

ECT2 is a new prognostic marker
for early lung adenocarcinoma.

(ECT2は、初期肺腺癌における新しい予後予測マーカーである)

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

村田佳彦

筑波大学

博士（医学）学位論文

略語一覽

IASLC/ATS/ERS : International Association for the Study of Lung Cancer/ American

Thoracic Society/European Respiratory Society

AIS : adenocarcinoma *in situ*

MIS : minimally invasive adenocarcinoma

LBAC : Localized bronchioloalveolar carcinoma

CGH : Comparative Genomic Hybridization

FWER : family wise error rate

FDR : False discovery rate

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

目次

略語一覧

1. 要旨	4
2. はじめに	8
3. 目的	12
4. 方法	13
4.1. Array- Comparative Genomic Hybridization (CGH)	
4.2. Quantitative Real-Time genomic PCR	
4.3. Immunohistochemistryとその評価方法	
4.4. Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH)	
4.5. 10k-SNP array	
4.6. cDNA microarray	
4.7. 相関分析	

4.8. 統計分析	
5. 結果	23
5.1. Array-CGHにおける遺伝子増幅領域の検出	
5.2. 早期肺腺癌におけるQuantitative Real-Time genomic PCRの結果とArray-CGHの結果の再現性について	
5.3. 進行肺腺癌を対象としたQuantitative Real-Time genomic PCR	
5.4. Quantitative Real-Time genomic PCRでの腫瘍/正常比と免疫組織化学染色でのスコアとの相関の検証	
5.5. FISHを用いたECT2高増幅、高発現症例の増幅の検証	
5.6. 免疫組織化学染色を用いたECT2発現とKi-67 labeling index、mitotic indexとの関連	
5.7. ECT2の発現における予後解析	
5.8. 国立がんセンター病院の症例における10k-SNP arrayでのECT2の増幅	
5.9. 国立がんセンター病院の症例におけるcDNA microarrayを用いたECT2の発現解析	
6. 考察	30

6.1	Array-CGHを使用した小型肺腺癌における遺伝子増幅の検出	
6.2	Quantitative real-time genomic PCRを用いた候補遺伝子の選択と遺伝子増幅と発現の相関における検討	
6.3	浸潤性肺腺癌におけるECT2の発現と予後との関連と他院検体におけるECT2の増幅と発現解析結果	
6.4	本研究における今後の課題と展望	
7.	総括	36
8.	謝辞	38
9.	参考文献	39
10.	図・表	51

1. 要旨

【背景】

腫瘍の発生増悪のメカニズムを解明するには、初期病変、すなわち前臨床がんにかかる異常を探究することが必須である。肺腺癌に関しては、EGFR、KRAS、ALKなど多くの遺伝子変異が見つかったが、これらの遺伝子異常の多くは進行肺腺癌を用いて検討されていて初期浸潤性肺腺癌に注目した検討はない。さらに、EGFR、c-myc、METを除いた肺腺癌における遺伝子コピー数異常はほとんど報告されていない。

【目的】

小型肺腺癌において、非浸潤癌(Type A、B)と初期浸潤癌(Type D、E)におけるゲノム増幅異常を網羅的に検出し、肺腺癌の初期悪性化に関わるような遺伝子異常を明らかにすることを目的とした。

【方法】

野口分類のType A、B 6例とType D、E 9例を用いてArray-CGHを行い、染色体異常(ゲノム増幅)の領域を特定した。その領域に含まれる遺伝子について、Array-CGHで使用した症例を含むType A、B 15例とType D、E 17例を用いてQuantitative Real-Time genomic PCRを行い、Array-CGHの結果を検証した。さらに、小細胞肺癌、扁平上皮癌を除く症例を対象にした肺癌69例(進行肺腺癌51例、大細胞癌6例、多形癌12例)を追加して種々の遺

伝子に対してゲノム増幅の程度を検証した。また、Quantitative Real-Time genomic PCRによって得られたゲノム増幅の程度が、タンパク発現にどの程度相関しているのか、Quantitative Real-Time genomic PCRの腫瘍/正常比がすべての遺伝子で <1.0 だった20例と、それぞれの遺伝子で ≥ 1.5 だった症例(ECT2: 11例、EIF5A2: 9例、PIK3CA: 13例、TNFSF10: 12例)を用いて免疫組織化学染色を行い、各遺伝子の発現を定量化し、検討を行った。最もゲノム増幅とタンパク発現との間に相関傾向を認めたECT2について、浸潤性肺腺癌66例を用いてさらに免疫組織化学染色を行い、その発現と予後との関連を検討した。また、ECT2は細胞分裂に関与しているとの報告があることから、核分裂に関与するKi-67 labeling indexやmitotic indexとの相関を検討した。さらに、国立がんセンター病院の症例に対して、10k-SNP array、cDNA microarrayを用いて今回の検討結果を検証した。

【結果】

Array-CGHの結果、Type A、Bに比べ、Type D、Eで3q領域が有意に増幅していた。3q領域の中でも、3q26領域に最も多く遺伝子増幅が認められ、その中には、ECT2、EIF5A2、EVI1、PIK3CA、TNFSF10、SKIL、TERCの7遺伝子が含まれていた。Quantitative Real-time genomic PCRを行い、Array-CGHの結果を再現できたのは、ECT2、EIF5A2、PIK3CA、TNFSF10であった。これらの遺伝子に対して、Quantitative Real-time genomic PCRによるゲノム増幅の程度と免疫組織化学染色におけるタンパク発

現異常との相関を検討したところ、ECT2が最も強い相関傾向にあった。そこでECT2について、浸潤性肺腺癌66例を用いて免疫組織化学染色による発現と予後との相関を検討したところ、ECT2の高発現群では、有意に予後不良であった。また、Ki-67 labeling indexや mitotic indexとも相関した。本研究結果を国立がんセンター病院の症例を用いて検証した。小型肺腺癌64例を用いて10k-SNP arrayを行うと、ECT2は初期浸潤癌において増幅が認められ、早期浸潤性肺腺癌144例を用いてcDNA microarrayを行うと、ECT2の発現は独立した予後因子であることが確認された。

【考察】

Array-CGHを用いた解析で非浸潤癌(Type A、B)に比べ、初期浸潤癌(Type D、E)において有意に3q領域に増幅が認められた。今回の結果は3q領域には、肺癌においてがんの悪性化(転移・浸潤)に関与する遺伝子が含まれている可能性が示唆される。その中でも、3q26領域に含まれるECT2 (Epithelial cell transforming sequence 2)は、今回解析した遺伝子の中で最もタンパク発現と関連し、予後とも関連した重要な遺伝子異常 (増幅と発現亢進)と考えられた。ECT2は、細胞分裂や細胞増殖、浸潤に関与することが報告されている。本研究で明らかになった様にECT2のゲノム増幅や発現亢進は肺腺癌発生の極めて初期に起こる異常で、腺癌の悪性化にあたって細胞分裂能力の亢進 (ECT2の異常)が重要な要因であることが示唆された。

【結論】

小型肺腺癌の中で非浸潤癌(Type A、B)と、初期浸潤癌(Type D、E)に対してArray-CGH解析を行い、初期浸潤癌に有意に認められる増幅領域として3q26領域を明らかにした。さらに3q26領域に存在する遺伝子群についてQuantitative Real-time genomic PCR、免疫組織化学染色を行い、また病理学的因子や予後との関連を検討した結果、ECT2のゲノム増幅と発現亢進は肺腺癌発生の初期から認められる重要な予後予測因子であり、腫瘍の初期悪性化に関わることを見いだした。

2. はじめに

近年、日本における死因の第1位は悪性腫瘍で、その中でも肺癌は大きな割合を占めており、男性においては肺癌による死亡数が1位、女性では2位である⁽¹⁾。肺癌は、組織型によって臨床経過や治療に対する反応も異なってくるため、病理組織学的分類に基づく治療方針の決定がなされる。2004年に出版されたWHO分類 (World Health Organization Classification of Tumours)⁽²⁾では、肺の悪性上皮性腫瘍として、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、および大細胞癌など主要な組織型のほか、腺扁平上皮癌、肉腫様癌、カルチノイド腫瘍、および唾液腺型腫瘍が定義されている。これらの組織型の中でも腺癌は日本で最も多い組織型であり、欧米でも近年増加傾向にある。肺腺癌に関しては、多くの遺伝子変異が見つかっており、EGFR、KRAS、p53、BRAF、HER2、NRAS、MEK1のmutationやPIK3CA、AKT1の遺伝子増幅、ALK、ROS1、RET遺伝子の転座など数多くの報告がある⁽³⁻¹⁴⁾。しかしながら、これらの遺伝子異常の多くは進行肺腺癌で認められるものであり、初期浸潤性肺腺癌に注目した報告はなく、また、EGFR、c-myc、METを除いた肺腺癌における遺伝子コピー数異常はほとんど報告されていない⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。

多くのゲノム異常を解析する方法論の中でArray-Comparative Genomic Hybridization (CGH)は、細胞株におけるがん遺伝子の増幅の検出など遺伝子のコピー数の上昇を検出し、その細胞の性質を評価する手段として発展してきた⁽¹⁸⁾。Array-CGH法はがん研究において有用な手法であり、多数のクローン化したDNA断片をアレイ化したスライドガラス上で検

討する対象 (細胞株や実際のヒト症例)の断片化したDNAとハイブリダイズすることで、微細な増幅変化や欠失を検出することが可能である^(19,20)。また、スポットされているDNAは既知の遺伝子の配列であるので、増幅の検出が標的候補遺伝子に直結する。さらに、従来のCGH法よりも高感度であるので、それまで見逃されていた狭い領域での異常も検出可能である。2004年に稲澤らは、癌関連遺伝子の解析を目的とした、Cancer Array 800を開発した。このArrayは、800のBACクローンを搭載したDNA arrayで、786個の癌関連遺伝子が含まれており、100kb～数Mbレベルのゲノム構造異常を全染色体にわたり網羅的に検出することができる⁽²¹⁾。

1995年に野口らは、2cm以下の小型肺腺癌を既存の肺胞上皮を置換しながら増殖する形態か否かで大きく2群に分類し、さらに前者を浸潤の程度によってType AからCに、後者をその増殖パターンによってType DからFにそれぞれ分類した⁽²²⁾。(表1、p.70) 既存の肺胞上皮を置換して増殖する形態を持つ群は、Type A (Localized bronchioloalveolar carcinoma; LBAC, 限局した肺胞上皮癌)、Type B (LBAC with foci of collapse of alveolar structure, 腫瘍内に肺胞虚脱型の線維化巣を認める限局性肺胞上皮癌)、Type C (LBAC with foci of active fibroblastic proliferation, 腫瘍内に線維芽細胞の増生を伴う線維化巣を認める限局性肺胞上皮癌)の3タイプに分類される。一方、肺胞上皮非置換型の群は、Type D (Poorly differentiated adenocarcinoma, 充実破壊性に増殖する充実型腺癌)、Type E (Tubular adenocarcinoma, 管状腺癌)、Type F (Papillary adenocarcinoma with a

compressive growth pattern, 眞の乳頭状腺癌)の3タイプに分類される。また、Type A、Bは非浸潤癌(AIS)であり、Type C、D、E、Fは浸潤癌に分類される。さらに、Type A、Bは術後の5年生存率100%で、非常に予後良好な腫瘍である。Type D、E、Fは小型ではあるが、浸潤癌であり、術後の5年生存率は50%程度である。一方で、Type Cは微少浸潤癌から浸潤癌であり、術後の5年生存率は75%程度である。このType Cの中でも線維化が軽度なものをType C'として南らは新たに分類した。このType C'症例群はいわゆる微少浸潤癌と呼ばれる症例に相当する⁽²³⁾。

近年、IASLC/ATS/ERS (International Association for the Study of Lung Cancer)より、肺腺癌における新しい腺癌分類が提唱された^(24,25)。(表2、p.71) この分類の中で肺腺癌は上皮内腺癌 (adenocarcinoma *in situ*, AIS)、微少浸潤癌 (minimally invasive adenocarcinoma, MIS)、浸潤性腺癌 (invasive adenocarcinoma)と基本分類され、この考え方は腺癌の悪性進行の経時変化の概念を取り入れている。従ってこの新しい腺癌分類は、様々な肺腺癌の組織型の臨床転帰に基づいているといえる。

肺腺癌においては、多段階発癌が知られており、複数の遺伝子異常が蓄積することに伴って、腫瘍の進展や浸潤が起こると考えられている⁽²⁶⁾。(図1、p.51) まず、様々な発癌物質への暴露の結果としてAtypical adenomatous hyperplasia (AAH) が発生する。AAHでは、半数以上の症例でEGFRの変異が起こり、AISへと進行する。それと同時に、p16が制御しているアポトーシス機能の不活化などが起こる。さらに、浸潤癌への進展の過程で

は、p53の変異及び17p12-p13、18p11、11p11-p12のloss of heterozygosity (LOH)など様々な遺伝子異常が起こることが知られている。つまり、進行肺腺癌では、すでに多くの遺伝子異常が蓄積しており、ある遺伝子異常を見つけても、それがいつ発生した異常で、どの程度悪性化に関与しているのかは確定困難である。そこで、肺腺癌をより早期に発見し治療するには、より初期の悪性化に重要な遺伝子異常を探求することが必須である。本研究では、初期病変の中でも予後良好である非浸潤癌 (Type A、B)と、小型ではあるが予後不良である初期浸潤癌 (Type D、E)を比較することで初期の異常を検出することを試みた。結果的にECT2遺伝子の異常増幅やタンパク発現亢進が初期肺腺癌の悪性化に重要であることを見いだした。特にタンパク発現の亢進は、患者の予後に良く相関することが確かめられた。肺腺癌の初期悪性化の分子メカニズム解明にはECT2遺伝子異常の成り立ちを明らかにしていく必要がある。

3. 目的

肺腺癌の初期病変である小型肺腺癌を対象にし、非浸潤癌 (Type A、B)と初期浸潤癌 (Type D、E)間での増幅や欠失などのゲノム異常を網羅的に検出し、肺腺癌の初期悪性化に関わるような遺伝子異常を明らかにすることを目的とした。

4. 対象と方法

本研究のデザインを図2 (p.52)に示す。

4.1. Array-CGH

筑波大学附属病院呼吸器外科で1999年～2007年までに行われた20mm以下の小型肺腺癌のうち、メタノール固定標本があり、腫瘍細胞が十分に採取できる15例を使用して検討を行った。病期分類に使用した第7版TNM分類を表3、4 (p.72、73)に示す^(27,28)。症例の内訳は、Type A、B 6例、Type D、E 9例である。(表5、p.74) これらの症例については、全て術前に書面における包括同意を得ている。また、今回Array-CGHに使用した症例は筑波大学医の倫理審査委員会で承認を受けた。

Array-CGHの概略を図3 (p.53)に示す。野口分類のType A、B 6例とType D、E 9例について、メタノール固定検体の正常部と腫瘍部からLM-200 laser-capture microdissection system (Arcturus Engineering, Mountain View, CA)を用いてそれぞれの切片から正常部は肺胞上皮細胞を含む肺胞部分、腫瘍部は腫瘍細胞 (腫瘍間質を含む)を採取した。DNAを抽出後、全ゲノム増幅を行い、正常部と腫瘍部の差次で得られた遺伝子を標的としArray-CGH解析を行った。Array-CGHは東京医科歯科大学の稲澤譲治博士が開発したCancer Array 800で、800のBACクローンを搭載したDNA arrayに786の既知の癌関連遺伝子が含まれている⁽²¹⁾。ハイブリダイズしたスライドは、GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments Inc., FosterCity,

CA)を用いてスキャンした。染色体のloss、gain、amplification、ホモ接合体欠失に対応するシグナル比の閾値はAnalysis software ACUE2 (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan)のGaussian Mixture法を用いて決定した⁽²⁹⁾。

4.2. Quantitative Real-time genomic PCR

Array-CGHで有意に増幅が検出された遺伝子について、Quantitative Real-time genomic PCRを用いて結果の検証を行うとともに増幅の程度を検討した。筑波大学附属病院で1996年～2012年までに行われた非小細胞、非扁平上皮癌の手術検体101例を使用して検討を行った。これらの症例については、全て術前に書面における包括同意を得ている。症例の内訳は、Type A、B 15例(うちArray-CGHに使用した6例含む)、Type D、E 17例 (うちArray-CGHに使用した9例含む)、浸潤性肺腺癌51例、大細胞癌6例、多形癌12例である。(表6、p. 75)

それぞれの症例の腫瘍部分、正常部分のメタノール固定検体のパラフィン包埋ブロックより、10 μ mに薄切し、QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany)のprotease Kで消化し、DNAを抽出した。(本検討では腫瘍細胞のmicrodissectionは行わず、肉眼的に腫瘍部、非腫瘍部を確認して試料を採取している) 今回使用した症例におけるDNAの品質を図4 (p.54)に示す。DNAの品質に関して、一般にA260/A280吸光度比が1.8以上の場合、高品質なDNAであると言われているが、今回抽出したDNAは1.8以下の症例も含まれるが、

全例PCRにて検討可能であった。

対象とした遺伝子は、3q26領域にあるECT2、EIF5A2、EVI1、PIK3CA、TNFSF10、SKILの6遺伝子と3q29領域にあるMUC4の合計7遺伝子である。3q26領域内で遺伝子増幅が確認された遺伝子の中にはTERCも含まれていたが、TERCは遺伝子構成のほとんどがRNAによって構成されており、イントロンを含んだprimerの設計が困難だったため、今回の検討からは除外した。3q29領域において増幅が認められたMUC4は、肺腺癌の粘液産生に寄与することが知られており、肺腺癌においてその発現と予後が関連するとの報告があるため追加して検討した⁽³⁰⁾。

それぞれに特異的な oligonucleotide primer は、 primer3 software (<http://primer3.sourceforge.net/>)を使用して設計し、PIK3CAについてはSoh Jらの文献を参考にした⁽³¹⁾。また、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を内因性コントロールとした。primerの配列を表7 (p.76) に示す。さらにプライマーの認識部位と増幅産物のサイズについて表8 (p.77)に示す。本検討では、RNAの混入による結果の誤差をなくすために、すべてのプライマーでイントロンを含んだ配列を設計し、ゲノムの増幅のみを検出した。Quantitative Real-time genomic PCRは、インターカレーター法でSYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time; Takara Bio, Tokyo, Japan)を使用し、ABI 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて行った。(図5、p.56) PCRのサイクルは、95°Cにて30秒熱変性後、95°C 5秒、60°C 31秒のサイクルを40サイクル行った。PCRを行

った後、GAPDHで補正し、腫瘍/正常比を算出した。腫瘍/正常比が ≥ 1.5 であるとき増幅ありと定義した。

4.3. 免疫組織化学染色

ECT2、EIF5A2、PIK3CA、TNFSF10の増幅の程度が、タンパク発現とどの程度相関しているのか、PCRでの腫瘍/正常比と免疫組織化学染色でのスコアを比較検討した。用いた症例は、全ての遺伝子において腫瘍/正常比が < 1.0 だった症例20例とそれぞれの遺伝子で ≥ 1.5 だった症例(ECT2 : 11例、EIF5A2 : 9例、PIK3CA : 13例、TNFSF10 : 12例)である。

また、ECT2の発現による予後解析に使用した症例は、筑波大学附属病院で2000~2005年までに行われた浸潤性肺腺癌症例66例と、1996年~2007年までに行われた小型肺腺癌症例51例を使用した。(表9、表10、p.78、p.79) これらの症例についても、全て術前に書面における包括同意を得ている。

10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、3 μ mの切片を作製した。キシレン、アルコールにて脱パラフィン、脱キシレン後、再水和し、1 x tris-EDTA; TE buffer (10mM tris-HCl pH 8, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid)を用いて105°C、15分の条件で抗原の賦活化を行った。内因性のペルオキシダーゼのブロックのため、Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (Dako, Copenhagen, Denmark)を室温で5分間反応させたのち、ECT2 (1:200, catalog no. 07-1364, MILLIPORE)、EIF5A2 (1:100, catalog no.

