっている。従って本研究では、EGFR 遺伝子変異と HPV ゲノムの存在との関連について検討した。また、HPV-16 のウイルス量、および宿主 DNA への組み込みの有無(physical status)についても検索した。

## 【材料および方法】

対象検体は、鹿児島大学附属病院で診断された肺の腺癌 26 例、扁平上皮癌 12 例、その他の組織型 4 例を含む全 42 例の肺癌組織である。HPV ゲノムの検出には HPV-L1 領域を標的とした SPF10 プライマーを用いた PCR 法を、ウイルスサブタイプ判定には 16 種類の HPV が検出可能なキットを用いて行った。HPV-16 のウイルス量、physical status の決定はリアルタイム PCR を用いて行った。EGFR のエクソン 19,21 における変異は先行報告されているプライマーを用い、PCR 法に基づいて検出した。EGFR 遺伝子変異の有無における HPV 検出頻度を比較し、さらにその関連を腺癌、扁平上皮癌別に比較した。また、統計解析には Fisher の直接確率検定を用いた。

## 【結 果】

肺癌組織 42 例において、EGFR 遺伝子変異は 13 例(31%)、HPV ゲノムは 7 例(17%)において検出された。EGFR 遺伝子変異は、エクソン 19 欠失変異 7 例、エクソン 21 L858R 点突然変異 6 例であった。これら 2 つの変異の重複はなかった。EGFR 遺伝子変異は女性、非喫煙者、腺癌において多数検出される傾向があったが、統計学的に有意な差ではなかった。HPV 陽性症例においては、HPV-16 が 5 例と、最も多く検出された。残りの 2 例は、HPV-58 で、すべての HPV 陽性例において高リスク型 HPV が確認された。組織型別における HPV 検出頻度に差はなかった。HPV 検出率は EGFR 遺伝子変異陽性群で 38%、変異なしの群で 7% であり、その差は有意であった( $P=0.021$ )。この関連は腺癌に限った場合においても有意であった( $P=0.014$ )。HPV-16 ウイルス量の幾何平均値は細胞あたり 0.003 であった。HPV-16 陽性であった腺癌全 3 例において、宿主ゲノムへの HPV ゲノムの組み込みおよび、EGFR エクソン 19 欠失変異が確認された。

## 【結論及び考察】

本研究では、日本人の肺癌組織において EGFR 遺伝子変異と高リスク型 HPV との間に統計学的に有意な関連が認められ、特に腺癌において顕著であった。癌組織中から検出された HPV-16 のウイルス量は非常に低いものではあったが、HPV-16 陽性であった腺癌全 3 例において、宿主ゲノムへの HPV ゲノムの組み込みと EGFR エクソン 19 欠失変異が重複して確認されたことは、興味深い結果である。

近年 Wu らは、HPV16-E6 が EGFR/PI3K/AKT 経路を介し、アポトーシス 2 抑制因子を活性化することを報告している。一方、Henken らも HPV 発癌過程における PI3K シグナルの重要性を指摘していることから、HPV 関連肺癌では EGFR/PI3K/AKT 経路が中心的役割を担っている可能性が考えられた。

(Lung Cancer 2012 (in press))

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 216 号		学位申請者	加藤 卓也
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学)
	副査	榮鶴 義人	副査	於保 孝彦
	副査	米澤 傑	副査	堀内 正久

**EGFR mutations and human papillomavirus in lung cancer**

(肺癌における上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異とヒトパピローマウイルスとの関連)

ヒトパピローマウイルス (以下 HPV) は子宮頸癌の原因であることが明らかになっているが、非生殖器系臓器の発がん過程において何らかの役割を果たしている可能性が示唆されている。肺癌においても、多くの先行研究で癌細胞中に HPV ゲノムが検出されることが報告されている。学位申請者らの先行研究によると、分子標的薬ゲフィチニブ治療が奏効した肺腺癌症例において、高リスク型 HPV ゲノムの陽性頻度が 75% と有意に高かった。ゲフィチニブ奏効率は上皮成長因子受容体 (以下 EGFR) 遺伝子変異と高い相関があることが明らかになっている。そこで学位申請者らは本研究において、肺癌の病理標本を用いて EGFR 遺伝子変異および HPV ゲノムの検出を行い、EGFR 遺伝子変異の有無と HPV 検出頻度との関連を検討するとともに高リスク型 HPV-16 のウイルス量、および宿主ゲノムへの HPV ゲノム組み込みの有無 (以下 physical status) を検索した。対象は肺癌切除症例 42 例で、EGFR 遺伝子変異と HPV ゲノムを PCR 法により検出した。HPV のサブタイプ判定は 16 種類の HPV が検出可能なキット (INNO-LiPA HPV Genotyping CE test) を用いて行った。また、HPV-16 のウイルス定量と physical status 解析には、リアルタイム PCR 法を用いた。

