

## 免疫染色での肺非小細胞癌 EGFR 検出の意義

吉田朋美<sup>1)</sup>、引野利明<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>群馬大学大学院保健学研究科、生体情報検査科学分野

<sup>2)</sup>群馬大学大学院医学系研究科、病理診断学

### はじめに

正常な生理的環境では細胞の恒常性において体内にある細胞は常に他の細胞と情報を交換し合い、増殖と細胞死のバランスを調整している。上皮系の細胞に働いて細胞増殖を促すたんぱく質を上皮成長因子 (EGF : epidermal growth factor) と言い、その細胞側の受容体を上皮成長因子受容体 (EGFR : epidermal growth factor receptor) と言う。EGFR のリガンド結合部位は細胞膜表面に存在し、細胞の増殖や成長の制御に関わる EGF などのリガンドが結合すると EGFR は細胞内に向けてシグナルを出し、その増殖シグナルが核内に伝わり、増殖に関連する遺伝子の発現が起こる。EGFR は正常組織において細胞の分化、発達、増殖、維持の調節に重要な役割を演じているが、この EGFR の遺伝子変異や遺伝子増幅、構造変化が起きると、その結果、癌の増殖、アポトーシス抑制、血管新生、浸潤・転移などの腫瘍の進展、悪性化に関与するようになる。EGFR の過剰発現は予後不良に関連し、またホルモン療法、化学療法、放射線療法において耐性を示すことも知られている。近年では EGFR 遺伝子変異をターゲットとした分子標的薬が開発され、個別化医療の発展に貢献していることが話題となっている一方、EGFR 過剰発現と免疫組織化学染色の意義について、未だ報告は少ない。今回は、肺非小細胞癌における EGFR 蛋白過剰発現の意義について、抗 EGFR モノクローナル抗体を用いた免疫染色像を通して考察する。

### EGFR について

EGFR は上皮系のみならず、間葉系、神経系起源の多様な細胞の細胞膜表面に存在し、621 アミノ酸の細胞外領域、23 アミノ酸の膜貫通領域、542 アミノ酸の細胞内領域から構成されている。増殖や成長の制御に関わる EGF などのリガンドが EGFR の細胞外領域に結合すると、EGFR は細胞膜上を移動して二量体を形成する。この二量体形成により細胞内領域にあるチロシンキナーゼ部位が ATP (アデノシン三リン酸) を利用して、受容体の細胞内領域にあるチロシン残基を自己リン酸化する。チロシンのリン酸化が起こると、さらに細胞内のシグナル伝達系のたんぱく質が次々に活性化され、増殖シグナルが核まで伝わり、増殖に関連する遺伝子の発現が起こる。EGFR 遺伝子コピー数の増加に従って、EGFR 蛋白の過剰発現が起こることが知られており<sup>1)</sup>、EGFR 蛋白の過剰発現は免疫組織化学的手法にて検出可能であり、EGFR 蛋白の過剰発現は乳癌では 14~91%、胃癌では 33~74%、腎癌では 50~90%、大腸癌では 25~77%、卵巣癌では 35~70%、頭頸部癌では 36~100%と、さまざまな悪性腫瘍で確認されている<sup>2)</sup>。

