

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

肺癌における予後マーカーとしての EZH2 発現と ゲノム解析による予後・転移規定因子同定

研究代表者 小山 信之(埼玉医科大学 国際医療センター 呼吸器内科)

緒言

Polycomb 遺伝子群 (PcG) はクロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現を抑制する遺伝子の一群であり、PcGに属する複数の蛋白質によって複合体, Polycomb repressor complex (PRC) を形成して機能を発揮する. Enhancer of zeste homolog (EZH2) はPRC2の構成分子であり、ヒストンH3のLysine 9と27に対するメチル化を促進し、さまざまな遺伝子発現を抑制することがわかっている¹⁾. EZH2に関する研究は発生学、幹細胞および癌増殖経路に関する分野において盛んであり、EZH2は幹細胞のpluripotencyにおいて重要であることがわかっているが、最近EZH2の過剰発現が前立腺癌等の転移に関与している可能性があることが報告された²⁾. しかしながらこれまでに肺癌を対象としたEZH2に関する解析の報告はなく、肺癌の臨床病理学的特徴や生物学的特性、分子病態とEZH2の関係は不明である.

これまでに我々は20種類の肺癌(一部は悪性中皮腫)細胞株におけるEZH2 mRNAの発現をrealtime PCRを用いて解析し、50%以上の細胞株で正常ヒト肺組織に比して発現が2倍以上亢進していることを確認した(Fig 1). さらにEZH2 mRNAの発現亢進がみられている細胞株に対して抗EZH2抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、EZH2蛋白の著しい発現が認められていた. 多くの肺癌細胞株において、EZH2がmRNA、蛋白レベルともに発現亢進していることが確認されたことから、EZH2が肺癌の病態に対して影響を及ぼしている可能性が示唆された. これら肺癌細胞株での実験結果をもとに、臨床検体を用いてのEZH2発現に関する研究を計画し、すでに埼玉医科大学倫理委員会にて審査を受けて承認済みである. そこで患者同意を得て非小細胞肺癌切除検体に対して免疫組織化学を用いたEZH2発現解析を行い、EZH2発現と臨床病理学的特徴との関係を調査してEZH2が非小細胞肺癌における予後をはじめとした臨床的なマ-

ーカーになりうるかについて検討をおこなった.

方法

EZH2 mRNA発現解析; 20種類の肺癌(一部は悪性胸膜中皮腫)細胞株からtotal RNAを抽出し、realtime PCRを用いてEZH2 mRNA発現レベルを解析した. コントロールとして正常ヒト肺組織total RNAを用い、細胞株/正常ヒト肺組織の発現比にて細胞株におけるEZH2 mRNA発現レベルの評価を行った.

免疫組織化学; 84例のI期非小細胞肺癌症例(Table 1)の外科切除標本から薄切切片を作製した後、抗ヒトマウスEZH2モノクローナル抗体を一次抗体として用いた免疫染色を行った(Fig 2). 過去の報告をもとにEZH2蛋白発現レベルを半定量的に解析して、発現レベル別に3群(非発現群29例; 0%, 低発現群33例; <50%, 高発現群22例; >50%)に分類し、各群における生存期間、年齢、性別、組織型、組織分化度、病期、腫瘍径を比較した³⁾(Table 2).

結果

EZH2 mRNA発現解析; 20種類の細胞株中11種類の細胞株において有意な発現亢進(発現比2.0以上)が見られた(2.0-6.9). 一方4種類の細胞株では相対的に発現低下が見られた(0.3-0.7). これらから肺癌細胞株におけるEZH2 mRNA発現亢進は比較的高頻度で認められるということが新たに判明した(Fig 1).

免疫組織化学; 免疫組織化学によるEZH2発現解析と臨床病理学的特徴との比較から生存期間と病期がEZH2発現と有意な相関を示し、3群比較においてEZH2非発現群で有意に生存期間延長が見られた. さらにEZH2低発現群と高発現群をあわせたEZH2発現群とEZH2非発現群との2群比較においても、EZH2非発現群は有意に生存期間延長を認めた(Fig 3). 一方生存期間に関与する因子の解析では、EZH2発現と病期のみが生存期間と有意な相関を示した(Table 3).

Cox比例ハザードモデルを用いた多変量解析で

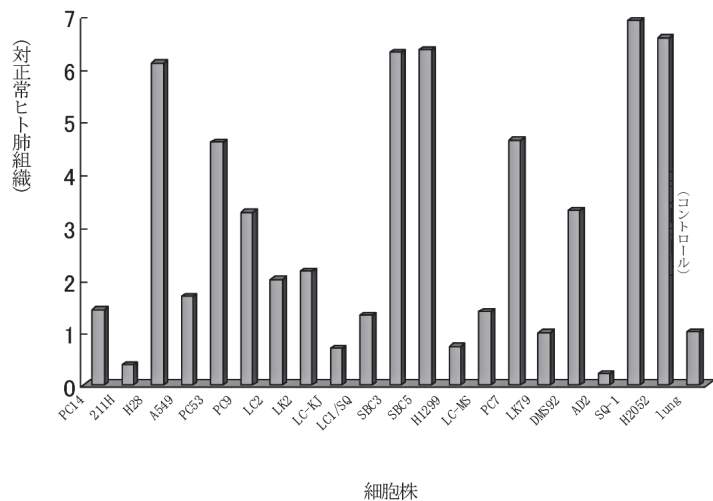


Fig1. 肺癌細胞株における EZH2 mRNA 発現. 肺癌細胞株とヒト肺における EZH2 mRNA 発現を EZH2 発現値 / GAPDH 発現値にて測定し, 肺癌細胞株とヒト肺との比により過剰発現の有無を解析した.