HPA029090, SIGMA)、PIK3CA (1:400, C73F8, Cell Signaling Technology)、TNFSF10 (1:50, catalog no. sc-6079, Santa Cruz)を加え、室温で30分間反応させた。Ki-67は、10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、3 μ mの切片を作製後、キシレン、アルコールにて脱パラフィン、脱キシレン後、再水和し、10 mM citrate buffer (pH 6.0) を用いて、121°Cで10分間賦活化を行った。その後、内因性のペルオキシダーゼのブロックのため、Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (Dako, Copenhagen, Denmark)を室温で5分間反応させたのち、Ki-67 (1:100, MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark)を加え、室温で30分間反応させた。使用した一次抗体について、その抗体名、クローン名、販売メーカー、抗原賦活化方法、および希釈倍率を表11 (p.80) に示す。

二次抗体として、ECT2、EIF5A2、PIK3CA、Ki-67については、ポリマー法による増感作用を利用したEnvision+Dual Link System-HRP (Dako)を室温で30分反応させた。TNFSF10については、同じくポリマー法による増感作用を利用したHistofine Simple Stain MAX-PO(G) (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)を室温で30分反応させた。その後可視化のために、DAB+Liquid System (Dako)を室温で5分間反応させた。純水で洗浄したのち、ヘマトキシリンによる核染色を行い、封入した。これらの免疫組織化学は、histostainer (Nichirei Biosciences)によって施行した。

EIF5A2,PIK3CA,TNFSF10の評価は、それぞれ核膜か細胞膜か細胞質に陽性の染色領域 (%) x 染色強度(0 ; 全く染まっていない、1+ ; weak、2+ ; 明らかに正常気管支上皮よりも

強く染色される)で評価した。陰性コントロールは、EIF5A2は成熟リンパ球、PIK3CAは正常気管支上皮細胞、TNFSF10は肺胞上皮細胞とした。染色領域の割合と強度をかけた値は0-200にスコア化される⁽³²⁻³⁴⁾。

ECT2の評価は、伊豫田らの方法を参考にし、最も核が染色されている領域 (hot spot) における腫瘍細胞1000個あたりの陽性細胞数を算出し評価した⁽³⁵⁾。陰性コントロールは肺胞上皮細胞とした。ECT2のスコアは陽性細胞を腫瘍細胞1000個で除した割合で表した。

それぞれの抗体の染色性を図6 (p.56) に示す。

Ki-67の評価方法は、ECT2と同じく、最も核が染色されている領域 (hot spot) における腫瘍細胞1000個あたりの陽性細胞数を算出し評価した (labeling index)。Mitotic indexの評価方法は、高倍率視野(400倍)で、10視野中の核分裂細胞数を計測し、値を算出した。

4.4. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

ECT2においてQuantitative Real-Time genomic PCRで高増幅が認められ、免疫組織化学染色においても高発現が認められた3例について、FISHを用いてその増幅を検証した。用いたプローブは、ECT2(TexRed)/CEN3q(FITC)カクテルプローブで、GSP研究所(神奈川)に作製を依頼した。プローブの配置設計図を図7 (p.57) に示す。

10%ホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックより、5 μ mに薄切し、脱パラフィン、脱キシレン後、pretreatment solution に98 °Cで30分浸漬し、その後 protease solution で

37 °Cで10分間反応させた。70、85、100%アルコールで脱水後、50°Cのホットプレート上でprobeを10μL添加し、ThermoBrite™ (Abbott Molecular, IL, USA) を用いて75 °Cで5分間 co-denature させた。その後37 °Cで72時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後は、DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)を10μL添加し、蛍光顕微鏡(BZ-9000, KEYENCE)を用いて観察した。蛍光顕微鏡のフィルターは、green (FITC)、red (TexRed)、blue (DAPI)を使用した。FISHのシグナルは、重積していない核を100個計測し、その合計を求め、ECT2/CEN3q比を算出した。増幅は、ECT2/CEN3q比が ≥ 2.0 であるときを増幅とした⁽¹⁵⁾。

4.5. 10K-SNP array

国立がんセンター病院で1993~2000年までに切除されたType A、B 14例とType C、D 50例を用いて10K-SNP array解析を行った。使用した症例の内訳を表12に示す。(p.81)

GeneChip Human Mapping 10K-SNP arrayを用いて、ECT2の遺伝子増幅について検討した。腫瘍細胞よりDNAを抽出後、Whole genome amplificationを行い、DNA量を20μgまで増幅させた。その後、DNAを断片化し、蛍光色素で標識した後GeneChip Human Mapping 10K-SNP arrayにハイブリダイズさせた。Copy Number Analyzer for Affymetrix GeneChip Mapping Array (CNAG) softwareでシグナルの読み取りを行い、解析を行った。増幅の基準は、3コピー以上を増幅と定義した。

4.6. cDNA microarray

国立がんセンター病院で1993～2000年までに切除されたpStage I期の早期浸潤性肺腺癌144例を用いてECT2の発現と予後との関連を検討した。(表13、p.82) ECT2に対するプローブとして、GGRNAデータベース上でECT2遺伝子上に配列がHitした234992_x_at ECT2 (ORF内)と219787_s_at ECT2 (3' UTR上)のプローブセットを用いた⁽³⁶⁾。(表14、p.83) また、この2つのプローブセットはそれぞれECT2遺伝子の全てのvariants (1-3)を認識している。ECT2のvariantsに関して表15 (p.84)、ECT2タンパクの構造について図8(A)、(B) (p.58)に示す⁽³⁷⁾。発現解析はAffymetrix U133 Plus 2.0 arrayを用いて行った。

4.7. 相関分析

Quantitative Real-Time genomic PCRの腫瘍/正常比と免疫組織化学染色でのスコアとの相関をピアソンの積率相関検定を用いて検討した。また、ECT2とKi-67 labeling index、mitotic indexとの相関についても同様に、ピアソンの積率相関検定を用いて検討した。

4.8. 統計解析

hierarchical clustering analysis は、Impressionist (Gene Data, Basel, Switzerland)とGeneMaths (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) software programを用いて行

った。野口分類に相関する遺伝子群の検出のために、対数変換データに対するWelchのt検定（非等分散）を行った。また、網羅的に測定されるオミクスデータでは、測定に関する系統的なノイズや全体的なベースラインの上昇・下降といった現象が存在する。アレイ同士の比較として、サンプルサイズの補正および補正に伴う検定法が提案されている。ひとつのアプローチとしてZ 検定がある⁽³⁸⁾。Z 検定は各検体の発現データをZ値に変換することで、アレイ全体の発現分布を平均0、標準偏差 1 の標準正規分布に変換し、2 群のSN比の検定を行う手法であり、主にマイクロアレイの解析で用いられている。よって、標準化データ（Z変換）に対するZ 検定でも評価を行った。また、発現差検定は多重検定であるため、擬陽性率のコントロールが必要となる。今回はFWER: family wise error rate (Bonferroni 法)およびFDR: False discovery rate (BH法)で擬陽性率の推定を行った。さらに遺伝子レベルでの差異の検出に加え、染色体の一定の領域レベルでの発現増幅・欠損を検討した。方法は各染色体領域に存在する遺伝子のp値をFisher's C で統合し、カイニ乗検定により有意性を検討した。

ECT2の免疫組織化学染色における発現解析での統計解析は、SPSS 11.5J software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行った。running log-rank検定を用いてECT2の発現における高発現群、低発現群の2群におけるp値が最小となるような基準を検討した。生存分析はKaplan–Meier法を用いて行い、予後因子はカイニ乗検定による単変量解析によって同定した。統計的有意差は $p < 0.05$ に設定した。国立がん研究センター病院

での10k-SNP arrayのデータは、Fisher's exact test を用いて有意差検定を行った。また、cDNA microarrayのデータは、予後との関連はJMP software (version 5.1; SAS institute, Inc.)を用いて、多変量解析を行った。

5. 結果

5.1. Array-CGHにおける遺伝子増幅領域の検出

野口分類の非浸潤癌 (Type A、B)と初期浸潤癌 (Type D、E)における遺伝子増幅・欠失をarray上のハイブリダイズしたプローブのシグナル発現差によって比較検討した。2群間の発現差を見ることで、遺伝子増幅・欠失状態を確認し、初期の異常を検出した。

Welchのt検定結果を表16 (p.85) に示す。t値が大きいほど2群間の差が大きく、正の場合はType A、B群で発現が高く、負の場合はType D、E群で発現が高いことを示す。野口分類のType A、BとType D、Eを比較し、有意に発現差を示す遺伝子領域はBACクローンに用いた786の既知の癌関連遺伝子中33領域に認められた。さらに、33領域の中でも22領域は3qに集中しており、同部位に広範囲の増幅が確認された。

Z検定の結果を表17 (p.86) に示す。Z値が大きいほど2群間の差が大きく、正の場合はType A、B群で発現が高く、負の場合はType D、E群で発現が高いことを示す。FWER・FDR それぞれにおける1%・5%基準を超える発現差を有する遺伝子数を表18 (p.87) に示す。解析した786遺伝子中48遺伝子が野口分類のType A、BおよびType D、Eで大きな発現差を有していることが示された。この結果より、個々の遺伝子座位の増幅および欠損に加え、各遺伝子座位が位置する染色体領域単位で発現の増幅・欠失を検討した。Z検定における染色体領域単位での発現差解析の結果を表19 (p.88) に示す。また、FWER・FDR それぞれにおける1%・5%基準を超える発現差を有する染色体領域数を表20 (p.89) に示

す。その結果、有意な増幅を示す染色体領域の多くは3qであった。3qを構成する遺伝子の野口分類Type A、BおよびType D、Eの発現差解析結果を表21 (p.90) に示す。FWER・FDR それぞれにおける1%・5%基準を超える発現差を有する遺伝子数を表22 (p.91) に示す。それに対応するヒートマップを図9 (p.59) に示す。Z検定を用いた検討でも、野口分類のType A、Bに比べ、Type D、Eの検体において、3qの広範囲の増幅が確認された。

t検定、Z検定ともに、3qの中でも最も多く有意に増幅していた領域は、3q26領域であった。3q26領域において、ECT2、EIF5A2、EVI1、PIK3CA、TNFSF10、SKIL、TERCの7遺伝子がt検定、Z検定に共通して含まれていた。

5.2. 初期肺腺癌におけるQuantitative Real-Time genomic PCRの結果とArray-CGHの結果の再現性について

ECT2、EIF5A2、EVI1、PIK3CA、TNFSF10、SKIL、MUC4の7遺伝子について、Type A、B 15例(うちArray-CGHに使用した6例含む)、Type D、E 17例(うちArray-CGHに使用した9例含む)に対してQuantitative Real-Time genomic PCRを行い、Array-CGHの結果を検証するとともに増幅の程度を検討した。これにより、今後検討する遺伝子の候補をさらに限定することを目的とした。7遺伝子すべてにおいて、初期浸潤癌であるType D、Eでの増幅を認めた。しかしながら、EVI1、SKIL、MUC4においては、非浸潤癌であるType A、Bにおいても数例増幅症例を認めた。その一方で、ECT2、EIF5A2、PIK3CA、TNFSF10で

は、Type A、Bでは増幅は認められなかった。(図10、p.60) 後者の4遺伝子に関しては、Array-CGHと同様の結果を得られたので、さらに解析を進めることとした。

5.3. 進行肺癌を対象としたQuantitative Real-Time genomic PCR

初期浸潤癌であるType D、Eで増幅が認められ、非浸潤癌であるType A、Bにおいて増幅が認められなかったECT2、EIF5A2、PIK3CA、TNFSF10において、非小細胞癌、非扁平上皮癌に対して、種々の遺伝子の増幅がどの程度あるのか検証するために、69例の進行肺癌(浸潤性肺腺癌51例、大細胞癌6例、多形癌12例)を追加してQuantitative Real-Time genomic PCRを行った。その結果、ECT2では11例(11%)、EIF5A2では9例(9%)、PIK3CAでは13例(13%)、TNFSF10では12例(12%)それぞれ増幅症例が認められた。(図11、p.61)

5.4. Quantitative Real-Time genomic PCRでの腫瘍/正常比と免疫組織化学染色でのスコアとの相関の検証

それぞれの遺伝子がゲノム増幅とタンパク発現の間にどのような関連があるのか、PCRでの腫瘍/正常比と免疫組織化学染色でのスコアを比較検討したところ、4遺伝子ともにある程度の相関傾向を示していた。相関係数は、ECT2では $r = 0.40$ 、EIF5A2では $r = 0.18$ 、PIK3CAでは $r = 0.24$ 、TNFSF10では $r = 0.23$ で、ECT2が4遺伝子中最もPCRでの腫瘍/正常比と免疫組織化学染色でのスコアは相関していた。(図12、p.62) 増幅と発現が最も相関

していたECT2についてさらに解析を行うこととした。

5.5. FISHを用いたECT2高増幅、高発現症例の増幅の検証

FISHを行い、ECT2の遺伝子増幅を検証した。症例Aでは、 $ECT2:891/CEN3q:336 = 2.65$ 、症例Bでは、 $ECT2:611/CEN3q:433 = 1.41$ 、症例Cでは、 $ECT2:530/CEN3q:261 = 2.03$ であった。(図13、p.63) 3例中2例では、ECT2/CEN3q比が2以上であり、増幅が認められた。また、症例Bにおいても、ECT2のシグナルがCEN3qのシグナルに比して増えており、polysomyの状態であることを確認した。これにより、Quantitative Real-time genomic PCRで得られたECT2の増幅が真実である事が証明された。

5.6. 免疫組織化学染色を用いたECT2の発現とKi-67 labeling index、mitotic indexとの関連

66例の浸潤性肺腺癌を用いてECT2の発現とKi-67の labeling Index、mitotic indexとの関連を検討した。ECT2とKi-67は同様の染色態度を示した。(図14、p.64) ECT2の染色スコアとKi-67 labeling Indexの相関を検討すると、 $r = 0.76$ と強い相関を示した。(図15 (A)、p.65) また、mitotic indexに関しても同様に相関を検討すると、 $r = 0.87$ と強い相関を示した。(図15 (B)、p.65)

5.7. ECT2の発現における予後解析

まず浸潤性肺腺癌66例を用いた検討を行った。running log-rank検定を用いて、ECT2の発現における高発現群、低発現群の2群における p 値が最小となるような基準を検討し、ECT2のIHCスコアが140をカットオフ値とすると、ECT2高発現群は25例、ECT2低発現群は41例に分類された。この2群において、Kaplan–Meier法を用いて生存分析を行ったところ、5年間の全生存率 (OS: Overall survival)、無病生存期間 (DFS: Disease free survival) はそれぞれ $p = 0.0096$ 、 $p = 0.019$ でともに有意差を認めた。(図16(A)、図16(B)、p.66) さらに、ECT2の高発現群と低発現群において、単変量解析を行ったところ、リンパ節転移 (N因子、 $p = 0.003$)、病理病期 (pStage、 $p = 0.022$)、血管侵襲(V、 $p = 0.004$)、組織亜型 (lepidic/solid/acinar/papillary、 $p = 0.0001$)において、有意差を認めた。(表23 (A)、p.92) また、多変量解析では、また、多変量解析では、腫瘍径($\leq 3\text{cm}$ vs $> 3\text{cm}$ 、 $p = 0.037$)と組織亜型(lepidic/solid/acinar/papillary、 $p = 0.035$)が独立した予後因子であることが示された。(表23 (B)、p.92)

次に小型肺腺癌51例を用いた検討を行った。running log-rank検定を用いて、ECT2の発現で高発現群、低発現群の2群における p 値が最小となるような基準を検討し、ECT2のIHCスコアが50をカットオフ値とすると、ECT2高発現群は20例、ECT2低発現群は31例に分類された。Type A、Bの症例は1例もECT2高発現群に分類されなかった。Type D、Eの症例は2例のみECT2低発現群に分類された。(表24 (A)、p.93) この2群において、Kaplan–

Meier法を用いて生存分析を行ったところ、5年間の無病生存期間 (DFS: Disease free survival)は、 $p = 0.0002$ で有意差を認めた。(図17、p.67) さらに、ECT2の高発現群と低発現群において、単変量解析を行ったところ、遠隔転移 (M因子) を除く全ての因子において、有意差を認めた。(表24 (B)、p.93) また、多変量解析では、原発巣の大きさと進展度を表すT因子のみ独立した予後因子であることが示された。(表24 (C)、p.93)

5.8. 国立がんセンター病院の症例における10K-SNP arrayでのECT2の増幅

Array-CGHとQuantitative Real-time genomic PCRの結果を検証するために、小型肺腺癌64例を用いて、GeneChip Human Mapping 10K-SNP arrayを行い、ECT2の遺伝子増幅について検討した。64例中13例 (20%) において増幅が認められた。増幅が認められたのは、すべて初期浸潤癌 (Type C、D)であり、非浸潤癌 (Type A、B)の症例では1例も増幅症例は認められなかった。(表25(A)、p.94) この結果によって、ECT2が非浸潤癌 (Type A、B)で増幅を認めず、初期浸潤癌 (Type D、E)で増幅を認めたArray-CGHとQuantitative Real-time genomic PCRの結果が検証された。

5.9. 国立がんセンター病院の症例における cDNA microarrayを用いたECT2の発現における予後解析

免疫染色を用いたECT2の予後解析の結果を検証するために、pStage I期の早期浸潤性肺

腺癌144例を用いてECT2の発現解析を行った。まず、高発現のカットオフ値について、 p 値が最小となるような基準の検討を行った。234992_x_at ECT2では、22例が高発現群であるとき、219787_s_at ECT2では、24例が高発現群であるときに全生存率、無再発生存期間(RFS: Replace free survival)ともに最小の p 値となった。ECT2高発現群は、234992_x_at ECT2、219787_s_at ECT2ともに有意に予後に関連していた。(図18、p.68)

また、多変量解析を行うと、ECT2の発現は、234992_x_at ECT2でのみ独立した予後因子であることが示唆された。(表25(B)、(C)、p.94)