### 肺非小細胞癌の EGFR 蛋白過剰発現の意義

肺の非小細胞癌では 34%から 84%で過剰発現が認められたという報告があり<sup>3,4)</sup>、加えて蛋白過剰発現と予後との関連性も報告されている<sup>2)</sup>。EGFR の過剰発現の機序においては、大きく分けて二つの要因が考えられている。膠芽腫や頭頸部癌では遺伝子増幅が蛋白過剰発現の大きな要因と考えられているが、一方、肺癌、大腸癌、膵癌および尿路上皮癌では遺伝子増幅の見られない症例でも過剰発現が認められることがあることから<sup>5)</sup>、転写亢進が蛋白過剰発現のもう一つの要因と考えられている。鈴木ら<sup>6)</sup>は肺非小細胞癌において免疫染色法と FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用い EGFR 蛋白過剰発現と遺伝子増幅との関連性を検討し、34%で EGFR 蛋白が過剰発現しており、そのうちの 74%に遺伝子増幅があり、免疫染色陽性細胞と FISH の陽性細胞が組織切片上で同一であることも確認している。また組織型や臨床病期との関連性については、組織型と過剰発現との間に関連性は認められなかったものの、腺癌に比し扁平上皮癌では腫瘍細胞の細胞膜に明瞭な陽性所見を認めること、またリンパ節転移がある例、病期が進行した例と蛋白過剰発現は相関していることを報告している。Hirsh ら<sup>7)</sup>は、非小細胞癌の中でも扁平上皮癌や細気管支肺胞上皮癌の形態を示す例では、EGFR 遺伝子コピー数の増加と蛋白過剰発現との関連性が高く、さらにはコピー数の増加している症例の予後が悪い傾向であることも報告している。



