

主論文の要旨

Gene copy number gain of *EGFR* is a poor prognostic biomarker in gastric cancer: evaluation of 855 patients with bright-field dual in situ hybridization (DISH) method

胃癌における *EGFR* 遺伝子コピー数増加 (GCN gain)
は予後不良マーカーである
～DISH 法を用いた 855 例の検討～

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

檜垣 栄治

【緒言】

胃癌において受容体型チロシンキナーゼ (RTK) /RAS シグナル経路に関わる遺伝子変異はまれである。一方でそれらの遺伝子増幅、蛋白過剰発現、エピジェネティックな変化は腫瘍増殖に重要な役割を果たしている可能性がある。最近 TOGA 試験の結果から、抗 HER2 抗体である trastuzumab が HER2 陽性進行胃癌の予後を延長させることが明らかとなった。他にも胃癌の遺伝子変化に対する個別化治療の有用性が報告されており、EGFR を含んだ他の RTK に対する治療薬も現在検証中である。Deng らは KRAS, HER2, EGFR, MET, FGFR2 を含んだ RTK をコードする遺伝子の増幅に着目し調査したところ胃がんの 37% にそれらの増幅が存在することを明らかにした。これは、RTK 遺伝子増幅が予後不良に関わるドライバー遺伝子となりえることを示しているのかもしれない。

EGFR は 7 番染色体短腕 (7p12) に存在し、細胞増殖、移動、浸潤、転移をコントロールすることで癌進行に関与している。EGFR の遺伝子数 (GCN) の変化は幅広い癌種で認めており、予後不良因子として認識されている。モノクローナル抗体を含めた EGFR 活性阻害薬やチロシンキナーゼ阻害薬は肺癌や大腸癌、頭頸部癌においては標準治療薬となっている。それゆえに胃癌においても EGFR は分子標的薬として有望な候補と言える。EGFR 蛋白の過剰発現や遺伝子増幅は大腸癌、肺癌においては抗 EGFR モノクローナル抗体の治療効果予測因子となっている。最近、胃癌の抗 EGFR 抗体の大規模第三相比較試験である REAL3 試験 (panitumumab)、EXPAND 試験 (cetuximab) の結果が明らかとなり、結局胃癌に対する抗 EGFR モノクローナル抗体の有用性は証明されなかった。これは試験の適応基準に問題があったと考えられる。EGFR 蛋白の過剰発現、遺伝子増幅は抗 EGFR 薬の治療予測バイオマーカーとなりえることが報告されていることから、これら試験においても同項目を含んだ適応基準が適切であった可能性がある。

我々は根治切除が施行された胃癌を対象とし、免疫染色 (IHC) で評価した EGFR 蛋白の過剰発現が予後不良因子であることを以前に報告した。EGFR 研究の問題点は、EGFR 蛋白の過剰発現の頻度が報告により 2-81% と極めてバラつきがあることである。これはおそらく抗体、判定方法、評価者によって差が生じるという問題があると思われる。これに対して遺伝子増幅の頻度は報告のなかで 2-7% に収まっている。しかし EGFR の遺伝子数の詳細な検討がなされていなかったり症例数が少なかったりと問題もある。蛋白過剰発現と遺伝子数の関係も十分に明らかにはなっていない。

本研究ではこの問題を明らかにすることを目的としている。胃癌の切除検体からサンプルを抽出し EGFR の遺伝子数を検討し、蛋白発現、予後との関連性を検討した。

【対象と方法】

当院における 2003-07 年の胃癌手術患者 855 例について tissue microarray (TMA) で検討した。TMA は 1 症例から離れた 2 か所、2mm のコアを打ち抜き作成した。作成したコアは H&E 染色を施行、dual in situ hybridization (DISH) 法を用いて EGFR 遺伝子数

(gene copy number: GCN)と7番染色体(CEN7)数を算出、 $EGFR/CEN7 \geq 2.0$ をEGFRの遺伝子増幅と定義した。EGFR蛋白発現はIHC法にて評価し0、1+、2+、3+にスコア化した。GCNと蛋白発現は最終的に2つのコアのうち、より高いスコア側を採用した。EGFR GCNと蛋白発現を、予後を含めた臨床病理学的特徴と比較検討した。

【結果】

EGFR GCNと予後：EGFR GCNの中央値は1.9/細胞であった。EGFR GCNが増えるに従ってHazard Ratio(HR)は増加し、 $GCN \geq 2.5$ で有意に予後不良であった。またROC曲線による解析において $GCN = 2.35$ が5年生存の有無を分ける適切なカットオフ値であった (Fig.1a/b)。以上より $GCN \geq 2.5$ をGCN gainと定義し、22.7%(194例)にGCN gainを認めた。そのうち14.9%(29例)に遺伝子増幅($GCN/CEN7 \geq 2.0$)を認め、そのうちEGFR GCN 20個/1細胞以上を有する20例は、遺伝子数が明らかに他の集団から離れて存在していた (Fig. 2)。遺伝子増幅例29例中27例でEGFR遺伝子が核内で集塊を形成しており (Fig.3a)、103例にCEN7のポリソミーを (Fig.3b)を認めた。残りの62例は増幅もポリソミーもなくEGFR遺伝子の少しの増加を認めた (Fig.3c)。EGFR GCN gainは有意に予後不良で、その中でもEGFR増幅は最も強い予後不良因子であった (Fig.4a)。