6. 考察

6.1. Array-CGHを使用した小型肺腺癌における遺伝子増幅の検出

肺腺癌における遺伝子異常の多数症例解析はほとんどが進行癌を材料にしておこなわれている。例えば、非小細胞肺癌においてPIK3CA (3q26領域)については、遺伝子異常が予後に関連しているという報告があるが、初期浸潤性肺腺癌に特化した検討はあまりされていない⁽¹⁰⁾。3p領域ではすでに小細胞肺癌で欠失が認められ、肺腺癌においてもWhole-genome/exome sequence analysisによって、新たなmutationが発見されているが3qについての解析は少ない⁽¹²⁾。

我々は、Cancer Array 800を使用して、肺腺癌における発生増悪のメカニズムを解明するために、非浸潤癌 (Type A、B)と初期浸潤癌 (Type D、E)でのゲノムのコピー数異常を比較し、Type A、Bに比べてType D、Eでは3qに有意に増幅している領域を認めた。3qの中で最も増幅を認めた領域は3q26領域であった。今回研究の対象とした3q26領域に含まれているPhosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (PIK3CA)⁽³⁹⁾、Ecotropic viral integration site 1 (EVI1)⁽⁴⁰⁾、Eukaryotic translation initiation factor 5A2 (EIF5A2)⁽⁴¹⁾、SKI-like oncogene (SKIL)⁽⁴²⁾、TNFSF10 tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10)⁽⁴³⁾、and Epithelial cell transforming sequence 2 (ECT2)⁽⁴⁴⁾については、肺癌との関連が報告されているが、これらはいずれも進行癌における検討である。今回検討した症例は発生初期の癌であり、Array-CGHの結果からは、3q

領域の増幅は肺癌において、がんの浸潤に関与している可能性を示唆している。

6.2. Quantitative real-time genomic PCRを用いた候補遺伝子の選択と遺伝子増幅と発現の相関における検討

Type A、BとType D、Eの増幅を比較しても2群間に有意差は認められなかった。この理由として、肺腺癌における遺伝子増幅の差はあっても少ないことが考えられる。

Type A、Bで増幅が認められずType D、Eでのみ増幅が認められたECT2、EIF5A2、PIK3CA、TNFSF10において、さらに進行肺癌症例を追加して増幅の程度を検証した結果、4遺伝子すべてにおよそ10%程度の増幅症例を認めた。3qにおける遺伝子増幅については、これまでにも子宮頸癌、肝臓癌、悪性黒色腫、肺扁平上皮癌などで報告されている⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾。今回の検討においては、3q26領域について肺腺癌の発生初期においても遺伝子増幅が起こっていることが示唆された。

また、Quantitative Real-Time genomic PCRによって得られた各遺伝子の増幅の程度が、タンパク発現とどの程度相関しているのか免疫組織化学染色を用いて検討したところ、ECT2が4遺伝子中最も相関した遺伝子であった。さらに、ECT2高増幅、高発現症例3例において、FISHを行ったところ、3例ともECT2シグナルの増幅を認めた。3例のみではあるが、遺伝子増幅と発現が相関しており、ECT2に関しては、ECT2の発現が増幅によるものであることが示唆された。ただし、ECT2の増幅があまり認められなくても、高発現だった

症例も数例認められ、ECT2の発現亢進には遺伝子増幅以外の機序も存在することが示唆された。

ECT2遺伝子は、グアニンヌクレオチド交換因子をコードし、GTP加水分解酵素であるRhoAを活性化し、細胞分裂を制御しているがん原遺伝子である⁽⁴⁹⁾。これまでに肺^(44,50)をはじめ、脳^(49,51)、膀胱⁽⁵²⁾、食道⁽⁴⁴⁾、膵臓⁽⁵³⁾、卵巣⁽⁵⁴⁾など、様々な臓器での高発現が報告されている。特に肺癌においては、予後との関連がNSCLC症例を用いて検討されている⁽⁴²⁾。さらに、ECT2の上流には、EGFRをはじめ、MET、HER2、RASが存在しており、これらの遺伝子異常によっても、増殖シグナル経路が活性化され、下流にあるECT2が二次的に発現上昇した可能性が考えられる⁽⁵⁵⁾。

6.3. 浸潤性肺腺癌におけるECT2の発現と予後との関連と他院検体におけるECT2の増幅と発現解析結果

ECT2(Epithelial cell transforming sequence 2)は3q26.1-q26.2に存在しており、その発現は、DNA合成の開始とともに上昇し、G2/M期まで高発現を保っている。細胞分裂においては、分裂後期から分裂終期にかけて、細胞膜の赤道面で局所的にECT2によって活性化されたRhoAによるアクチン繊維とミオシン繊維からなる収縮環の形成およびその収縮により、分裂溝の侵入が引き起こされる。その後、分裂溝は完全にくびれて2つの娘細胞が生まれる⁽⁵⁶⁾。つまりECT2の発現亢進は、S期からG2/M期において細胞分裂能を高める

とともに、異常分裂も促進してしまっている可能性がある。ECT2の発現が G2/M 期まで高い状態を保っていることで、ECT2と Ki-67 labeling index、mitotic index が関連したと考えられる。また、Ki-67 labeling index や mitotic index はがんにおいて頻繁に用いられる予後予測マーカーであるが、これら2つの指標の高スコア原因として、ECT2の過剰発現が示唆された。

ECT2の増幅の検討について、筑波大学附属病院の症例を用いたQuantitative Real-time genomic PCRで増幅が認められたのは、初期浸潤癌であるType D、Eにおいて6%(17例中1例)であった。検証実験となる国立がんセンター病院での症例では、初期浸潤癌であるType C、Dを用いて10k-SNP arrayで検討したところ、増幅が認められたのは、26%(50例中13例)であった。この結果はQuantitative Real-time genomic PCRの結果を支持するものと考えられる。10k-SNP arrayでの検討結果で、増幅が認められた症例が多かったのは、SNP arrayにおいては1遺伝子に対して複数のプローブが対応しているため、検出感度が高いことが一因である可能性がある。また、今回使用した野口分類は形態学的に分類されたものだが、肺癌の組織型を分子生物学的に分類する方法も存在する。その一つが、谷田部らが提唱したTerminal respiratory unit (TRU)-type adenocarcinomaとnon-TRU-type adenocarcinomaという分類である⁽⁵⁷⁾。TRU-type adenocarcinomaとは、肺末梢の呼吸細気管支～肺胞に存在するII型肺胞上皮やクララ細胞を由来とする腺癌であり、BAC 成分、TTF-1 あるいはサーファクタントの発現のいずれかを有する肺腺癌である。Type Eの肺腺

癌はacinar (tubular) adenocarcinomaと診断されるものだが、その中でもTTF-1もしくは、サーファクタントが陰性の症例はnon-terminal respiratory unit (TRU)-type adenocarcinomaに分類される。しかしながら、多くのType A、B、C、DはTRU-type adenocarcinomaに分類される。さらに、一部のnon-TRU-type adenocarcinomaでは、HNF4aが陽性になるパターンを示す⁽⁵⁸⁾。以上の理由より、Type A、B、C、Dは分子生物学的にType Eとは異なる性質を持っているために、Quantitative real-time genomic PCRよりも10k-SNP arrayにて多くの増幅症例を検出した可能性が示唆される。

図16と図17と図18 (p.66-68)が示すように、2つの病院での症例において、全生存率、無病再発生存期間それぞれにおいて ECT2の高発現群と低発現群で予後に有意差を認めた。また、国立がんセンター病院の症例においては、ECT2の高発現は独立した予後因子の一つであることが示された。筑波大学附属病院の浸潤性肺腺癌、小型肺腺癌の症例では、多変量解析において ECT2の高発現が独立した予後因子にはならなかった。これは、症例数が国立がんセンター病院の症例数に比べて少なかったことが一因であると考えられる。しかしながら、単変量解析においては多くの有力な予後因子と相関し、生存解析でも有意な予後への寄与を認めたので、有力な予後因子の一つになり得るのではないかと考えられる。ECT2の機能に関しては、細胞分裂に関与するだけでなく、ECT2と同じく3q26領域存在している PKC δ と Par6 α 複合体を形成し、Rac1を活性化させ、さらに MAPK 経路が活性化することにより、細胞増殖や浸潤に関与していると報告がある⁽⁵⁵⁾。(図19、p.69) よっ

て、ECT2の発現が高くなれば、より腫瘍増殖へのシグナル経路が活性化され、予後不良となる可能性が考えられる。

6.4 本研究における今後の課題と展望

今回の研究で、肺腺癌の初期悪性化に関わるゲノム異常の候補として ECT2を明らかにしたが、ECT2に増幅が認められなくとも、高発現であった症例が存在していた。この現象を解明するにあたっては、ECT2の上流にある因子(EGFR、MET、HER2など)がすでに活性化されており、それによって ECT2の発現が二次的に上昇していないかを確認する必要がある。次に、肺腺癌の早期からの浸潤を引き起こす ECT2の異常発現の分子機構の解明が重要であると考えられる。ECT2は RhoA の活性化に関与するという報告以外にも、PKC α と Par6 α 複合体を形成し、Rac1を活性化させ、さらに MAPK 経路が活性化することにより、細胞増殖や浸潤に関与していると報告もある。siRNA を用いて ECT2の発現を抑制させ、ECT2の下流の因子についてその挙動を観察し、ECT2のシグナル経路を検討することで、ECT2がどのような働きをするのか、その一端が解明できるのではないかと考えられる。最後に、ECT2の高発現は、非常にシンプルで、かつ患者の予後を予測できるバイオマーカーとしての活用が期待され、ECT2をターゲットとした分子標的治療薬の開発も期待される。

7. 総括

腫瘍の発生増悪のメカニズムを解明し、診療へと応用するには、より早期の病変における遺伝子異常を解明することが必須である。本研究では初めに、小型肺腺癌の非浸潤癌と初期浸潤癌に対してArray-CGH解析を行い、浸潤癌で明らかに増幅のみられる遺伝子を探索、同定した。これら増幅の認められる遺伝子は3q領域に多く、特に3q26領域に多く含まれていた。次に、3q26領域で同定できた遺伝子に対して、Quantitative Real-Time genomic PCRを用いて多数例で検証を行い、3q26領域の遺伝子増幅の状態を検討した。さらに免疫組織化学染色を用いて、増幅と発現の相関を検討したところ、最も関連したのはECT2であった。また、ECT2高増幅、高発現症例に関しては、FISHにてその遺伝子増幅を確認した。さらに、浸潤性肺腺癌においてECT2の発現とKi-67 labeling index、mitotic index、予後との関連を検討し、さらに小型肺腺癌においても予後との関連を検証した。ECT2の発現とKi-67 labeling index、mitotic indexともに強い相関を示した。加えて予後解析では、2つの病院の症例を用いて検討を行い、どちらの症例においてもECT2の高発現群は予後不良であるとの結果を得た。また、国立がんセンター病院の症例を用いたcDNA microarrayの検討では、ECT2の発現亢進は独立した予後因子のひとつであることが示された。

本研究では、非浸潤癌と初期浸潤癌における染色体異常を網羅的に検出した。そこで検出されたECT2遺伝子のゲノムの増幅異常は、Array-CGHでも浸潤癌に対する免疫染色で

も、ともに組織型に有意差が認められたため、腫瘍発生時点にすでに起こっていることが示唆された。本研究の結果から、ECT2のゲノム増幅および発現亢進は肺腺癌の初期悪性化に関わる遺伝子異常で、さらには予後に関与するバイオマーカーでもあることを見いだした。

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、直接ご指導、ご鞭撻、ご助言をいただきました筑波大学医学医療系教授 野口雅之先生、筑波大学医学医療系准教授 南優子先生に深謝いたします。

Array-CGH解析のデータを提供していただきました富士フイルム株式会社 R&D統括本部長 ライフサイエンス研究所 石井靖幸先生に感謝いたします。免疫組織化学染色を用いたECT2の予後解析を行っていただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科 薄井真悟先生に感謝いたします。ECT2の10k-SNP array解析、cDNA microarray、ならびに予後解析データを提供していただきました国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 横田淳先生、岩川麗香先生、白石航也先生、国立がん研究センター中央病院 病理科 蔦幸治先生に感謝いたします。

最後に、診断病理研究室の先生方、大学院生の皆様、筑波大学附属病院病理部の皆様には公私にわたり、ご支援とご協力をいただいたことに感謝の意を表します。

参考文献

1. 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス.

<http://ganjoho.jp/public/statistics/pub/statistics01.html>

2. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, et al. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. World Health Organization Classification of Tumours 10. 2004.

3. T. Kosaka, Y. Yatabe, H. Endoh, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*, 2004;64:8919–8923.

4. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*, 1990;323:561–565.

5. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994;54:4855-4878.

6. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 2002;62:6997–7000.

7. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2012;18:4910-4918.

8. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, et al. Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clin Cancer Res*, 2013;19:2584-2591.

9. Marks JL, Gong Y, Chitale D, et al. Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2008;68:5524-5528.

10. Kawano O, Sasaki H, Okuda K, et al. PIK3CA gene amplification in Japanese non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2007;58:159-160.

11. Dobashi Y, Kimura M, Matsubara H, et al. Molecular alterations in AKT and its protein activation in human lung carcinomas. *Hum Pathol*, 2012;43:2229-2240.

12. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*, 2012;150:1107-1120.

13. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007;448:561–566.

14. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*, 2012;18:378-381.

15. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn Jr PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*, 2003;21:3798–3807.

16. Iwakawa R, Kohno T, Kato M, et al. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*, 2011;17:1481-1489.

17. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*, 2009;27:1667–1674.

18. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992;258:818–821.

19. Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 1998;20:207-211.

20. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997;20:399-407.

21. Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci*, 2004;95:559-563.

22. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, et al. Small adenocarcinoma of the lung – histologic characteristics and prognosis. *Cancer*, 1995;75:2844–2852.

23. Minami Y, Matsuno Y, Iijima T, et al. Prognostication of small-sized primary pulmonary adenocarcinomas by histopathological and karyometric analysis. *Lung Cancer*, 2005;48:339-348.

24. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 2011;6:244–285.

25. 佐藤泰樹、南優子、野口雅之 肺癌の新しい病理組織分類 医学のあゆみ 2012年 240巻13号:1041-1044.

26. Noguchi M. Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma—clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:15-21.
27. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C. International Union Against Cancer: TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. Wiley-Blackwell. 2009.
28. 日本肺癌学会/編 臨床・病理 肺癌取扱い規約改訂第7版 金原出版株式会社 2010年
29. Kato H, Ojima H, Kokubu A, et al. Genetically distinct and clinically relevant classification of hepatocellular carcinoma: putative therapeutic targets. *Gastroenterology*, 2007;133:1475-1486.
30. Tsutsumida H, Goto M, Kitajima S, et al. MUC4 expression correlates with poor prognosis in small-sized lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 2007;55:195-203.
31. Soh J, Okumura N, Gazdar AF et al. Oncogene Mutations, Copy Number Gains and Mutant Allele Specific Imbalance (MASI) Frequently Occur Together in Tumor Cells. *PLoS*

one, 2009;4:e7464.

32. He LR, Zhao HY, Li BK, et al. Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 2011;129:143-150.

33. Henken FE, Banerjee NS, Snijders PJ, et al. PIK3CA-mediated PI3-kinase signalling is essential for HPV-induced transformation in vitro. *Mol Cancer*, 2011;10:71.

34. Ouellet V, Le Page C, Madore J, et al. An apoptotic molecular network identified by microarray: on the TRAIL to new insights in epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 2007;110:297-308.

35. Iyoda M, Kasamatsu A, Ishigami T, et al. Epithelial cell transforming sequence 2 in human oral cancer. *PLoS One*, 2010;5:e14082.

36. 統合遺伝子検索GGRNA ver.2

<http://ggrna.dbcls.jp/>

37. NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1894>

38. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, et al. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn*, 2003;5:73-81.

39. A. Rácz, N. Brass, D. Heckel, et al. Expression analysis of genes at 3q26–q27 involved in frequent amplification in squamous cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*, 1999;35:641–646.

40. Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, et al. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*, 2003;9:4705-4713.

41. Jenkins ZA, Hååg PG, Johansson HE. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics*, 2001;71:101-109.

42. Pelosi G, Del Curto B, Trubia M, et al. 3q26 Amplification and polysomy of chromosome 3 in squamous cell lesions of the lung: a fluorescence in situ hybridization study. *Clin Cancer Res*, 2007;13:1995-2004.

43. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995;3:673-682.

44. Hirata D, Yamabuki T, Miki D, et al. Involvement of Epithelial Cell Transforming Sequence-2 Oncoantigen in Lung and Esophageal Cancer Progression. *Clin Cancer Res*, 2009;15:256–266.

45. Oscar Vazquez-Mena, Ingrid Medina-Martinez, Eligia Juárez-Torres et al. Amplified genes may be overexpressed, unchanged, or downregulated in cervical cancer cell lines. *PLoS One*, 2012;7:e32667.

46. Cai C, Rajaram M, Zhou X et al. Activation of multiple cancer pathways and tumor maintenance function of the 3q amplified oncogene FNDC3B. *Cell Cycle*, 2012;11:1773-1781.

47. Lake SL, Kalirai H, Dopierala J, et al. Comparison of formalin-fixed and snap-frozen samples analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification for prognostic testing in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012;53:2647-2652.

48. Brunelli M, Bria E, Nottesgar A et al. True 3q chromosomal amplification in squamous cell lung carcinoma by FISH and aCGH molecular analysis: impact on targeted drugs. *PLoS One*, 2012;7:e49689.

49. Sano M, Genkai N, Yajima N, et al. Expression level of ECT2 proto-oncogene correlates with prognosis in glioma patients. *Oncol Rep*, 2006;16:1093–1098.

50. Justilien V, Fields AP. Ect2 links the PKC δ -Par6 α complex to Rac1 activation and cellular transformation. *Oncogene*, 2009;28:3597-3607.

51. Salhia B, Tran NL, Chan A, et al. The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma. *Am J Pathol*, 2008;173:1828–1838.

52. Saito S, Liu XF, Kamijo K, et al. Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J Biol Chem*, 2004;279:7169–7179.

53. Zhang ML, Lu S, Zhou L, et al. Correlation between ECT2 gene expression and methylation change of ECT2 promoter region in pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008;7:533–538.

54. Saito S, Liu XF, Kamijo K, et al. Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J Biol Chem*, 2004;279:7169–7179.

55. Murray NR, Kalari KR, Fields AP. Protein kinase C α expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer. *J Cell Physiol*, 2011;226:879-887.

56. Su KC, Takaki T, Petronczki M. Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev Cell*, 2011;21:1104-1115.

57. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, et al. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2005;29:633-639.

58. Sugano M, Nagasaka T, Sasaki E, et al. HNF4 α as a marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*, 2013;37:211-218.