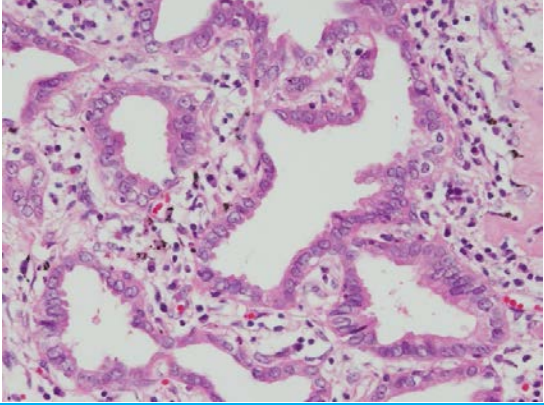
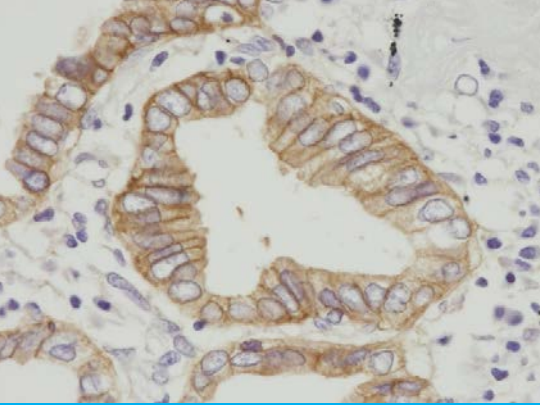
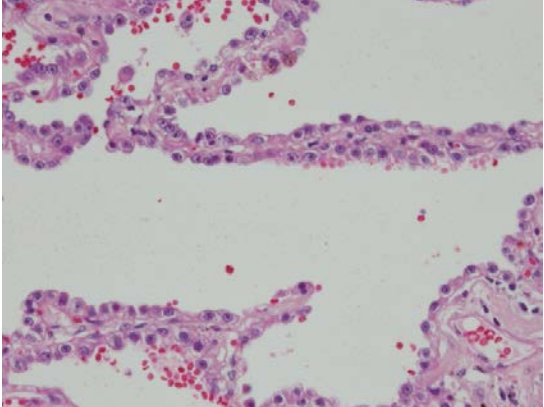
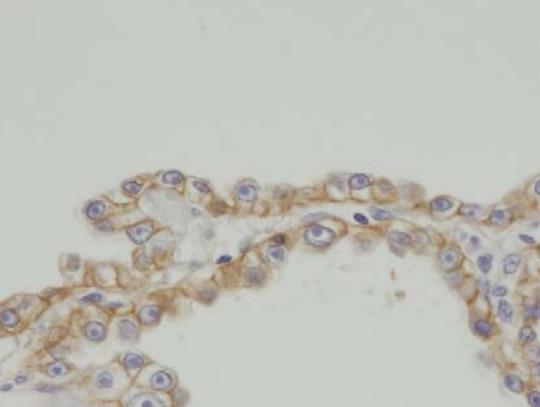
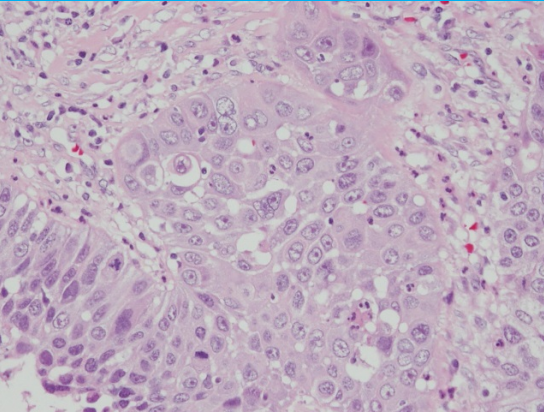