その結果、以下の知見が明らかにされた。

- 1) 肺癌 42 例中 13 例 (31%) で EGFR 遺伝子変異陽性、7 例 (17%) で HPV ゲノム陽性であった。
- 2) 臨床病理学的因子との関連においては、径 3cm 以下の腫瘍で EGFR 遺伝子変異陽性例が、有意に多く認められた ( $P=0.043$ )。女性や非喫煙の症例において EGFR 遺伝子変異陽性頻度が高い傾向にあったものの、有意な関連ではなかった。一方、HPV ゲノムの有無と有意に関連する臨床病理学的因子はなかった。
- 3) HPV 陽性 7 例中 5 例が HPV-16 であり、残りの 2 例も高リスク型の HPV-58 が検出された。
- 4) HPV ゲノムは EGFR 遺伝子変異陽性群で有意に多く ( $P=0.021$ )、特に腺癌において顕著であった ( $P=0.014$ )。
- 5) HPV-16 のウイルス量の幾何平均値は細胞あたり 0.003 コピーであった。HPV-16 陽性腺癌は 3 例であったが、すべての例において HPV-16 ゲノムの組み込みが確認され、EGFR エクソン 19 欠失変異が認められた。

本結果において肺癌組織における EGFR 遺伝子変異と HPV の存在との有意な関連を示した。そのメカニズムは解明されていないが、EGFR 遺伝子変異陽性の肺腫瘍は HPV の影響を受けやすいことが考えられる。特にアジアにおいて多いことが推測され、アジアと非アジアの両地域における肺の発がん過程での HPV の役割を解明する必要があり、今後のさらなる研究が期待される。

本研究は、日本人の肺癌組織において EGFR 遺伝子変異と HPV の存在との関連を検討したものであり、その結果有意な関連が示され、また宿主ゲノムへの HPV-16 ゲノム組み込みが EGFR エクソン 19 欠失変異と重複して確認されたことは非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 216 号	学位申請者	加藤 卓也
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位 博士 (医学)
	副査	榮鶴 義人	副査 於保 孝彦
	副査	米澤 傑	副査 堀内 正久

主査および副査の5名は、平成24年10月22日、学位申請者 加藤 卓也 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) EGFR 遺伝子変異のエクソン 19,21 について調べているが、その他の部位の変異を調べる必要はないのか？

(回答) エクソン 19,21 の変異 2 種で変異全体の約 90%を占めるため、今回はこの2つの部位のみについて検討した。

質問 2) エクソン 19 の欠失は全体または部分的どちらの欠損か？

(回答) エクソン 19 欠失変異はコドン 746-750 を中心とする部位の欠失変異であり、部分的な欠失である。

質問 3) エクソン 19 欠失変異とエクソン 21 点突然変異では EGFR のリン酸化能に違いがあるのか？

(回答) Mulloy らは、エクソン 19 欠失変異のほうが高い自己リン酸化能を示すと報告している。

質問 4) 本研究の考察では、HPV のコピー数が極端に少なくても癌幹細胞を標的とすれば十分であると述べているが、肺癌における癌幹細胞とは具体的にどのような役割をしているのか？

(回答) 癌細胞中においても幹細胞システムに類似した階層性が存在し、癌幹細胞と呼べるような細胞が通常癌細胞を供給しながら癌組織を構成している可能性が指摘されている。

質問 5) HPV タイプの判定を行った方法は具体的にはどのようなものか？

(回答) 16 種類のタイプ特異的な核酸プローブをのせた膜状ストリップを用い、HPV 特異的プライマーを用いた PCR 産物とプローブを結合反応させるものである。ストリップ上のどのバンドが検出されるかによりタイプ判定を行った。

質問 6) 腫瘍の小さい方に EGFR 遺伝子変異が多い理由はどのように考えるか？癌化が進むと変異が無くなるのか？

(回答) EGFR 遺伝子変異のある肺腺癌症例の 43%(9/21)において、周囲の正常組織にも変異が検出された(Tang et al., 2005)という報告があるため、EGFR 遺伝子変異は発癌過程の早期より関与しているものと考えられる。癌の進行により変異が無くなるわけではなく、変異のある腫瘍は比較的ゆっくりと進行するタイプであることも考えられる。

質問 7) EGFR 遺伝子変異は扁平上皮癌よりも腺癌で多いのはなぜか？

(回答) 現在のところ変異が腺癌に多くみられる理由は不明である。

質問 8) 喫煙者においても男性より女性で EGFR 遺伝子変異は多いのか？もし、そうならばその理由は何か？

(回答) 喫煙歴の有無別に、EGFR 遺伝子変異を有する男女比の違いを検討した報告はない。

質問 9) EGFR 遺伝子変異、HPV 検出率がそれぞれ地域で異なる理由は何か？

(回答) EGFR 遺伝子変異は東洋人に有意に多くみられるが、その理由は現在でも不明である。一般に EGFR の変異は同一症例において変異部位の異なる重複例はないとされており、環境要因の可能性は低いと考えるが、最近、頻度は少ないが重複例の報告もあり、今後の検討が必要である。HPV 検出率もアジア地域で高いことが報告されている(Klein et al., 2009)が、その理由についても明らかではない。いずれも肺の組織型の分布によって説明できるものではない。今後は、アジア系(特に日系)移民を対象とした研究において、EGFR 遺伝子変異と HPV 検出率との関連を調べることにより、地域差を説明できる手掛かりが得られるものとする。