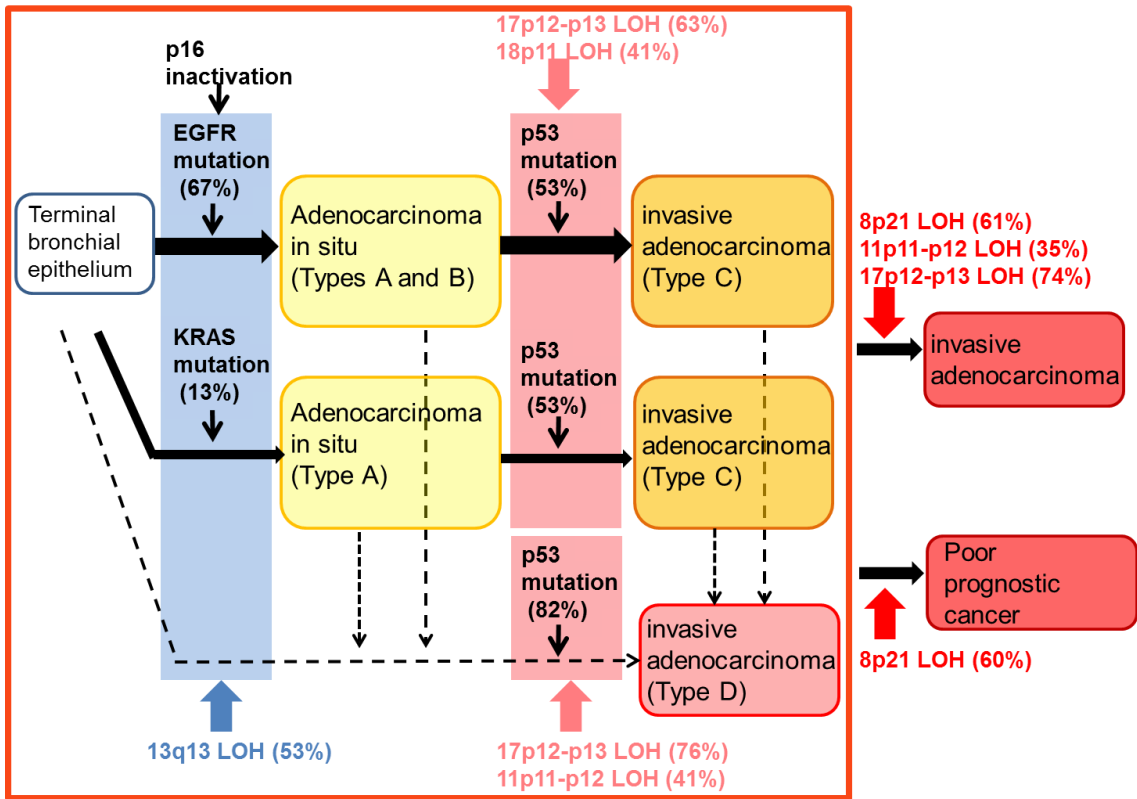


図1 肺腺癌における多段階発癌

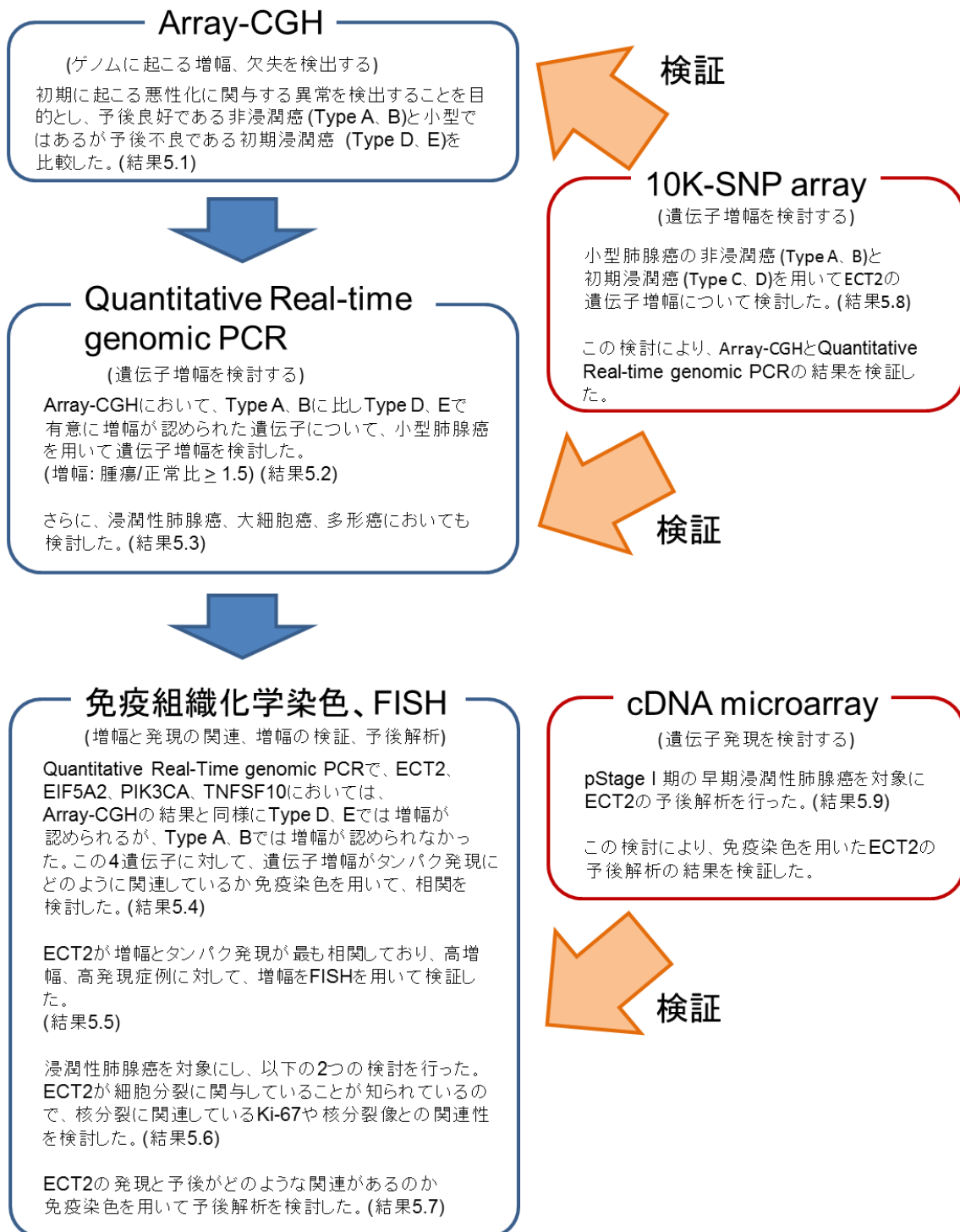
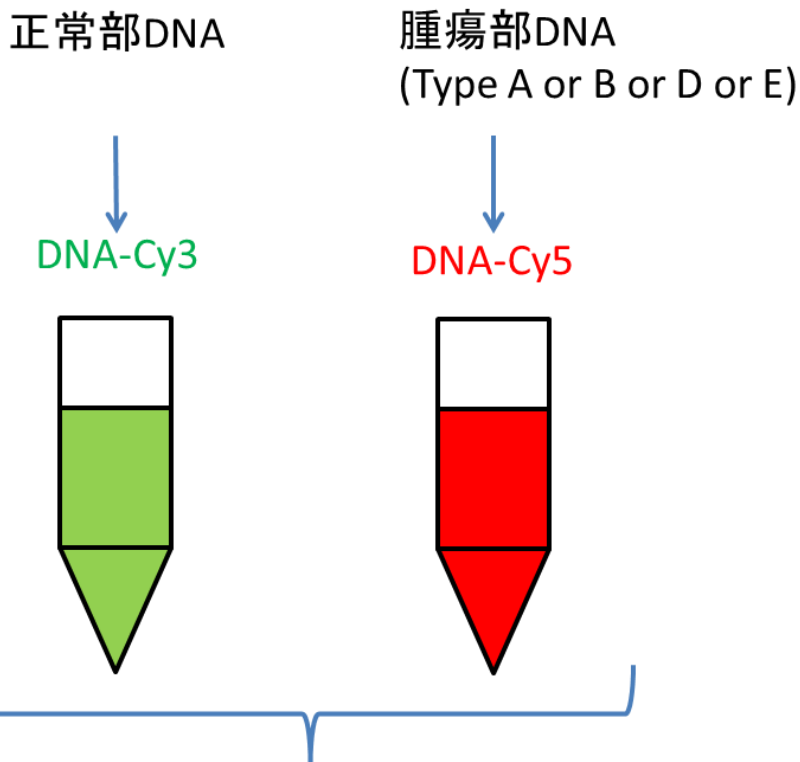
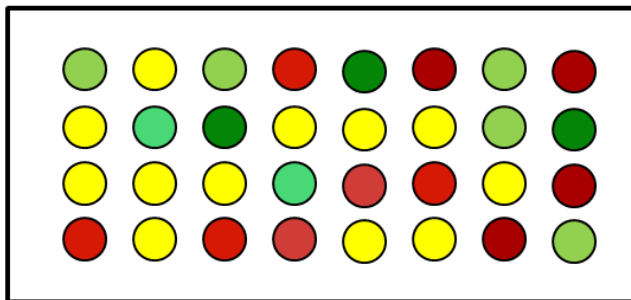


図2 本研究のデザイン



蛍光で標識したDNAをそれぞれ混ぜ合わせ、既知の癌関連遺伝子に対するBACクローンを標識したarray上で競合させ、ハイブリダイズさせる。腫瘍部の遺伝子が増幅していれば、より赤く、欠失していればより緑に見える。



GenePix Pro 5.0を用いてアレイを解析し、ハイブリダイズさせた蛍光の発現の程度を数値化する。
ここで得られたType A、B群とType D、E群の数値を比較し、有意に発現が高い遺伝子を検出した。

図3 Array-CGHの概略

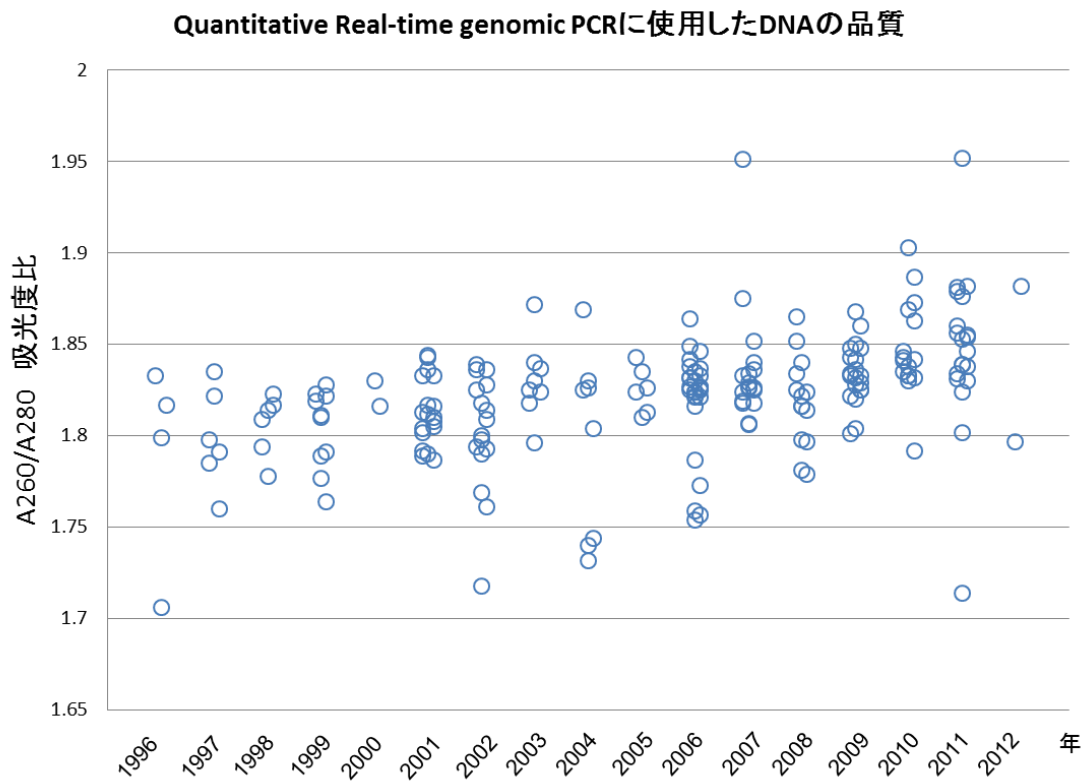


図4 Quantitative Real-time genomic PCRに使用したDNAの品質

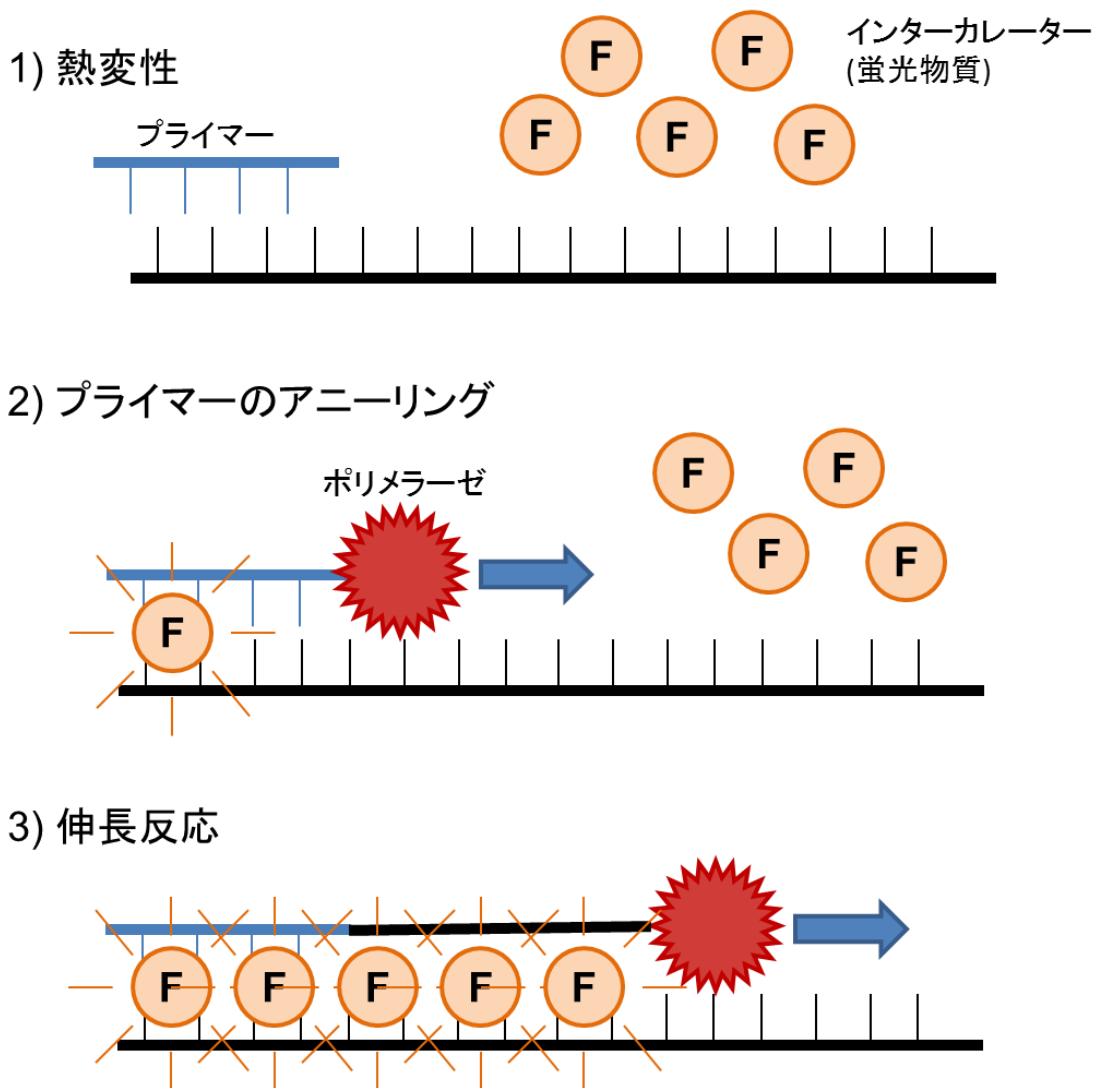


図 5 インターカレーター法によるQuantitative Real-time genomic PCRの原理
 二本鎖DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法である。
 ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖DNA にインターカレーターが結合すると、
 蛍光を発する。この3工程を繰り返し行い、蛍光強度を検出することでゲノムの増幅の程
 度を定量することができる。

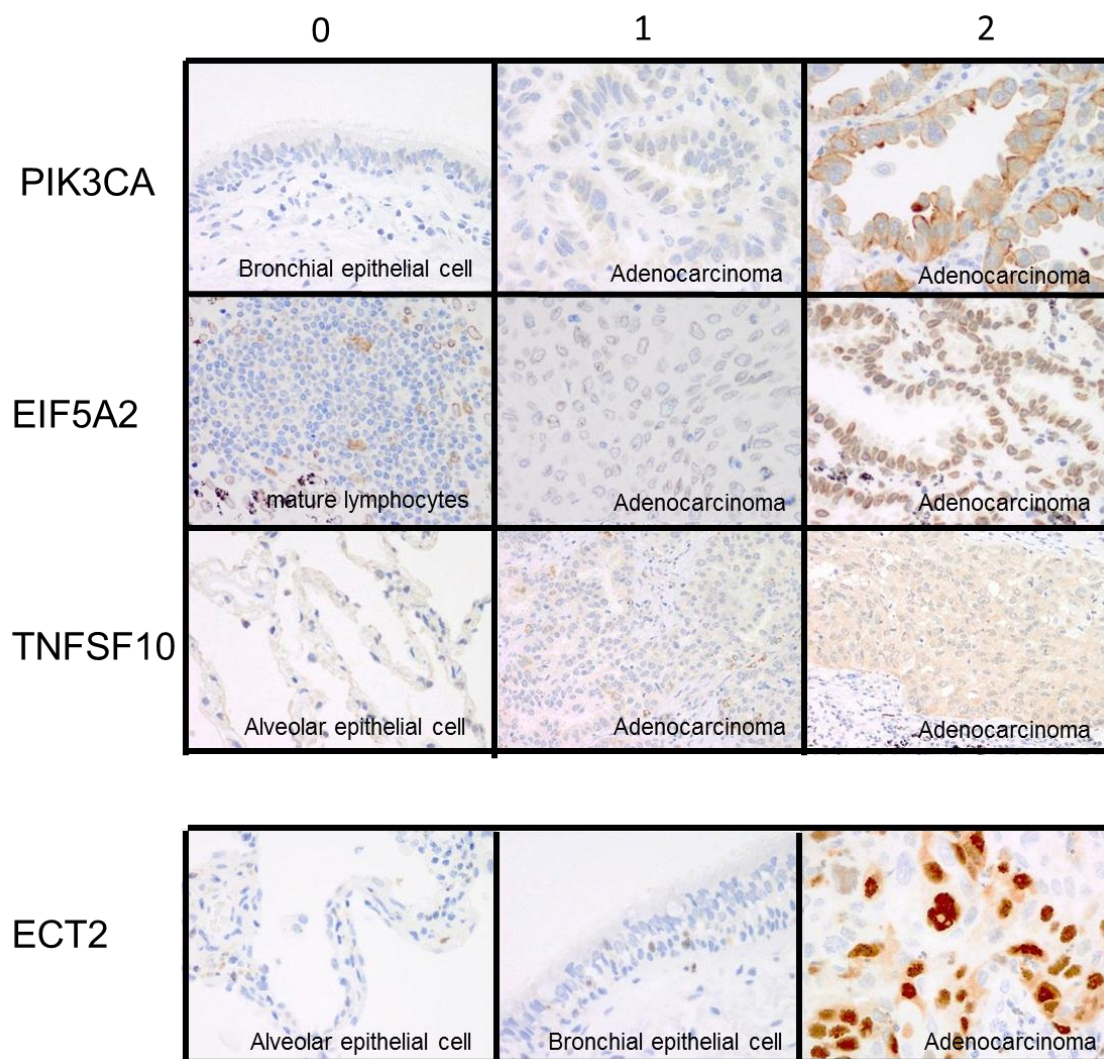


図6 PIK3CA, EIF5A2, TNFSF10, ECT2の染色性

EIF5A2,PIK3CA,TNFSF10の染色強度(0 ; 全く染まっていない、1+ ; weak、2+ ; 明らかに正常気管支上皮よりも強く染色される)を示す。陰性(内因性)コントロールは、EIF5A2は成熟リンパ球、PIK3CAは正常気管支上皮細胞、TNFSF10、ECT2は肺胞上皮細胞とした。