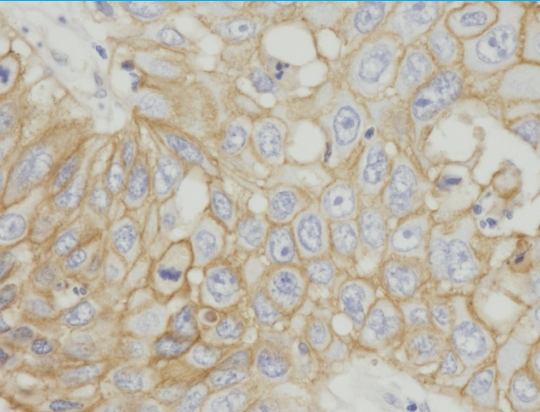
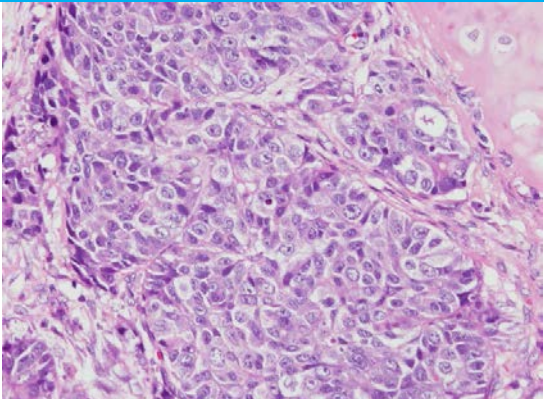
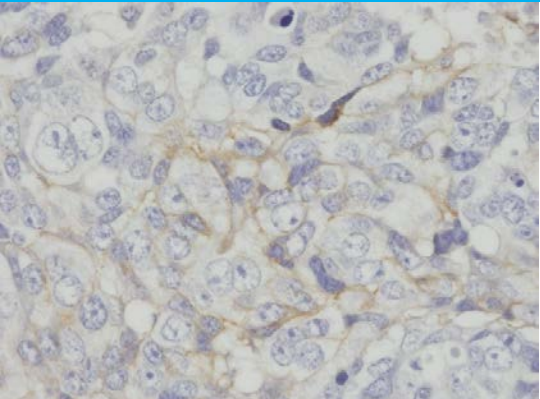
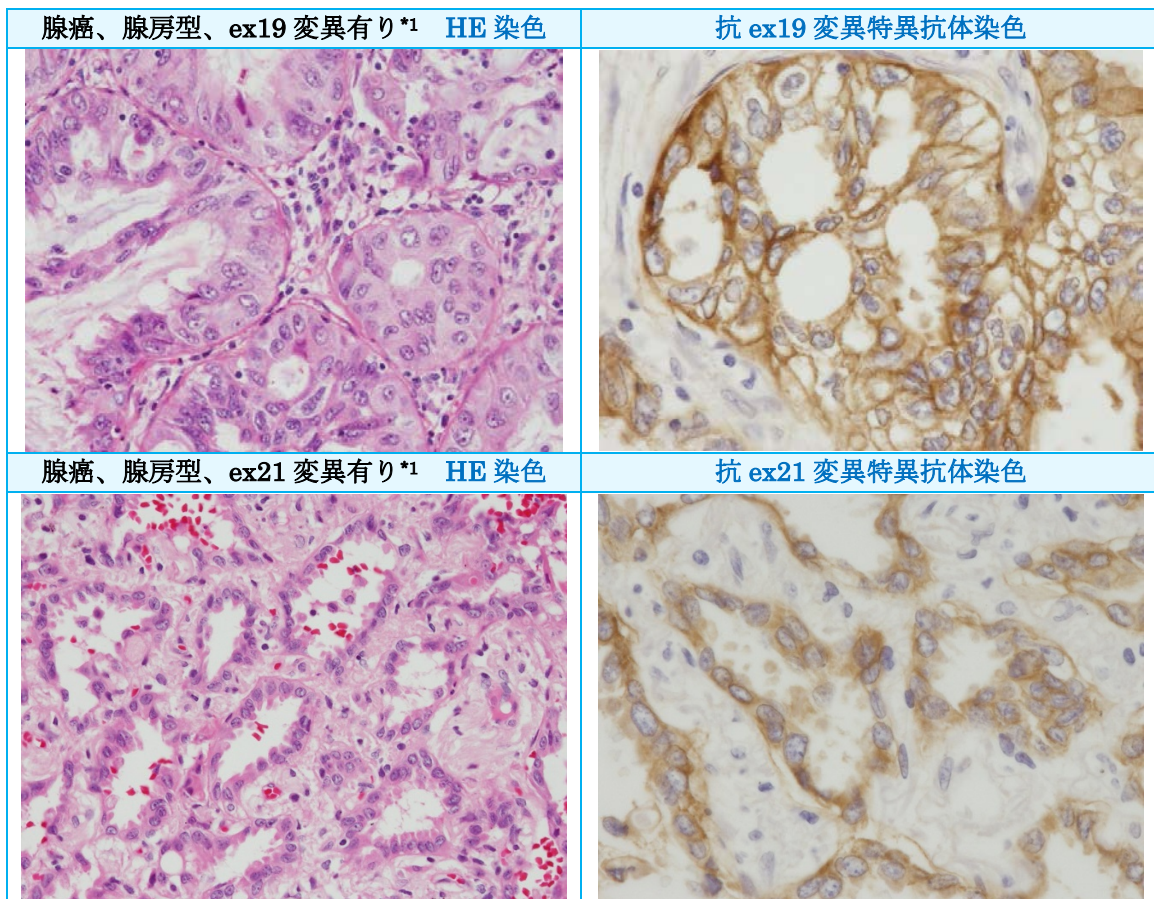
腺癌、腺房型 HE 染色	抗 EGFR 抗体染色
	