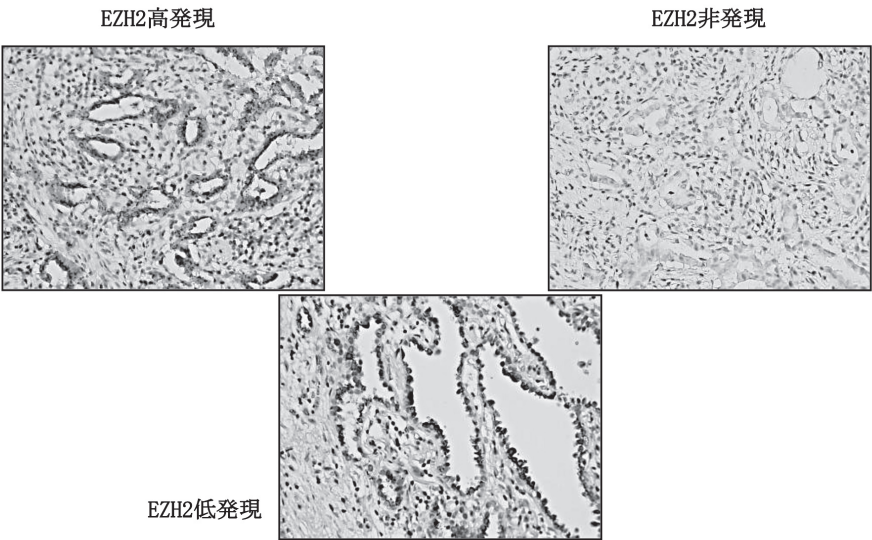


Fig2. 免疫組織化学を用いた非小細胞肺癌における EZH2 発現. 免疫組織化学を用いて非小細胞肺癌切除標本における EZH2 蛋白発現を解析し, 3 群 (発現細胞数が視野内において 10% 未満の場合 EZH2 非発現群, 10-50% 未満の場合 EZH2 低発現群, 50% 以上の場合 EZH2 高発現群) に分類した.

Table1. 解析症例の臨床病理学的特徴

年齢 (平均) :	64.2 ± 11.0 歳
性別 :	男性: 54 例 女性: 30 例
病期 :	IA: 58 例 IB: 26 例
組織型 :	腺癌: 55 例 扁平上皮癌: 27 大細胞癌: 2
生存期間 (平均) :	2206.5 日間

Table2. EZH2 発現と臨床病理学的特徴との関係

	年齢 (歳 ; 平均)	性別 (男 : 女)	病期 (IA : IB)	組織型 (腺癌 : 非腺癌)	組織分化度 (X 高分化 : 非高分化)	生存期間 (日)
EZH2 非発現 (29)	63.9 ± 11.5	15:14	24:5	20:9	18:11	2484.9
EZH2 低発現 (33)	63.6 ± 11.3	23:10	21:12	21:12	17:16	2015.3
EZH2 高発現 (22)	65.3 ± 10.4	16: 6 P<0.05	13:9	14:8	13:9	1854.7 P<0.01

は、EZH2発現と病期が生存期間と有意な相関を示し、特にEZH2は5.46と最高値を示した (Table 4). さらにPearsonの相関係数では、病期、性別、組織型は各々相関を示したが、EZH2発現は他の因子との相関が見られず、単独で危険因子となることが判明した (Table 5).

考察

肺癌は様々な治療法の開発にも関わらず年間死亡者数が世界で130万人以上、日本でも6万人以上と全癌種中最多である。そのために新たな治療法や早期に診断、最適な治療を可能にするマーカー等の新たな診断法の開発が最も望まれている癌であるが、いまだ途上段階であり十分とはいえない。本研究では根治的外科

治療を行ったI期非小細胞肺癌症例において、EZH2発現が予後予測因子となることが示唆された。I期非小細胞肺癌術後に予後を規定するのは主に再発の有無と考えられ、今後EZH2発現がみられた症例では積極的な術後化学療法を行うことにより、再発予防、生存期間延長に結びつく可能性がある。現在のエビデンス、ガイドラインではI期非小細胞肺癌に対する術後化学療法は、IB期肺腺癌に対する経口化学療法剤 (テガフル・ウラシル) のみで、IA期に対しては術後化学療法の有効性は証明されていない⁴⁾。今後EZH2発現の有無による術後化学療法施行に関する臨床試験を行うことにより、EZH2発現による肺癌個別化医療の確立が可能か否か検証可能と考えられる。