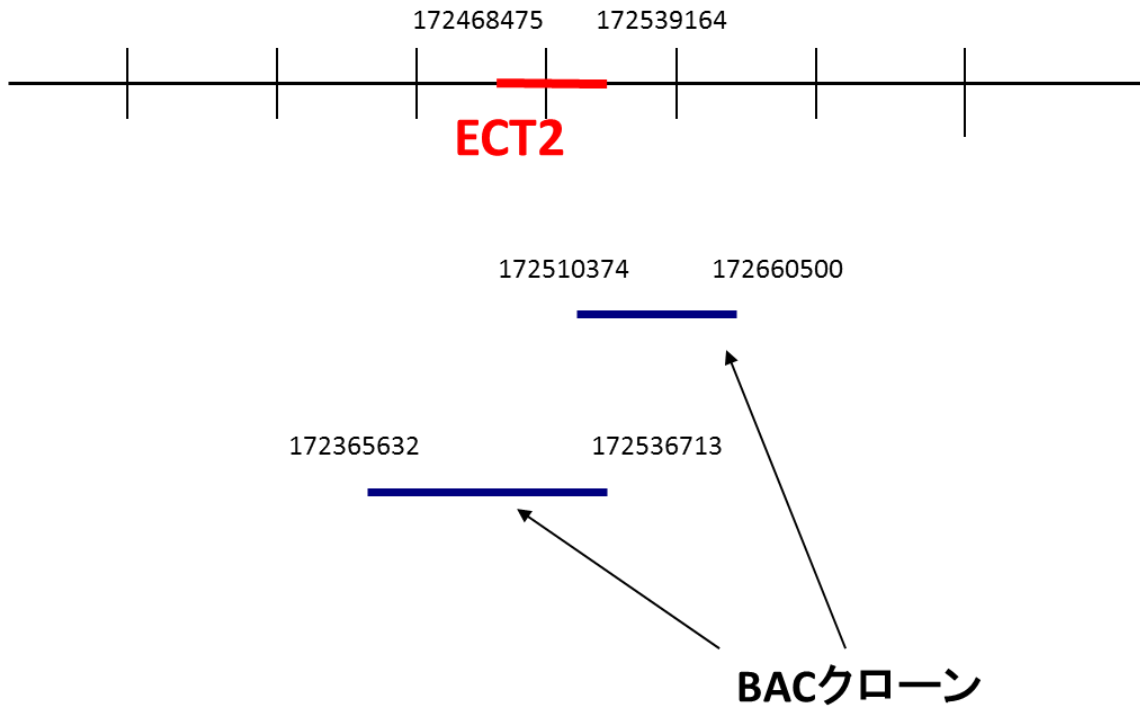
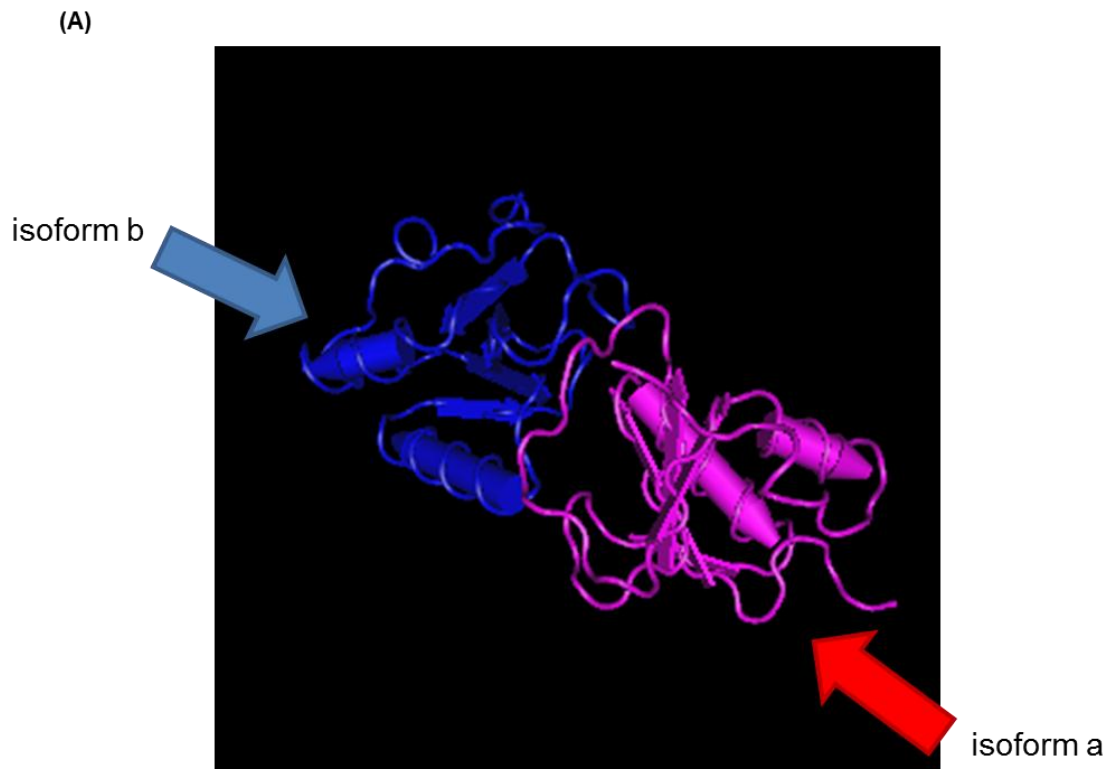


図7 FISHで使したプローブの詳細と結合部位

ECT2 FISH probeはGSP研究所(神奈川)にてECT2をカバーする2種類のBACクローンから受託作製した。



(B)

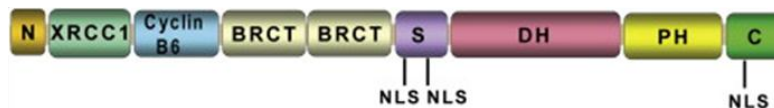


図8 ECT2のタンパク構造

(A) ECT2タンパクはisoform aとisoform bの二量体を構成している

(B) ECT2タンパクの模式図

N, Amino-terminal region; **XRCC1**, X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 domain; **Cyclin B6**, cyclin B6-like domain; **BRCT**, BRCA1 C-terminal domain; **S**, small central region; **NLS**, nuclear localization sequence; **DH**, Dbl-homology domain; **PH**, pleckstrin-homology domain; **C**, Carboxyl-terminal region.

ECT2がグアニンヌクレオチド交換因子をコードし、細胞分裂に関与している領域はDHである。

Isoform a と isoform b では、N末端領域が異なっている。

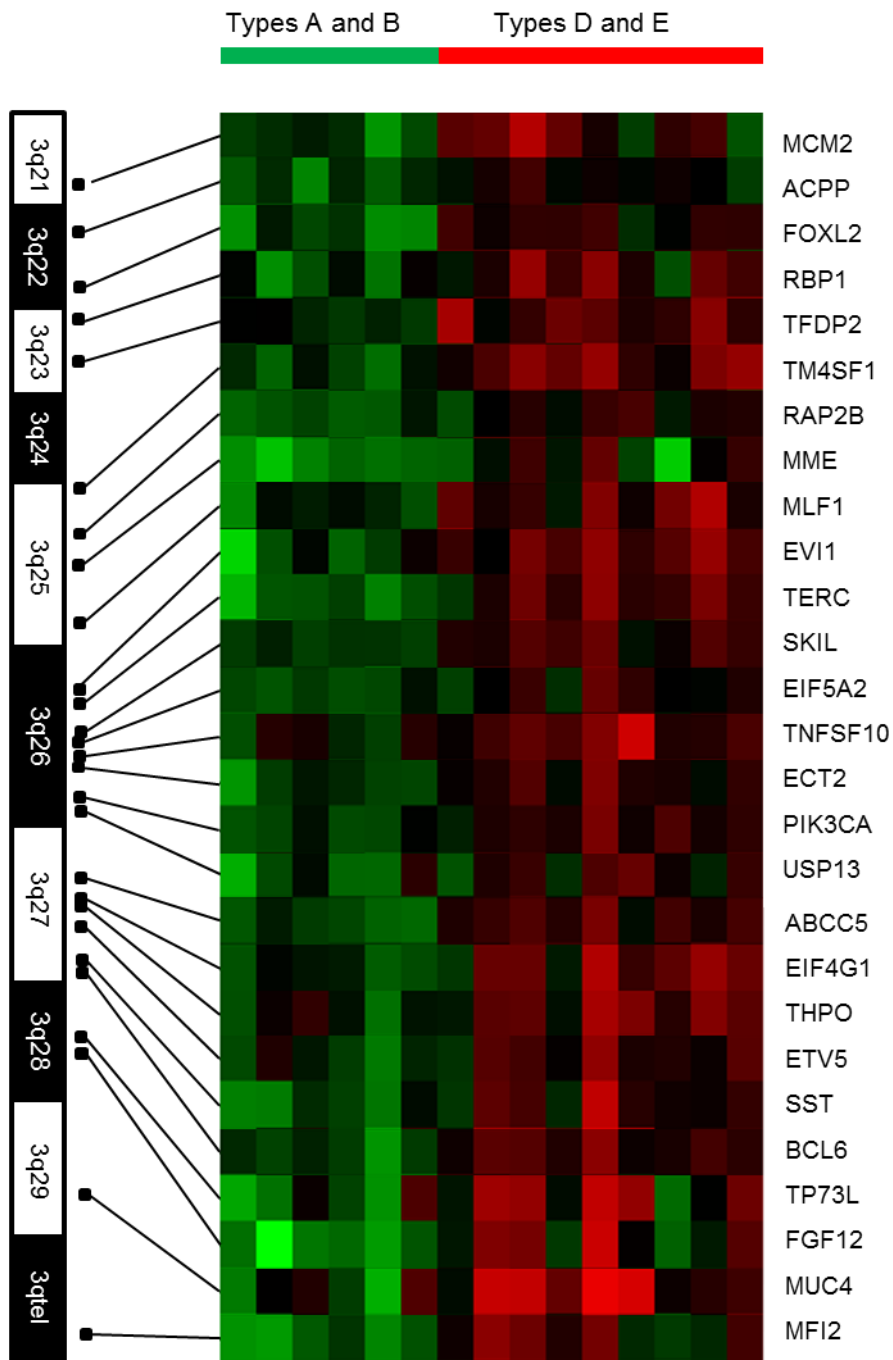


図9 Z検定における3番染色体長腕を構成する遺伝子の野口分類Type A、BおよびType D、Eの発現差解析結果に対応するヒートマップ。3q26に8遺伝子の増幅を認める。

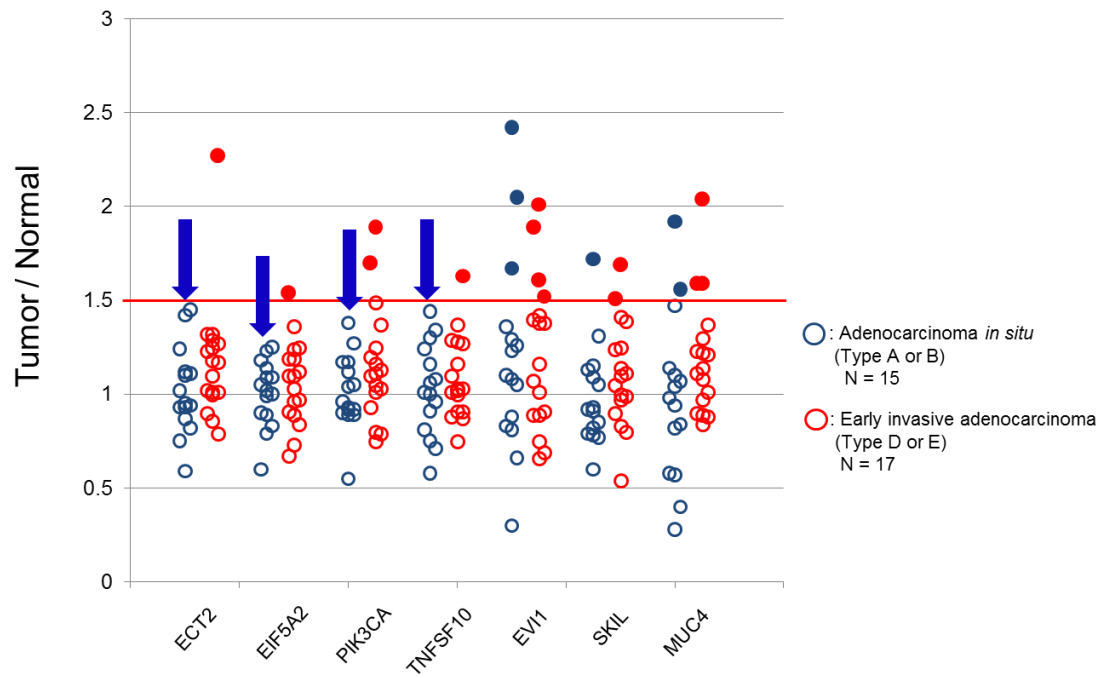


図10 Type A、B15例、Type D、E17例を対象に quantitative real-time genomic PCRを行った。全ての遺伝子において、Types D,Eで1.5以上(Tumor/Normal)の増幅を認めしたが、PIK3CA, ECT2, EIF5A2, TNFSF10ではTypes A, Bの増幅を認めなかった。

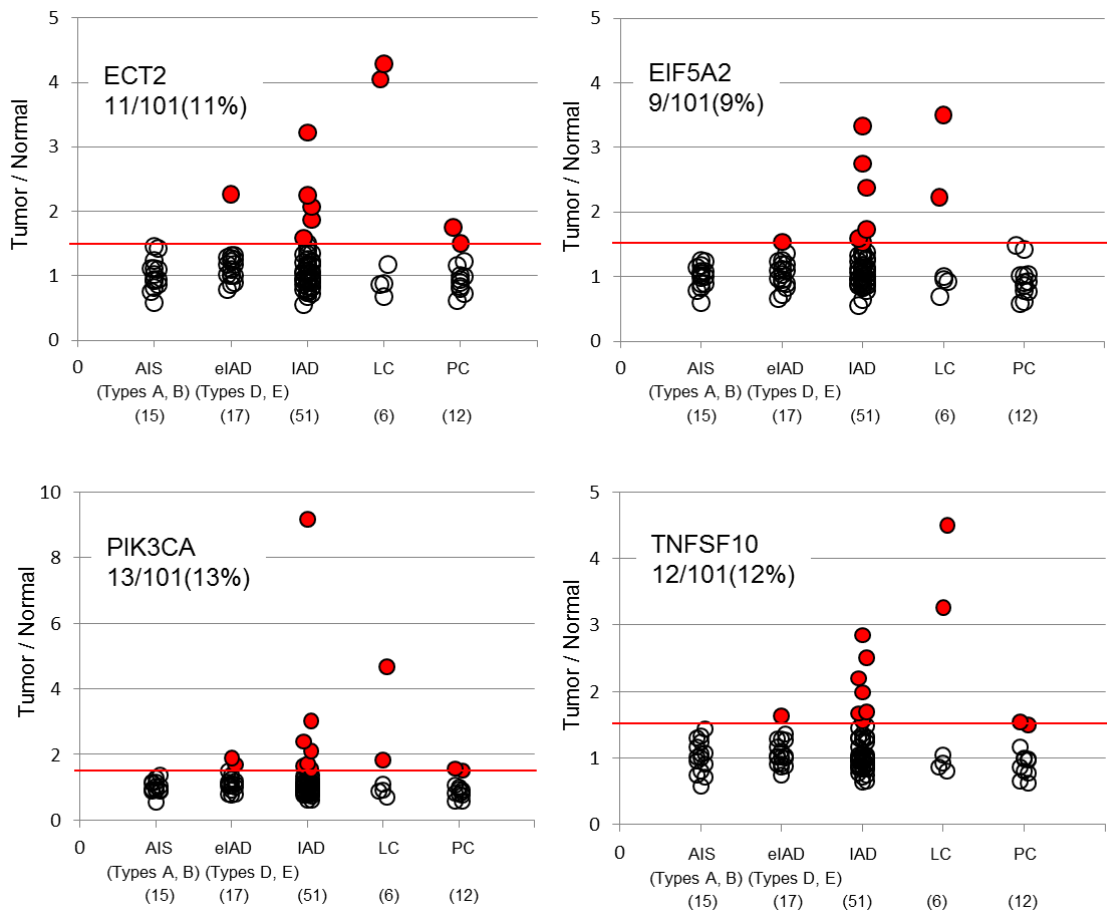


図11 肺癌症例101例を対象にし、PIK3CA, ECT2, EIF5A2, TNFSF10に対してquantitative real-time genomic PCRを行った。それぞれの遺伝子で、約10例の増幅(≤ 1.5)症例が見つかった (AIS : Types A、B、eIAD : Types D、E、IAD : 浸潤性肺腺癌、LC : 大細胞癌、PC : 多形癌)。