腺癌、細気管支肺胞上皮癌 HE 染色	抗 EGFR 抗体染色
	
扁平上皮癌 HE 染色	抗 EGFR 抗体染色
	
大細胞神経内分泌癌 HE 染色	抗 EGFR 抗体染色
	

Figure 1. 抗 EGFR 抗体染色像

### EGFR 変異認識抗体の意義

近年、肺非小細胞癌の薬物治療として EGFR の細胞内ドメインのチロシンキナーゼのリン酸化を阻害する分子標的薬が用いられている。この阻害薬の感受性は腫瘍細胞の EGFR チロシンキナーゼ遺伝子変異と相関している<sup>8)</sup>。EGFR 遺伝子変異にはエクソン 19 の欠失変異とエクソン 21 コドン 858 のロイシン→アルギニンの変異 (L858R) の点突然変異が代表的 (両者で~90%) である。変異が起こるとリガンド非依存性に持続的なチロシンキナーゼ活性を有し、かつ阻害薬への親和性が高くなるために高感受性となり薬剤の奏功率は高くなると考えられている。これらの EGFR 遺伝子変異検査としては、新鮮凍結材料、パラフィン切片、気管支洗浄液などの細胞材料を用い、ダイレクトシーケンス法、real time PCR 法など様々な分子生物学的手法が行われているが、いずれの方法も採取した腫瘍組織あるいは細胞を用いて評価しているため、その組織の採取時期、採取場所、採取量 (腫瘍含有量)、保存状態などにより判定結果が大きく左右される可能性があり、注意が必要である<sup>9)</sup>。また近年、迅速で安価な手法として EGFR 変異を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織染色の有用性も検討されており、癌組織での変異 EGFR の発現、発現強度を視覚的に確認可能であることは、EGFR 変異を正確に検出する手法となることも示唆される<sup>10)-12)</sup>。



\*1 : PNA LNA PCR-Clamp 法により EGFR 遺伝子変異検出例

Figure 2. 抗変異特異抗体の染色像

## おわりに

今回は、肺非小細胞癌における EGFR の過剰発現の検出が可能である抗 EGFR モノクローナル抗体について、また EGFR 変異を検出可能である変異特異抗体を用いた免疫染色を通して、EGFR の意義を考察した。肺非小細胞癌における EGFR の過剰発現については、遺伝子増幅との関連性、予後予測因子となりうるのか、などについて検討されているものの未だ議論の余地を残している。また変異特異的染色の有効性については特異度も高く、今後の診断方法として確立されることが期待されるが、染色強度と遺伝子増幅の関連性などについては、より症例数を増やした更なる研究成果が求められている。現在、免疫染色は日常の病理検査にて日々行われている簡便かつ有用な検査法であり、EGFR 標的治療薬を選択する上で重要な遺伝子検査の精度を高めかつ、簡素化された検査法として確立されることが期待されている。

### 免疫染色に用いた抗原賦活化、抗体、発色試薬について

	抗 EGFR モノクローナル抗体	抗 EGFR 変異特異抗体
抗原賦活化	0.4%ペプシン／0.01NHCl (ペプシン, nacalai tesque)	1mM EDTA (pH8.0) (EDTA, SIGMA, E5134) 煮沸, 30 分
非特異的反応ブロック	0.25%カゼイン／1%ウシ血清アルブミン, 室温, 30 分	
一次抗体	抗 EGFR モノクローナル抗体 (クローン 31G7, ニチレイバイオサイエンス) 4°C, 一晚	抗 EGFR 変異特異抗体 (ex19 : クローン 6B6, ex21 : クローン 43B2) 4°C, 一晚
二次抗体	シンプルステイン MAX-PO MULTI (ニチレイバイオサイエンス), 室温, 30 分	
発色試薬	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 250μL 加 DAB (DOTITE 30mg／0.05Tris 150mL, pH7.6) 0.1%イミダゾール (和光純薬, 特級) 1mL 添加	

## 参考文献

1. Lin CR., et al.: *Science*. 1984; 224:843-8.
2. Nicholson RI., et al: *Eur J Cancer*. 2001; 37(suppl4):9-15.
3. Brabender J., et al: *Cancer Res*. 2001; 7: 1850-55.
4. Franklin WA., et al: *Semin Oncol*. 2002; 29:3-14.
5. Reinmuth N., et al: *Eur Respir J*. 2000; 16:991-6.
6. Suzuki S., et al: *Cancer*. 2005; 103: 1265-73.
7. Hirsch FR., et al: *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3798-807.
8. Lynch TJ., et al: *N Engl J Med*. 2004; 350: 2129-39.
9. 光富 徹哉ら：肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の解説、2009 年 5 月
10. Yu, J., et al: *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 3123-28.
11. Kitamura A., et al. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:3349-55.
12. 池田 聡ら：病理と臨床、2011; 29(5): 537-42.