要約

EZH2はI期非小細胞肺癌の有効な予後予測因子となる可能性が示唆された。今後臨床応用に向けて研究を進めることで、肺癌に対する個別化医療の進展に寄与することが期待される。

引用文献

1) Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C,

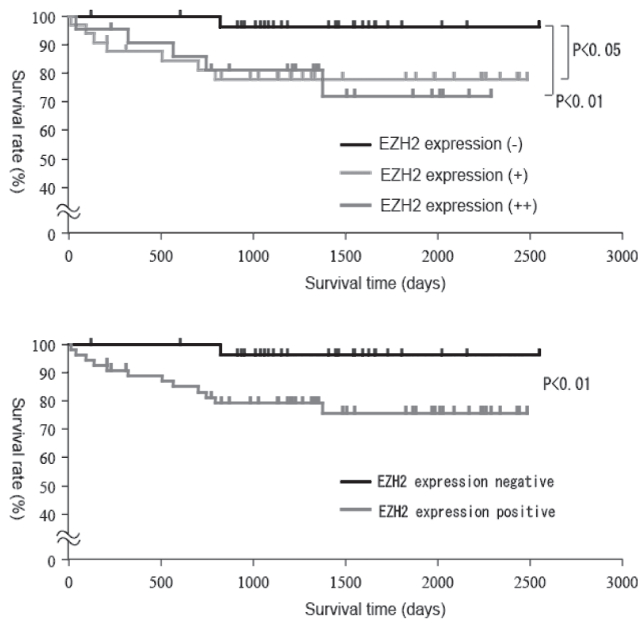


Fig3. EZH2発現レベルによるKaplan-Meier生存曲線。EZH2発現により分類した3群の生存率をKaplan-Meier生存曲線を用いて解析した。EZH2非発現群は有意に生存期間延長を示した。

Table3. EZH2発現以外の因子と生存期間との関係

因子	平均生存期間 (日)	P値
年齢 (≥ 64 歳 : 64歳<)	2007.4 : 2361.4	P=0.103
性別 (男性 : 女性)	2037.5 : 2340.8	P=0.269
病期 (IA : IB)	2390.6 : 1694.9	P<0.001
組織型 (腺癌 : 非腺癌)	2274.7 : 1978.8	P=0.299
組織分化度 (高分化 : 非高分化)	2269.0 : 2047.6	P=0.358
EZH2発現 (非発現 : 発現)	2484.9 : 2007.6	P=0.026

Table4. Cox比例ハザードモデル

	危険度	95% 信頼区間下限	95% 信頼区間
EZH2発現	5.465852872	1.68877163	43.37511346
年齢	1.885126093	0.54353425	6.538135159
性別	1.194031688	0.21282008	5.663969895
組織型	0.977495994	0.25249957	3.029796256
組織分化度	0.802995326	0.21282008	3.029796256
病期	4.51150519	1.26444786	16.09689071

Table5. Pearsonの相関係数

	EZH2発現	年齢	性別	組織型	組織分化度	病期
EZH2発現		NS	NS	NS	NS	NS
年齢	NS		NS	NS	NS	NS
性別	NS	NS		P<0.01	NS	P<0.001
組織型	NS	NS	P<0.01		NS	P<0.01
組織分化度	NS	NS	NS	NS		NS
病期	NS	NS	P<0.001	P<0.01	NS	

- Lebersorger A, et al. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. EMBO J 1997;16:3219-32.
- 2) Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature 2002;419:624-9.
 - 3) Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H, et al. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. Cancer Sci 2006;97:484-91.
 - 4) Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med 2004;350:1713-21.
- 細胞肺癌予後との関係, 第48回日本呼吸器学会学術講演会
- 2) Huqun, Jialing Zhang, Nobuyuki Koyama, Yoshiya Goto, Hiroyuki Nitanda, Yoshihiko Shimizu, Koichi Kaneko, Minoru Kanazawa, Kunihiro Kobayashi, Koichi Hagiwara. Enhancer of zeste 2 (EZH2) as a prognostic marker of non-small cell lung cancer, 第67回日本癌学会学術総会
 - 3) Huqun, Jialing Zhang, Nobuyuki Koyama, Yoshiya Goto, Hiroyuki Nitanda, Yoshihiko Shimizu, Koichi Kaneko, Minoru Kanazawa, Kunihiro Kobayashi, Koichi Hagiwara. Enhancer of zeste 2 (EZH2) as a prognostic marker of non-small cell lung cancer, 第49回日本肺癌学会総会
 - 4) Nobuyuki Koyama, Huqun, Jialing Zhang, Yoshiya Goto, Hiroyuki Nitanda, Yoshihiko Shimizu, Koichi Kaneko, Minoru Kanazawa, Kunihiro Kobayashi, Koichi Hagiwara. Enhancer zeste homolog (EZH) 2 expression reduces the survival of the patients with non-small cell lung cancer, 100th American Association for Cancer Research

研究成果リスト

学会発表

- 1) 呼群, 張嘉玲, 小山信之, 後藤義也, 二反田博之, 清水禎彦, 金子公一, 金澤實, 小林国彦, 萩原弘一. Enhancer of zeste homolog (EZH2) 発現とI期非小