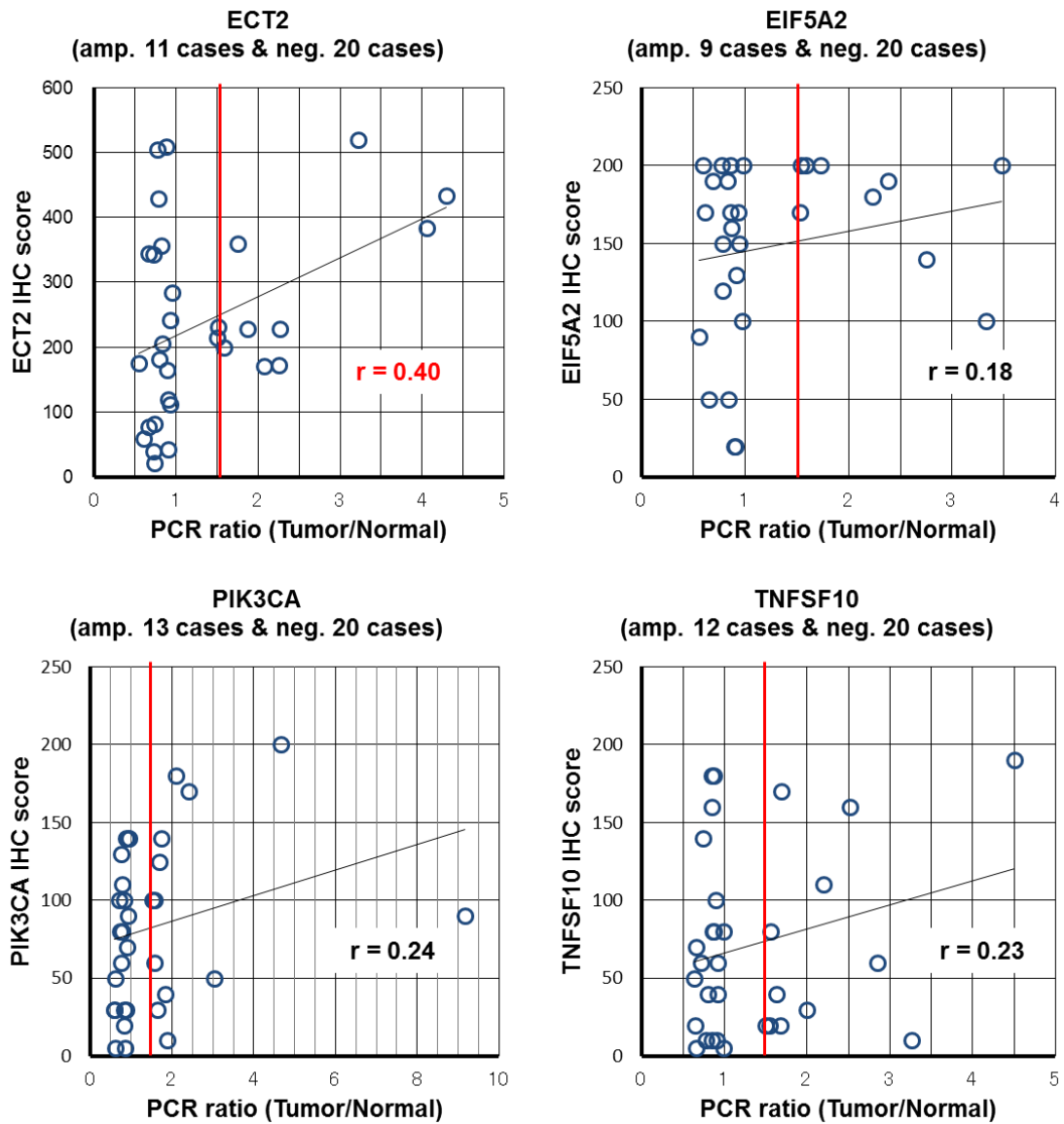


図12 Quantitative real-time genomic PCRにて ≤ 1.5 の増幅があった症例と、 > 1.0 の症例の qPCR scoreと免疫染色scoreの相関図 ECT2が最も相関していた。

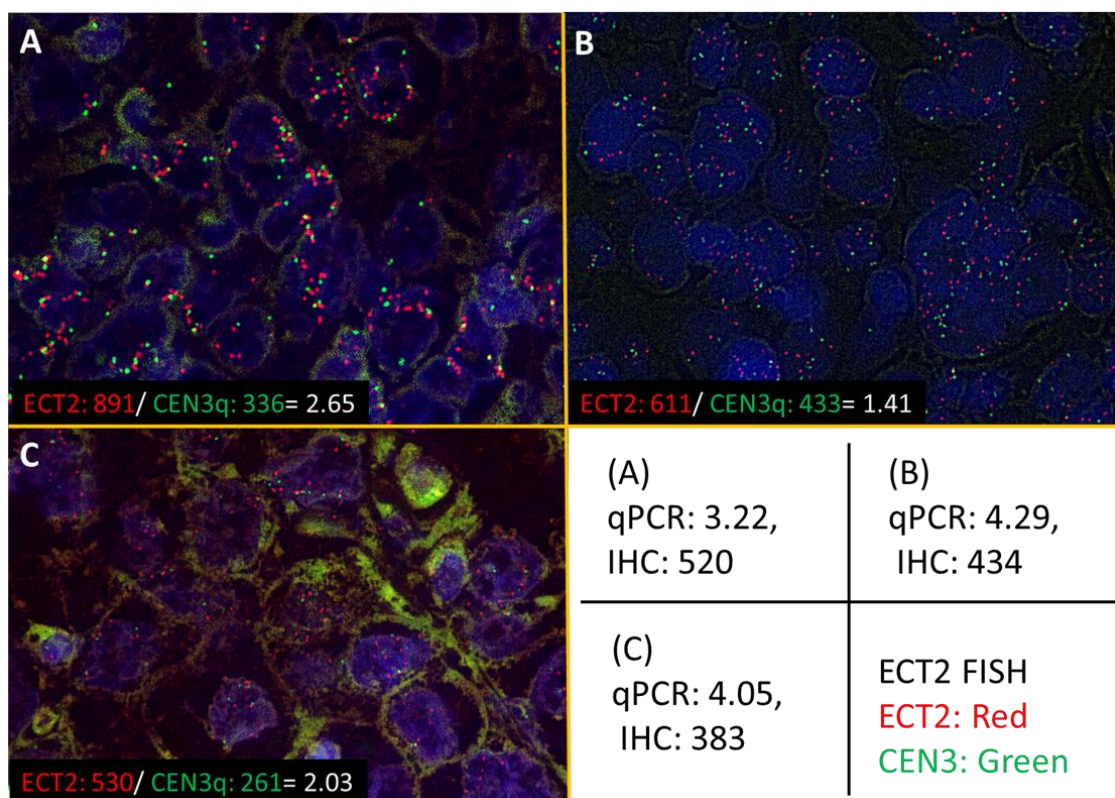


図13 ECT2に対するFISH

腫瘍細胞100個を計測し、ECT2/CEN3のシグナル比を算出した。

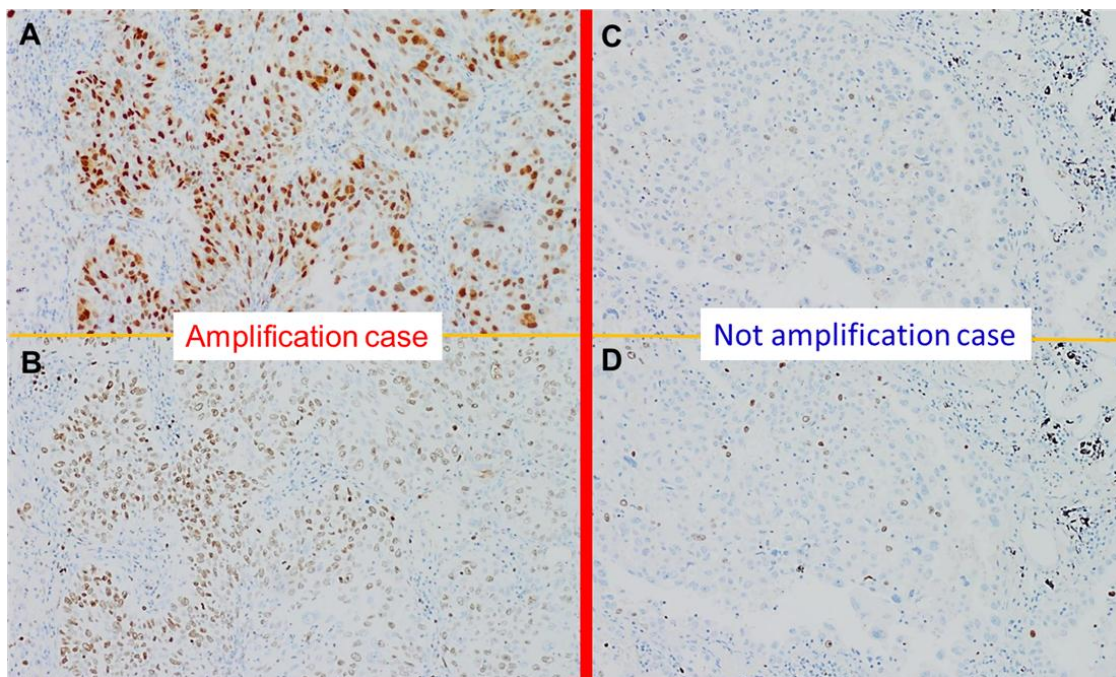


図14 ECT2とKi-67は免疫組織化学染色において同様の染色態度を示す。
(上段 : ECT2(A, C)、下段:Ki-67(B, D))

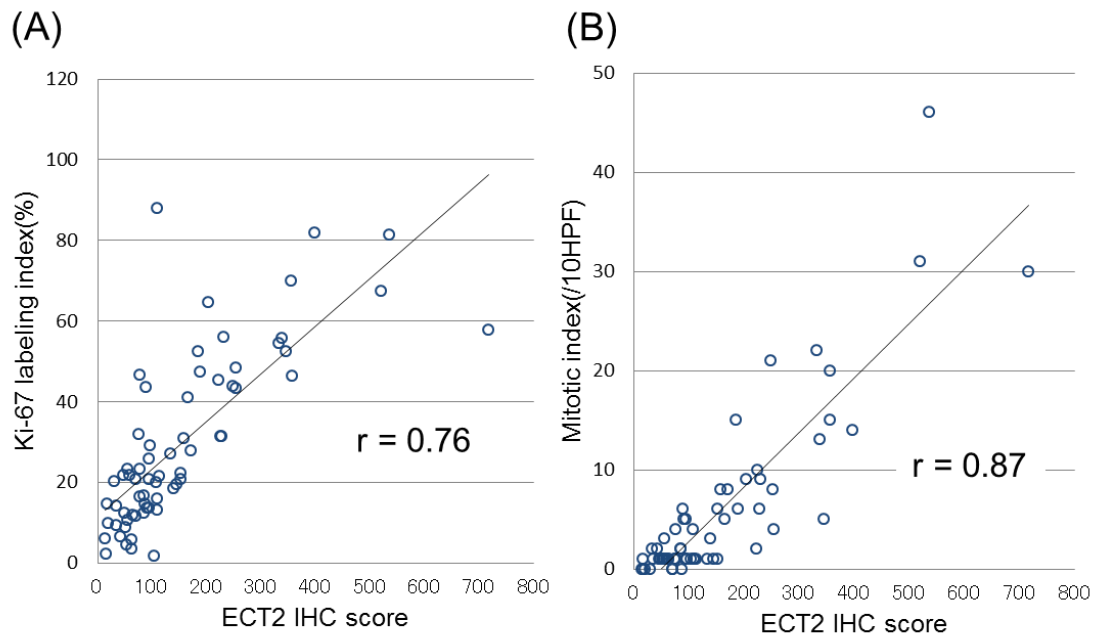
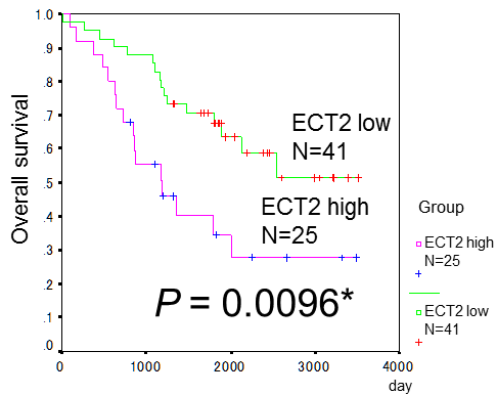


図15 ECT2 IHCとKi-67 labeling Index、mitotic Indexは相関を示した。

(A)



(B)

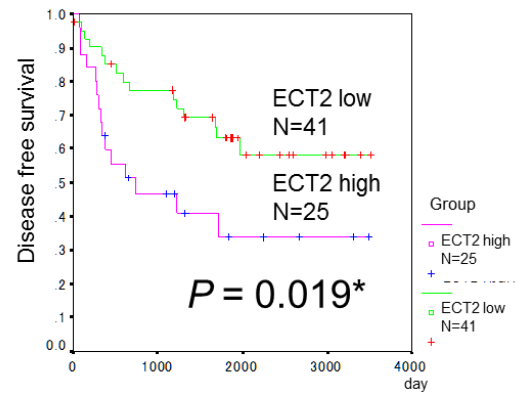


図16 免疫組織化学染色を用いたECT2高発現における予後解析

(A) OS : overall survival、(B) DFS : Disease free survivalともにECT2高発現群では予後不良である。

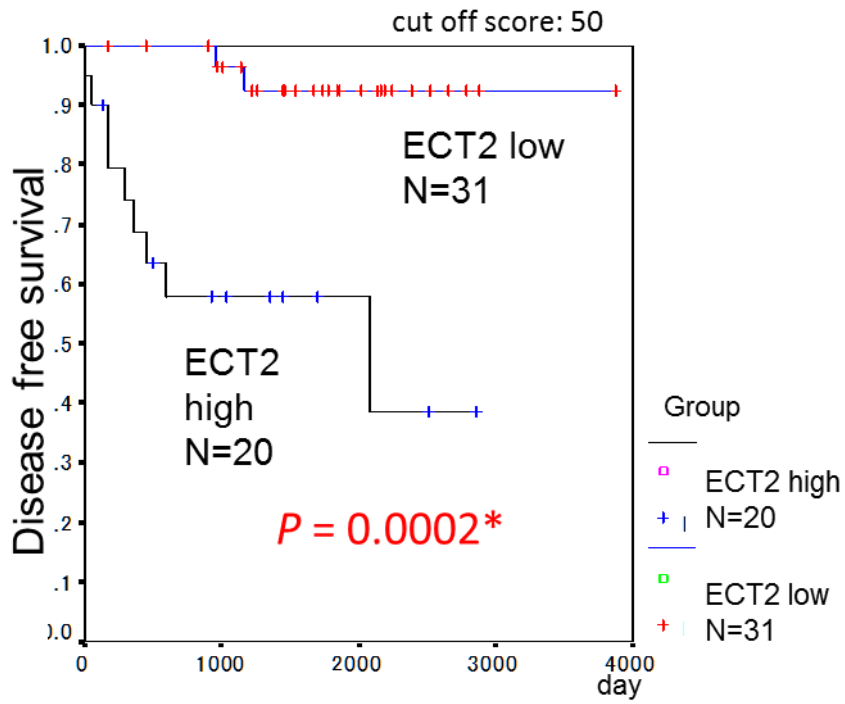


図17 小型肺腺癌51例における免疫組織化学染色を用いたECT2高発現における予後解析
DFS : Disease free survivalは、ECT2高発現群では予後不良である。

234992_x_at

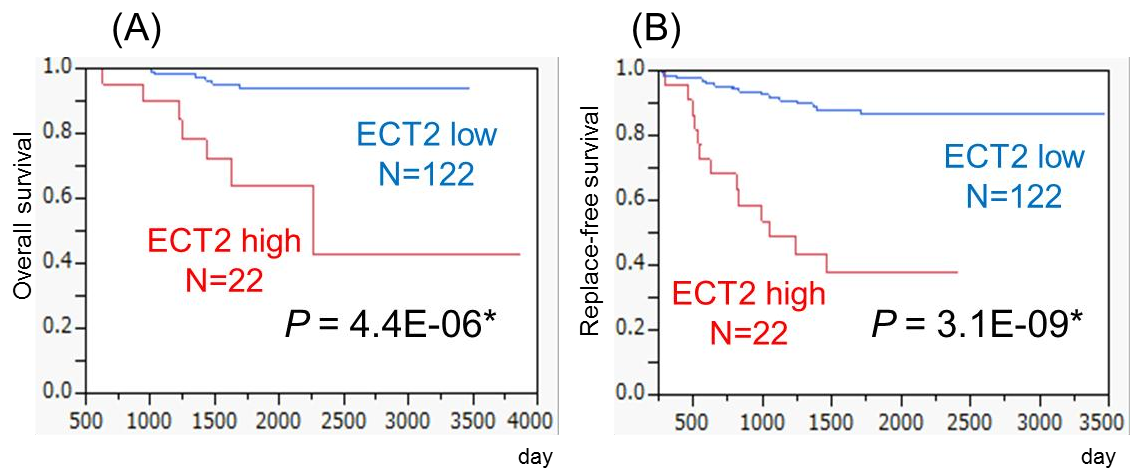


図18 ECT2遺伝子発現と予後との関連

ECT2高発現群はStage I期肺腺癌症例の15%に存在し、OS : overall survival、RFS : Replace-free survivalともに有意に予後と関連することが示された。

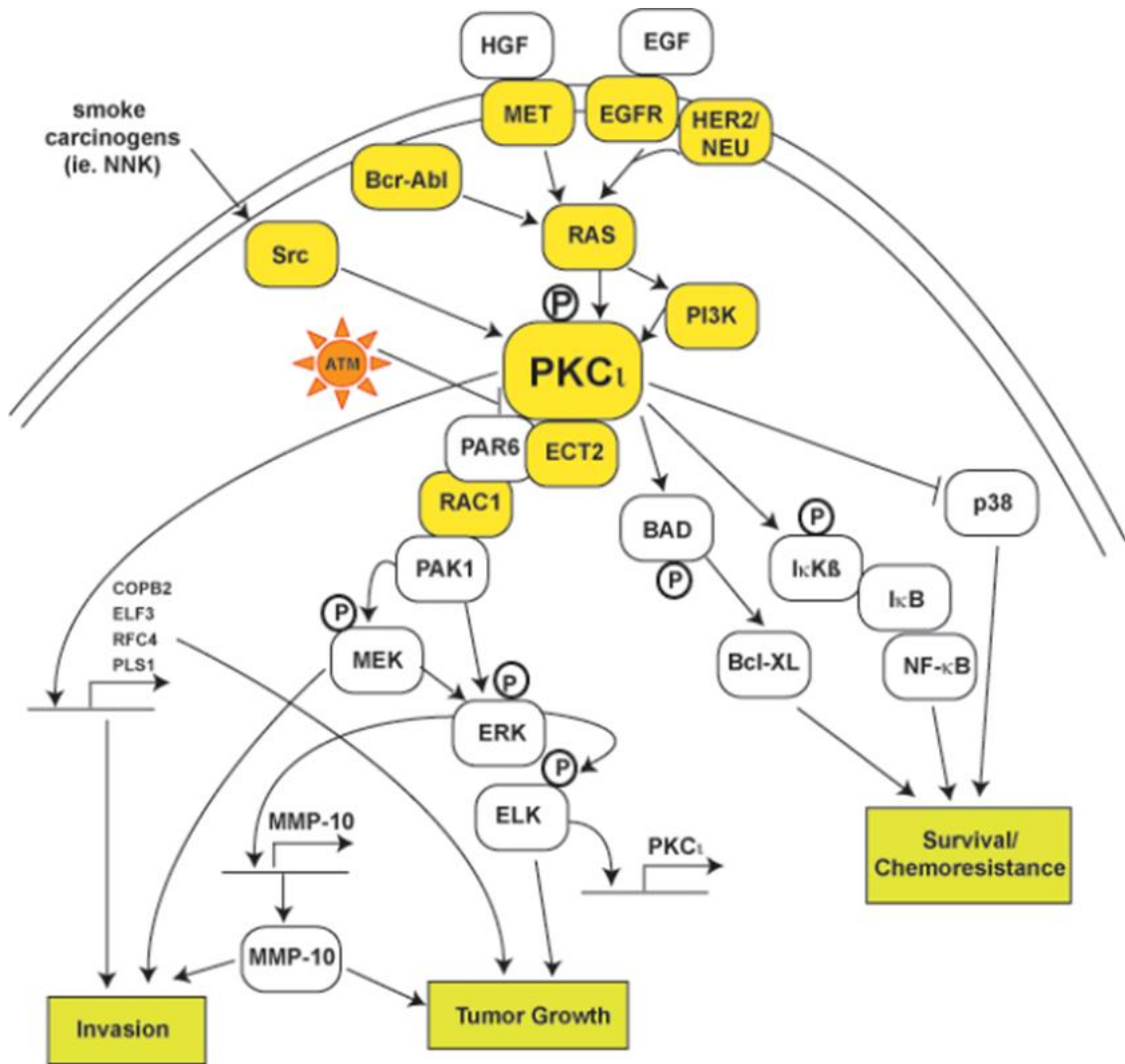


図19 ECT2のシグナル伝達経路 PKCιとPar6α複合体を形成し、Rac1を活性化させ、MAPK経路を活性化することにより細胞増殖に関与する。(文献53より引用)