EGFR GCNと蛋白発現の比較：EGFR IHC3+であった27例はすべて遺伝子増幅を認めた。IHC 2+患者の59.6% (68/114例)にGCN gainを認め (Table 1)、IHC 0/1+群、IHC 2+群のそれぞれの解析ではGCN gainは予後不良因子であった (Fig.4b,c)。

EGFR GCNと臨床病理学的特徴の比較：EGFR GCN gainの患者はTNM stageを含め病理学的な予後不良因子を多く有していた (Table 2)。

予後に関する多変量解析：855例を対象に、pStageを含めた病理組織学的因子のCOX回帰分析をおこなったところ単変量解析では13因子が有意に予後不良因子であり、多変量解析ではそのうち8因子が独立した予後不良因子として同定された (Table 3)。そのなかで増幅のないEGFR GCN gainのHRは1.53 (95% CI= 1.11–2.10, $P = 0.009$)、EGFR遺伝子増幅例のHRは2.46 (95% CI= 1.44–4.21, $P < 0.001$)でいずれも独立した予後不良因子であった。

【考察】

EGFR遺伝子増幅はDNAの複製異常によって引き起こされる。増幅例では染色体内で tandem repeat、染色体外で double minute を形成したEGFR遺伝子が大量に複製され、EGFRシグナルの活性化させる誘因となる。一方でEGFRのGCNの増加 (≥ 2.5 /細胞)は部分的な染色体複製やポリソミーなどさまざまな原因により引き起こされる。EGFR GCN gainはEGFR遺伝子の増幅とはまた異なる形でEGFR関連のシグナルを刺激し活性化させると考えられ、その生物学的重要性はEGFR増幅とは違うかもしれない。

我々はEGFR遺伝子増幅が3.4%と頻度が少なく、極めて予後が悪いことを示した。

EGFR 遺伝子増幅の判定基準は公式にはまだ確立されておらず、遺伝子増幅の定義である EGFR/CEN7 比は 1.7-6.0 までの広い範囲の基準が論文ごとに定められている。それにもかかわらず、EGFR 遺伝子増幅の頻度は報告間であまり差がない。このことは EGFR/CEN7 比が増幅をきたす患者のほとんどで 10 を超えることによると考えられる (Fig.2)。今回の検討でも EGFR の遺伝子増幅例 29 例中 27 例で核内に EGFR 遺伝子の大きな集塊が形成されていた。

胃癌において遺伝子増幅を示さない EGFR GCN gain と臨床学的データとの関係を検討した報告はほとんどない。本研究において EGFR の GCN の増加と予後は、負の相関を示すことが示された。そこで我々は EGFR GCN gain のカットオフ値を 2.5/細胞に定め、このカットオフ値が予後を明確に分けることを証明した。増幅のない EGFR GCN gain も増幅例と同様に予後不良因子であると考えられた。EGFR GCN gain を示す患者は、他にも脈管浸潤、腫瘍深度、リンパ節転移などの病理学的予後不良因子を多く有しており、TNM stage が進行していた。このことは EGFR GCN gain が EGFR RTK シグナルを活性化させ腫瘍進展に影響を及ぼしたと考えることもできる。それゆえに EGFR GCN gain は抗 EGFR 治療における治療効果予測バイオマーカーとして有用であるかもしれない。

胃癌において EGFR GCN と EGFR 蛋白過剰発現の関係の報告はほとんどない。細胞膜への EGFR 過剰発現 (3+もしくは 2+/3+) が予後不良であるとする報告はなされている。本研究では予想通り EGFR 遺伝子増幅と IHC 3+はほぼ一致していた。加えて IHC 2+症例の半分以上で EGFR GCN gain を有しており、EGFR IHC 0/1+群、2+群両方において GCN gain は予後不良因子であった。この結果からは EGFR IHC スコアより EGFR GCN gain はより優れた予後予測バイオマーカーとなりえると考えられた。

【結論】

今回我々は、胃癌において EGFR 遺伝子増幅はまれである一方で、EGFR GCN gain は 22.7%に認めることを示した。そして EGFR GCN gain は EGFR 蛋白過剰発現と良く相関していたが、蛋白過剰発現より正確な予後予測因子であった。今後、抗 EGFR 治療の効果予測バイオマーカーの一つとなる可能性がある。