## 最終試験の結果の要旨

質問 10) 腫瘍の小さい方に EGFR 遺伝子変異が多いのは、肺腺癌の中心部は進行して大きくなるほど線維化がおこる可能性があり、大きい腫瘍には癌細胞以外の間質の線維組織が多く含まれていて、返って小さい腫瘍の方が癌細胞の密度が高いからという理由は考えられないか？

(回答) 今回用いた検体については、肉眼的に腫瘍が主である病理標本を抽出したため、顕微鏡下で癌細胞を選択して解析に用いた訳ではない。従って、実際には癌細胞以外の間質が多く含まれていた可能性は否定できない。

質問 11) 本研究は非癌部についても調べたのか？

(回答) 本研究では非癌部についての解析は行っていない。しかし、台湾とイタリアの研究報告では HPV 陽性肺腫瘍周囲の非癌部では HPV は検出されなかった。今後は癌部と非癌部の比較を行い、本研究の関連を検討する必要がある。

質問 12) 高リスク型、低リスク型を決定する HPV 側の要因は何か？

(回答) 初期遺伝子 E6,E7 の発癌性そのものである。この E6,E7 高発現細胞の出現が、癌化における律速段階となっていると考えられる。尖圭コンジローマといった良性腫瘍や CIN1 では HPV ゲノムは殆ど episomal form で存在し、E6,E7 発現は低い。一方、CIN2,3 では integrated form がみられるようになり、殆どの例で E6,E7 の発現が誘導される。

質問 13) EGFR 遺伝子変異は EGFR を活性化すると理解してよいか？

(回答) 遺伝子変異があると EGFR が安定化し、ATP やゲフィチニブなどとの結合力が強くなることにより、EGFR の活性化が増強される。また同時に、ゲフィチニブなど阻害薬の効果を増強すると考えられている。

質問 14) EGFR 遺伝子変異は二量体の両方あるいは片方のどちらにあるのか？

(回答) EGFR(erbB1)遺伝子変異をもつ単量体は、同じ erbB ファミリーに属する erbB3 と二量体を形成することによって癌化のシグナルを引き起こしている。従って、二量体といっても、それを形成しているのは erbB1 と erbB3 であるので、遺伝子変異が生じるのは erbB1 の片方のみである。

質問 15) EGFR と HPV の因果関係について、HPV が EGFR 遺伝子変異をおこすのか？

(回答) Arias-Pulido らの報告によると、米国の子宮頸癌 80 症例において EGFR 遺伝子変異は検出されていない。従って、HPV 感染が EGFR 遺伝子変異の要因となるとは言い難い。また、Na らの報告によると、韓国の舌癌 70 症例、扁桃癌 38 症例においては、EGFR 遺伝子変異と HPV との関連はみられなかった。但し、これらの研究は、対象とした臓器や集団が異なるので、今後の検討課題と考える。

質問 16) EGFR 遺伝子変異と HPV との関連は in vitro の実験等で証明されているか？

(回答) そのような報告はない。しかし、台湾の Wu らも肺癌症例において、本研究同様の関連があると報告している。

質問 17) HPV と組織型との関連について明確ではないが、どのように結論づけるか？

(回答) Chen らのプール解析によると、肺腺癌における HPV 検出率はアジアで高く、これは台湾や我々の結果と一致する。今回の結果より、アジア地域の腺癌で HPV 陽性頻度が高い理由は、EGFR 遺伝子変異の頻度が高いことと関連すると思われる。一方、アジア以外の地域では、比較的扁平上皮がんが多い傾向が見られる。この理由は明らかになっているわけではないが、他の宿主あるいは環境要因が関与しているのかもしれない。

質問 18) 今後、予防という観点からみるとどのように展開できるか？

(回答) HPV が、EGFR 遺伝子変異をもつ肺癌のプロモーター的役割を担っているならば、EGFR 遺伝子変異を持つ肺癌症例では、HPV 予防ワクチン投与による発がん抑制効果が期待できる。

質問 19) EGFR 遺伝子変異に HPV が加わることによって腫瘍の増殖能が変わるか？

(回答) HPV は、EGFR 遺伝子変異による発癌と同じ PI3K/AKT 経路を活性化する可能性がある。両者が同じシグナル経路を活性化することによる相乗効果もありうると思われるが、そのような仮説を検証した研究はない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。