表1 野口分類 (2cm以下の小型肺腺癌、文献22より引用)

既存の肺胞上皮を置換して増殖する形態を持つ群

Type A 限局した肺胞上皮癌

Type B 腫瘍内に肺胞虚脱型の線維化巣を認める限局性肺胞上皮癌

Type C 腫瘍内に線維芽細胞の増生を伴う線維化巣を認める限局性肺胞上皮癌

肺胞上皮非置換型の群

Type D 充実破壊性に増殖する充実型腺癌

Type E 管状腺癌

Type F 真の乳頭状腺癌

表2 IASLC/ATS/ERS (International Association for the Study of Lung Cancer)が提唱した肺腺癌における新しいWHO分類 (文献25より引用、一部変更)

Preinvasive lesions : 前浸潤性病変

Atypical adenomatous hyperplasia (AAH) : 異型腺腫様過形成

Adenocarcinoma in situ (3cm以下、以前のBAC) : 上皮内腺癌

Minimally invasive adenocarcinoma : 微小浸潤性腺癌

(3cm以下の置換性増殖優位型の腫瘍で、浸潤部は5mm以下)

Invasive adenocarcinoma : 浸潤性腺癌

Lepidic predominant : 置換性増殖優位型 (以前のnonmucinous BAC、浸潤部が5mm以上)

Acinar predominant : 腺房性増殖優位型

Papillary predominant : 乳頭状増殖優位型

Micropapillary predominant : 微小乳頭状増殖優位型

Solid predominant with mucin production : 粘液産生充実性増殖優位型

Variants of invasive adenocarcinoma : その他の浸潤癌

Invasive mucinous adenocarcinoma : 浸潤性粘液腺癌 (以前のmucinous BAC)

Colloid : 膠様(コロイド)腺癌

Fetal : 胎児型

Enteric : 腸型

表 3 TNM 分類 (第 7 版、文献 27 より引用)

T-原発腫瘍	
T1	腫瘍最大径 ≤ 3cm 肺が臓側胸膜に覆われている、葉気管支より中枢への浸潤が気管支鏡上なし(主気管支に及んでいない)
T1a	腫瘍最大径 ≤ 2cm
T1b	腫瘍最大径 > 2cmかつ ≤ 3cm
T2	腫瘍最大径 > 3cmかつ ≤ 7cm、または腫瘍最大径 ≤ 3cmでも以下のいずれかであるもの (T2a) ・主気管支に及ぶが気管分岐部より ≥ 2cm離れている ・臓側胸膜に浸潤 ・肺門まで連続する無気肺や閉塞性肺炎があるが一側肺全体には及んでいない
T2a	腫瘍最大径 > 3cmかつ ≤ 5cm、あるいは ≤ 3cmで胸膜浸潤あり (PL1、PL2、葉間の場合はPL3)
T2b	腫瘍最大径 > 5cmかつ ≤ 7cm
T3	最大径 > 7cmの腫瘍 ; 分岐部より2cm未満の主気管支に及ぶが分岐部には及ばない ; 胸壁 (superior sulcus tumor含む)、横隔膜、横隔神経、縦隔胸膜、心嚢のいずれかに直接浸潤 ; 一側肺に及ぶ無気肺や閉塞性肺炎 ; 同一葉内の不連続な副腫瘍結節
T4	大きさを問わず、縦隔、心臓、大血管、気管、反回神経、食道、椎体、気管分岐部への浸潤 あるいは同側の異なった肺葉内の副腫瘍結節
N-所属リンパ節	
NX	所属リンパ節評価不能
N0	所属リンパ節転移なし
N1	同側の気管支周囲かつまたは同側肺門、肺内リンパ節への転移で原発腫瘍の直接浸潤を含める
N2	同側縦隔かつ気管分岐部リンパ節への転移
N3	対側縦隔、対側肺門、同側あるいは対側の前斜角筋、鎖骨上窩リンパ節への転移
M-遠隔転移	
MX	遠隔転移評価不能
M0	遠隔転移なし
M1	遠隔転移がある
M1a	対側肺内の副腫瘍結節、胸膜結節、悪性胸水 (同側、対側)、悪性心嚢水
M1b	他臓器への遠隔転移がある

表4 TNM分類 (第7版)に基づいた病期分類 (文献27より引用)

Stage	T	N	M
IA期	T1aまたはT1b	N0	M0
IB期	T2a	N0	M0
IIA期	T1aまたはT1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB期	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA期	T1aまたはT1b	N2	M0
	T2aまたはT2b	N2	M0
	T3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIB期	Any T	N3	M0
	T4	N2	M0
IV期	Any T	Any N	M1aまたはM1b

表5 Array-CGHに使用した小型肺腺癌症例

Characteristics	No. of patients			Characteristics	No. of patients		
	Types A, B (n=6)	Types D, E (n=9)	total		Types A, B (n=6)	Types D, E (n=9)	total
n=15				TNM classification			
Gender				pT			
Male	4	9	13	T1a-T1b	5	4	9
Female	2	0	2	T2a-T2b	1	4	5
Age				T3			
≤ 60	0	0	0	T4	0	1	1
> 60	6	9	15	pN			
Smoking history				N0			
No	0	0	2	N1	0	2	2
Yes	4	9	13	N2	0	0	0
Pleural invasion				N3			
No	6	4	10	Unknown	0	2	2
Yes	0	5	5	pM			
Vascular invasion				M0			
No	6	1	7	M1a-M1b	0	0	0
Yes	0	8	8	pStage			
Lymphatic permeation				IA			
No	6	4	10	IB	1	3	4
Yes	0	5	5	IIA	0	1	1
				IIB			
				IIIA			
				IIIB			
				IV			

表6 Quantitative real-time genomic PCRに使用した症例

Characteristics	No. of patients(%)	Characteristics	No. of patients(%)
n=101			
Gender		TNM classification	
Male	67(66)	pT	
Female	34(34)	T1a-T1b	31(31)
		T2a-T2b	46(46)
Age		T3	19(19)
≤ 60	79(78)	T4	5(5)
> 60	22(22)		
		pN	
Smoking history		N0	44(44)
No	19(19)	N1	22(22)
Yes	66(65)	N2	30(30)
unknown	16(16)	N3	0(0)
		unknown	5(5)
Pleural invasion			
No	43(43)	pM	
Yes	58(57)	M0	94(93)
		M1a-M1b	7(7)
Vascular invasion			
No	32(32)	pStage	
Yes	62(61)	IA	23(23)
unknown	7(7)	IB	15(15)
		IIA	12(12)
Lymphatic permeation		IIB	13(13)
No	44(44)	IIIA	28(28)
Yes	51(50)	IIIB	3(3)
unknown	6(6)	IV	7(7)
Histologic type			
Noguchi's classification			
Type A, B	15(15)		
Type D, E	17(17)		
Invasive adenocarcinoma	51(50)		
Large cell carcinoma	6(6)		
Pleomorphic carcinoma	12(12)		

表7 Quantitative Real-time PCRに用いたプライマー

PIK3CA-F	5'-GCAAAGGTTGGTCGGTGAA-3'
PIK3CA-R	5'-GTGATCTTTGATGTTACTCTGATGCA-3'
ECT2-F	5'-GCAAACCTGCCCTGAGAAAA-3'
ECT2-R	5'-CAAGGCCTGGACAAACCTGT-3'
EIF5A2-F	5'-CCCAGTTGTGTGGCTTGATG-3'
EIF5A2-R	5'-GTTGCTGGTCCCTGAATGCT-3'
TNFSF10-F	5'-CTGCTGCCATTACTGCCTGA-3'
TNFSF10-R	5'-GAGGGAGCGGTATGCCTTTT-3'
EVI1-F	5'-GATGCCTTGAGTGGGCATCT-3'
EVI1-R	5'-GCGTGGGTGGGATTAACATC-3'
SKIL-F	5'-AAGCAGTCTGCCCACTTTGG-3'
SKIL-R	5'-TTGTCCCCTACCCCAATTCA-3'
MUC4-F	5'-GCCACAAGGGAAGATGGAGA-3'
MUC4-R	5'-GCACAGAATCCTCCCCTCAA-3'
GAPDH-F	5'-AACTGTTTTTCAGGCCTGCTC-3'
GAPDH-R	5'-CAAGCTCCTTGATTCCATCC-3'

表8 プライマーが認識する部位と増幅産物のサイズ

EV11 (113bp) 168913245
 168913187 ctggtgagaa ctaatcatgt gacccctcct aggtcaagaa aagtgtaaag tgtgagaaga
 168913247 **tgcccttgagt** **ggcactctgc** ttccagcat ccactccaac ctgtggaagg cggcatgaat
 168913307 ctttgctgat cagccaactg actctgccac **ggatgtaaat** **cccaccacg** cagcacaata
 168913357

SKIL (127bp) 170094598
 170094573 aggccagtct caaactcctg agctgaagca **gtctgccac** **ttggcctcc** caaagtgcta
 170094633 ggtaatatca cagatgtgag cagttgccgc tggccaactc aagattotta aacattaat
 170094693 accatacttt **gtgaattgg** **gtaggggac** aattgagata tattaatta ttgcccccg
 170094724

EIF5A2 (144bp) 170609777
 170609770 gtgcgttccc **agttgtgtg** **cttgatggg** cagatgatgg gtcagttat ggtggtgta
 170609830 ttgcttagg ctgtacaata atagtataa agcattcagt ctctcagatc actgtataat
 170609890 aatagtgatc **aagcattcag** **ggaccagcaa** ctctaaggaa gtagcacaag agtctacac
 170609920

TNFSF10 (138bp) 172226902
 172226897 gttgcctgct **gccattactg** **cctgatcaca** ggcagcttcc aactctgcac cttgcctcc
 172226957 acagctgaag cctccatata tcagccattt cctgctgaga tagcttacag ctgatgtgaa
 172227017 **gtgaaaaggc** **ataccgctcc** **ctcctttctg** tgttatgcac acctcttctg cccaacaagt
 172227039

ECT2 (136bp) 172503211
 172503158 tggctgctaa tacctatgga attaacaaga tggaaactcag tgctggactt **caggcaaac**
 172503218 **tgccctgaga** **aaattttct** ttctgtcctc ttgttactc aaatgtggcc cagctccctg
 172503278 acatagacc tctatattt cccacaatg tgggatagag acaaccagga **caggtttctc**
 172503338 **caggccttga** gggacaatta agcctacct caagatgatt gattagcttt gctgtcagag
 172503346

PIK3CA (111bp) 178945139
 178945091 tgttgtgtct cagggaatag ggagctctga gaggaggag aaagaggagc **aaaggttggt**
 178945151 **cgggtgaa** gaa gtcagaacat gcaacactta tcgaataagt tcaccatctt aattggctca
 178945211 tggcaccocc aactgcatca **gagtaacatc** **aaagatcact** gatctttgat cacagatcat
 178945249

MUC4 (133bp) 195531795
 195531776 gaggtagggc agagctgtg **ccacaaggga** **agatggagat** gacgccagt atgggtgat
 195531836 ggtcagtgga gggcctttgt acctgagttg gggaaaggag gagaatagcg gggcacgaaa
 195531896 atcaaggag **gcttgagggg** **aggattctgt** **gctctgtgaa** catctccca gctgagtcg
 195531927

GAPDH (116bp) 6632307
 6632278 catggccttg ttcttttta atcagaagta **actgttttca** **ggcctgctct** gaatctcct
 6632338 ttctccctcc aggcataat agatgaatt gagcagaagc ttggggcctg tcataccaga
 6632398 ggtttgtag **gaatcaagga** **gcttgagatt** ggccaagcag gtagccagag agcgccatca
 6632422

赤字はForward primer 部位、青字はReverse primer 部位、塩基上の数字はそれぞれ始まりの位置と終わりの位置を示す。

表9 2000-2005年までの使用した肺腺癌症例

Characteristics	No. of patients(%)	Characteristics	No. of patients(%)
n=66			
Gender		TNM classification	
Male	41(62)	pT	
Female	25(38)	T1a-T1b	16(24)
		T2a-T2b	33(50)
Age		T3	16(24)
≤ 60	6(9)	T4	1(2)
> 60	60(91)		
		pN	
Smoking history		N0	40(61)
No	24(36)	N1	10(15)
Yes	42(64)	N2	13(20)
		N3	0(0)
Predominant		unknown	3(4)
Histological Subtypes			
Lepidic	24(37)	pM	
Solid	12(18)	M0	64(97)
Acinar	18(27)	M1a-M1b	2(3)
Papillary	12(18)		
		pStage	
Pleural invasion		IA	13(20)
No	40(61)	IB	23(35)
Yes	26(39)	IIA	6(9)
		IIB	6(9)
Vascular invasion		IIIA	16(24)
No	31(47)	IIIB	0(0)
Yes	35(53)	IV	2(3)
Lymphatic permeation			
No	25(38)		
Yes	41(62)		

表10 1996-2007年までの使用した小型肺腺癌症例

Characteristics	No. of patients			Characteristics	No. of patients		
	Types A, B (n=29)	Types D, E (n=22)	total		Types A, B (n=29)	Types D, E (n=22)	total
n=51							
Gender				TNM classification			
Male	9	19	28	pT			
Female	20	3	23	T1a-T1b	29	9	38
				T2a-T2b	0	10	10
Age				T3	0	3	3
≤ 60	6	5	11	T4	0	0	0
> 60	23	17	40				
				pN			
Pleural invasion				N0	27	14	41
No	29	10	39	N1	0	3	3
Yes	0	12	12	N2	0	2	2
				N3	0	0	0
Vascular invasion				Unknown	2	3	5
No	29	7	36				
Yes	0	15	15	pM			
				M0	29	21	50
Lymphatic permeation				M1a-M1b	0	1	1
No	29	13	42				
Yes	0	9	9	pStage			
				IA	29	9	38
				IB	0	5	5
				IIA	0	3	3
				IIB	0	1	1
				IIIA	0	3	3
				IIIB	0	0	0
				IV	0	1	1

表11 免疫組織化学染色に使用した一次抗体名、クローン名、販売メーカー、抗原賦活化方法、および希釈倍率

抗体名	クローン名	販売メーカー	抗原賦活化方法	希釈倍率
ECT2	rabbit polyclonal	MILLIPORE	1xTE buffer, 105°C15分	1:200
EIF5A2	rabbit polyclonal	SIGMA	1xTE buffer, 105°C15分	1:100
PIK3CA	rabbit monoclonal, C73F8	Cell Signaling Technology	1xTE buffer, 105°C15分	1:400
TNFSF10	goat polyclonal	Santa Cruz	1xTE buffer, 105°C15分	1:50
Ki-67	Mouse monoclonal, MIB-1	Dako	10mM citrate buffer, 121°C10分	1:100

表12 10k-SNP array に使用した小型肺腺癌

Characteristics	No. of patients			Characteristics	No. of patients		
	Type A, B (n=14)	Type C, D (n=50)	total		Type A, B (n=14)	Type C, D (n=50)	total
n=64							
Gender				TNM classification			
Male	8	25	33	pT			
Female	6	25	31	T1a-1b	14	40	54
				T2a-2b	0	5	5
Age				T3	0	2	2
≤ 60	6	26	32	T4	0	3	3
> 60	8	24	32				
				pN			
Smoking history				N0	14	23	37
No	7	24	31	N1	0	14	14
Yes	7	26	33	N2	0	12	12
				N3	0	0	0
Pleural invasion				Unknown	0	1	1
No	14	31	45				
Yes	0	19	19	pM			
				M0	14	50	64
Vascular invasion				M1	0	0	0
No	14	16	30				
Yes	0	34	34	pStage			
				IA	14	20	34
Lymphatic permeation				IB	1	1	2
No	13	22	35	IIA	0	12	12
Yes	1	28	29	IIB	0	2	2
				IIIA	0	14	14
				IIIB	0	1	1
				IV	0	0	0

表13 cDNA microarrayに用いた早期肺腺癌症例

Characteristics	No. of patients(%)	Characteristics	No. of patients(%)
n=144			
Gender		TNM classification	
Male	63 (44)	pT	
Female	81 (56)	T1a-1b	95 (66)
		T2	49 (34)
Age		T3	0
≤ 60	66 (46)	T4	0
> 60	78 (54)		
		pN	
Smoking history		N0	144 (100)
No	79 (55)	N1	0
Yes	65 (45)	N2	0
		N3	0
Pleural invasion		unknown	0
No	127 (88)		
Yes	17 (12)	pM	
		M0	144 (100)
Vascular invasion		M1	0
No	101 (70)		
Yes	43 (30)	pStage	
		IA	95 (66)
Lymphatic permeation		IB	49 (34)
No	95 (66)	IIA	0
Yes	49 (34)	IIB	0
		IIIA	0
		IIIB	0
		IV	0

表14 cDNAmicroarrayで使したプローブセット

<p>234992_x_at (ORF内)</p> <p>5'-ACTTCTTATCCGACCAGTACAGAGG-3'</p> <p>5'-GAGGTTACCCAGTGTTGCATTACTT-3'</p> <p>5'-ATGCCCAGCTAATCTTTTATCTTCT-3'</p> <p>5'-CTTCTCACCGAAGCTTAGTACAGCG-3'</p> <p>5'-ACAATTTCTCTAGGTGAGCACCCCT-3'</p> <p>5'-GTGAGCACCCCTGTGACAGAGGAGA-3'</p> <p>5'-GAAGGTATCGGCACCATACAGAGAG-3'</p> <p>5'-GATGCCATAATGGCTTTGCCTTGCT-3'</p> <p>5'-TTTGCCTTGCTTTGTGAGGCCACCA-3'</p> <p>5'-GAGGCCACCAAACAGAGCAGGCAAT-3'</p> <p>5'-GCAGGCAATGTGCTACTCAGTTTCC-3'</p>
<p>219787_s_at (3' UTR上)</p> <p>5'-TAGCTGTTTCAGAGAGAGTACGGTA-3'</p> <p>5'-GGTAATTTTATCCACTAGCAAATCT-3'</p> <p>5'-AGACTGTTTGTACCCTTCATGAAAT-3'</p> <p>5'-GAAGTTGCCATCAGTTTTACTAATC-3'</p> <p>5'-CAGTTTTACTAATCTTCTGTGAAAT-3'</p> <p>5'-GCATAGATATGCGCATGTTCAACTT-3'</p> <p>5'-GCATGTTCAACTTTTTATTGTGGTC-3'</p> <p>5'-TCACAATAGCCTTTTTATAGTCAGT-3'</p> <p>5'-TTCCTATTTCTTTAGGGAGTGCTAC-3'</p> <p>5'-GTATGTGCCACTTCTGAGAGTAGTA-3'</p> <p>5'-GTAAATGACTCTTTGCTACATTTTA-3'</p>

表15 ECT2のvariant

ECT2のvariants(1-3)	bp	CDS 領域	それぞれのvariantで異なる点
variant 1 (isoform a: 914 aa)	4192	196..2940 (2745bp)	
variant 2 (isoform b: 883 aa)	4422	519..3170 (2652bp)	variant 1と比較して5' UTRが長く、インフレーム変異(欠失)がある。isoform bは、isoform aに比較して短く、N末端領域において異なっている。
variant 3 (isoform b: 883 aa)	4099	196..2847 (2652bp)	variant 1と比較してインフレーム変異(欠失)がある。variant 2と同様のIsoform bをコードする。

表16 t検定を用いた野口分類のType A、Bに比し、Type D、Eで有意に増幅していた33遺伝子

BAC clones	Gene name	Locus	t-statistic	p-value
RP11-383G10	<i>RBBP5</i>	1q32.1	-3.792876821	0.007347221
RP11-427I06	<i>MCM2</i>	3q21.3	3.682871368	0.008713638
RP11-065E22	<i>ACPP</i>	3q22.1	2.94082803	0.008160796
RP11-112O24	<i>FOXL2</i>	3q22.3	6.291582144	3.32227E-05
RP11-094E10	<i>TFDP2</i>	3q23	5.232500755	0.000538004
RP11-278L15	<i>TM4SF1</i>	3q25.1	5.617242583	0.000177728
RP11-340G23	<i>RAP2B</i>	3q25.2	3.897072307	0.003683481
RP11-600P22	<i>MLF1</i>	3q25.32	4.120922486	0.003660324
RP11-153J06	<i>SKIL</i>	3q26.2	7.269286391	2.75147E-05
RP11-362K14	<i>TERC</i>	3q26.2	7.093976322	4.13715E-05
RP11-082C09	<i>EVI1</i>	3q26.2	5.068358295	0.00016898
RP11-654K19	<i>EIF5A2</i>	3q26.2	3.46719365	0.008235906
RP11-816B04	<i>ECT2</i>	3q26.31	5.293653072	0.000370828
RP11-044A01	<i>TNFSF10</i>	3q26.31	3.460095649	0.004558487
RP11-245C23	<i>PIK3CA</i>	3q26.32	4.21263498	0.00229087
RP11-315J22	<i>ABCC5</i>	3q27.1	7.557179869	2.06476E-05
RP11-125E08-1	<i>EIF4G1</i>	3q27.1	4.352141919	0.00306082
RP11-125E08-2	<i>THPO</i>	3q27.1	3.274051456	0.008110714
RP11-443P15	<i>ETV5</i>	3q27.2	3.277823096	0.009756305
RP11-044H04	<i>BCL6</i>	3q27.3	6.622092619	3.77478E-05
RP11-056H08	<i>SST</i>	3q27.3	3.832651115	0.004174166
RP11-171N02	<i>MUC4</i>	3q29	3.232751068	0.008483926
RP11-021N03	<i>MF12</i>	3qtel	3.953113775	0.003903637
RP11-182A09	<i>FAT</i>	4q35.2	-3.716885606	0.006978855
RP11-164A04	<i>MCC</i>	5q22.2	-4.140342319	0.000750305
RP11-003B10	<i>APC</i>	5q22.22	-3.723170055	0.002409318
RP11-119J18	<i>IL4</i>	5q23.3	-5.029665186	0.000489106
RP11-737P20	<i>SKP1A</i>	5q31.1	-3.554353409	0.001826493
RP11-461O14	<i>EGR1</i>	5q31.2	-2.794023269	0.006863682
RP11-318B23	<i>IL12B</i>	5q33.3	-3.329816032	0.004514321
RP11-125F04	<i>ANK1</i>	8p11.21	3.176342312	0.003313457
RP11-295K03	<i>CTSD</i>	11p15.5	-3.178768116	0.005782442
RP11-292P13	<i>B2M</i>	15q21.1	-3.110612505	0.005501859

$p < 0.01$

表17 Z検定を用いた野口分類のType A、Bに比し、Type D、Eで有意に増幅していた48遺伝子

ID	z-value	p-value	FWER	FDR
ABCC5	-7.946631848	1.92E-15	1.51E-12	1.08E-12
SKIL	-7.902185948	2.74E-15	2.15E-12	1.08E-12
TERC	-6.622699631	3.53E-11	2.77E-08	9.24E-09
TM4SF1	-6.464383883	1.02E-10	7.99E-08	2.00E-08
BCL6	-6.131603991	8.70E-10	6.84E-07	1.37E-07
FOXL2	-5.58326419	2.36E-08	1.86E-05	3.09E-06
TFDP2	-5.32676168	1.00E-07	7.86E-05	1.12E-05
MFI2	-5.282516256	1.27E-07	1.00E-04	1.25E-05
MCC	5.094848716	3.49E-07	2.74E-04	3.05E-05
PIK3CA	-4.91943591	8.68E-07	6.82E-04	6.48E-05
RAP2B	-4.910844566	9.07E-07	7.13E-04	6.48E-05
ECT2	-4.858515028	1.18E-06	9.30E-04	7.75E-05
FAT	4.794907145	1.63E-06	1.28E-03	9.84E-05
IL4	4.731221232	2.23E-06	1.75E-03	1.25E-04
EIF4G1	-4.67791739	2.90E-06	2.28E-03	1.52E-04
EVI1	-4.661407782	3.14E-06	2.47E-03	1.54E-04
FGF12	-4.347981068	1.37E-05	1.08E-02	6.35E-04
MLF1	-4.33490726	1.46E-05	1.15E-02	6.37E-04
SST	-4.222636389	2.41E-05	1.90E-02	9.99E-04
SKP1A	4.196872039	2.71E-05	2.13E-02	1.01E-03
RBBP5	4.196465325	2.71E-05	2.13E-02	1.01E-03
ACPP	-4.147594351	3.36E-05	2.64E-02	1.15E-03
EIF5A2	-4.14650919	3.38E-05	2.65E-02	1.15E-03
CDC25C	4.105065639	4.04E-05	3.18E-02	1.32E-03
MCM2	-3.859625718	0.000113561	8.93E-02	3.50E-03
ANK1	-3.854870201	0.000115791	9.10E-02	3.50E-03
APC	3.6657128	0.000246651	1.94E-01	7.18E-03
CTSD	3.635253953	0.000277707	2.18E-01	7.80E-03
EGR1	3.540672394	0.000399109	3.14E-01	1.05E-02
ETV5	-3.53914195	0.00040143	3.16E-01	1.05E-02
THPO	-3.51577688	0.000438469	3.45E-01	1.11E-02
CCNG1	3.401239754	0.00067081	5.27E-01	1.59E-02
TNFSF10	-3.401033008	0.000671317	5.28E-01	1.59E-02
MME	-3.394912384	0.000686506	5.40E-01	1.59E-02
MUC4	-3.344142244	0.000825374	6.49E-01	1.85E-02
LMO1	3.327981854	0.000874776	6.88E-01	1.91E-02
RBP1	-3.293304848	0.000990171	7.78E-01	2.10E-02
FGF1	3.26155105	0.001108045	8.71E-01	2.29E-02
RALA	3.172319696	0.001512264	1.00E+00	3.05E-02
ABCB4	-3.144788599	0.001662069	1.00E+00	3.27E-02
PDGFRB	3.136734001	0.00170841	1.00E+00	3.28E-02
CDK6	-3.126373157	0.001769768	1.00E+00	3.31E-02
B2M	3.101565612	0.001925002	1.00E+00	3.52E-02
CYP3A4	-3.052156765	0.002272034	1.00E+00	4.06E-02
AKT3	3.002625469	0.002676616	1.00E+00	4.68E-02
IL12B	2.974626376	0.002933456	1.00E+00	5.01E-02
SMURF1	-2.899562529	0.003736838	1.00E+00	6.25E-02
TP73L	-2.812547773	0.004915072	1.00E+00	8.05E-02

表18 FWER・FDR における1%・5%基準を超える発現差を有する遺伝子数

	FWER		FDR	
	1%	5%	1%	5%
野口Type A, B	13	18	20	29
野口Type D, E	3	6	8	16
合計	16	24	28	45

表19 Z検定における染色体領域単位での発現差解析で有意差を得た39領域

Chromosome	P-values	FWER	FDR
3q27.3	6.83E-13	3.04E-10	3.04E-10
3q25.1	1.02E-10	4.54E-08	2.27E-08
3q26.2	3.44E-10	1.53E-07	5.12E-08
3q23	2.38E-09	1.06E-06	2.65E-07
3q27.1	1.01E-08	4.52E-06	9.03E-07
3q25.2	1.38E-08	6.16E-06	1.03E-06
3q26.31	1.74E-08	7.77E-06	1.11E-06
3q22.3	2.36E-08	1.05E-05	1.32E-06
3qtel	1.27E-07	5.68E-05	6.31E-06
5q31.2	3.06E-07	1.36E-04	1.36E-05
5q22.2	3.49E-07	1.56E-04	1.40E-05
7q22.1	3.77E-07	1.68E-04	1.40E-05
3q26.32	8.68E-07	3.87E-04	2.98E-05
3q28	1.18E-06	5.27E-04	3.77E-05
4q35.2	1.63E-06	7.26E-04	4.84E-05
5q23.3	2.23E-06	9.95E-04	6.22E-05
7q21.12	3.73E-06	1.67E-03	9.79E-05
3q25.32	1.46E-05	6.50E-03	3.61E-04
1q32.1	1.75E-05	7.82E-03	4.11E-04
3q22.1	3.36E-05	1.50E-02	7.49E-04
5q31.1	8.02E-05	3.57E-02	1.70E-03
11p15.4	1.12E-04	4.99E-02	2.15E-03
3q21.3	1.14E-04	5.06E-02	2.15E-03
8p11.21	1.16E-04	5.16E-02	2.15E-03
5q22.22	2.47E-04	1.10E-01	4.40E-03
3q27.2	4.01E-04	1.79E-01	6.89E-03
5q34	6.71E-04	2.99E-01	1.11E-02
3q29	8.25E-04	3.68E-01	1.31E-02
5q31.3	1.11E-03	4.94E-01	1.70E-02
5q32	1.71E-03	7.62E-01	2.54E-02
7q21.2	1.77E-03	7.89E-01	2.55E-02
11p15.5	1.91E-03	8.52E-01	2.66E-02
7q22.3	2.33E-03	1.00E+00	3.14E-02
1q44	2.68E-03	1.00E+00	3.51E-02
5q33.3	2.93E-03	1.00E+00	3.74E-02
2q14.3	3.22E-03	1.00E+00	3.99E-02
1p21.3	4.11E-03	1.00E+00	4.95E-02
15q21.1	4.93E-03	1.00E+00	5.78E-02
5q35.1	5.36E-03	1.00E+00	6.13E-02

表20 FWER・FDR における1%・5%基準を超える発現差を有する染色体領域数

FWER		FDR	
1%	5%	1%	5%
19	22	26	37

表21 Z検定における3番染色体長腕を構成する遺伝子の野口分類Type A、BおよびType D、Eの発現差解析で有意差を得た27遺伝子

ID	z-value	p-value	FWER	FDR
ABCC5	-7.946631848	1.92E-15	1.51E-12	1.08E-12
SKIL	-7.902185948	2.74E-15	2.15E-12	1.08E-12
TERC	-6.622699631	3.53E-11	2.77E-08	9.24E-09
TM4SF1	-6.464383883	1.02E-10	7.99E-08	2.00E-08
BCL6	-6.131603991	8.70E-10	6.84E-07	1.37E-07
FOXL2	-5.58326419	2.36E-08	1.86E-05	3.09E-06
TFDP2	-5.32676168	1.00E-07	7.86E-05	1.12E-05
MFI2	-5.282516256	1.27E-07	1.00E-04	1.25E-05
PIK3CA	-4.91943591	8.68E-07	6.82E-04	6.48E-05
RAP2B	-4.910844566	9.07E-07	7.13E-04	6.48E-05
ECT2	-4.858515028	1.18E-06	9.30E-04	7.75E-05
EIF4G1	-4.67791739	2.90E-06	2.28E-03	1.52E-04
EVI1	-4.661407782	3.14E-06	2.47E-03	1.54E-04
FGF12	-4.347981068	1.37E-05	1.08E-02	6.35E-04
MLF1	-4.33490726	1.46E-05	1.15E-02	6.37E-04
SST	-4.222636389	2.41E-05	1.90E-02	9.99E-04
ACPP	-4.147594351	3.36E-05	2.64E-02	1.15E-03
EIF5A2	-4.14650919	3.38E-05	2.65E-02	1.15E-03
MCM2	-3.859625718	0.000113561	8.93E-02	3.50E-03
ETV5	-3.53914195	0.00040143	3.16E-01	1.05E-02
THPO	-3.51577688	0.000438469	3.45E-01	1.11E-02
TNFSF10	-3.401033008	0.000671317	5.28E-01	1.59E-02
MME	-3.394912384	0.000686506	5.40E-01	1.59E-02
MUC4	-3.344142244	0.000825374	6.49E-01	1.85E-02
RBP1	-3.293304848	0.000990171	7.78E-01	2.10E-02
TP73L	-2.812547773	0.004915072	1.00E+00	8.05E-02
USP13	-2.596764757	0.009410635	1.00E+00	1.25E-01

表22 FWER・FDR における1%・5%基準を超える発現差を有する遺伝子数

FWER		FDR	
1%	5%	1%	5%
13	18	19	25

表23 免疫組織化学染色を用いたECT2高発現における単変量解析および多変量解析

(A)

Univariate analysis	High ECT2	Low ECT2	<i>p</i>
n=66	25	41	
pT (1a/1b/2a/2b/3/4)	0/3/12/1/9/0	0/13/19/1/7/1	0.24
pN (0/1/2)	10/7/8	33/3/5	0.003*
pM (0/1)	1(4.0%)	1(2.4%)	0.72
pStage (IA/IB/IIA/IIB/IIIA/IIIB/IV)	1/6/4/3/10/0/1	12/17/2/3/6/0/1	0.022*
pI (0/1/2/3)	12/7/2/4	28/7/3/3	0.39
V	19(76.0%)	16(39.0%)	0.004*
Ly	18(72.0%)	23(56.1%)	0.20
subtype (lepidic/solid/acinar/papillary)	3/11/8/3	21/1/10/9	0.0001*

ECT2 IHC score cut off = 140

(B)

Multivariate analysis	DFS			OS		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
pSize(≤ 3 cm vs >3cm)	1.119	0.268-4.673	0.878	0.918	0.066-0.246	0.037*
pT (1a, 1b, 2a vs 2b, 3, 4)	0.167	0.015-1.862	0.146	40.177	0.349-3.743	0.276
pN (0 vs 1, 2)	0.201	0.010-4.187	0.300	18.074	0.184-1.825	0.607
pM (0 vs 1)	0.000	.	0.999	0.999	0.000	0.000
pStage (IA, IB vs IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV)	11.109	0.303-406.762	0.190	7.823	0.015-0.342	0.502
pI (- vs +)	0.282	0.067-1.182	0.083	1.089	0.079-0.293	0.067
V (- vs +)	0.351	0.076-1.610	0.178	2.554	0.167-0.652	0.540
Ly (- vs +)	0.331	0.072-1.528	0.157	1.245	0.077-0.309	0.099
Subtype (lepidic vs solid, acinar, papillary)	0.160	0.029-0.880	0.035*	1.248	0.069-0.293	0.097
ECT2 (low vs high)	1.325	0.241-7.266	0.746	3.919	0.189-0.861	0.847

表24 小型肺腺癌に対する免疫組織化学染色を用いたECT2高発現における発現解析

(A)

	High ECT2	Low ECT2	Total
Type A, B	0	29	29
Type D, E	20	2	22
Total	20	31	51

$p < 0.0001$

(B)

Univariate analysis	High ECT2	Low ECT2	<i>p</i>
n = 51			
pT (1a/1b/2a/2b/3/4)	8/0/9/0/3	29/1/1/0/0	<0.0001*
pN (0/1/2)	15/3/2	31/0/0	0.014*
pM (0/1)	1 (5%)	0 (0%)	0.21
pStage (IA/IB/IIA/IIB/IIIA/IIIB/IV)	8/5/2/1/3/1	30/1/0/0/0/0	0.004*
Subtype (AIS/D,E)	0/20	29/2	<0.0001*
V	5/12/2/1	31/0/0/0	<0.0001*
Ly	11/7/1/1	31/0/0/0	0.001*
pl	8/8/2/2	31/0/0/0	<0.0001*
recurrence	9 (45%)	2 (6.5%)	0.001*

ECT2 IHC score cut off = 50

(C)

Multivariate analysis	DFS		
	HR	95% CI	<i>p</i>
pT (1a,1b vs 2a, 2b, 3, 4)	11.1	1.29-95.00	0.028*
pN (0 vs 1, 2)	0.24	0.03-1.93	0.18
pStage (IA, IB vs IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV)	2.24	0.32-15.70	0.42
V (- vs +)	0.51	0.05-5.67	0.58
Ly (- vs +)	4.62	0.40-53.80	0.22
ECT2 (low vs high)	2.03	0.18-23.00	0.57

表25 国立がんセンター症例におけるECT2の増幅、発現解析

(A)

Noguchi Classification	ECT2 Amplification(+)	ECT2 Amplification(-)	Total
Type A,B	0	14	14
Type C,D	13	37	50
Total	13	51	64

$p = 0.025$

(B)

Univariate analysis	OS			RFS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Age (≥ 60 vs. < 60)	1.14	0.38-3.53	0.82	1.14	0.65-3.01	0.42
Gender (male vs. female)	1.22	0.39-3.68	0.72	1.02	0.47-2.14	0.96
Smoking history (+ vs. -)	1.73	0.57-5.38	0.32	1.13	0.53-2.38	0.75
Tumor size (> 3 cm vs. ≤ 3 cm)	1.56	0.42-4.79	0.47	2.18	0.96-4.65	0.06
Lymphatic permeation (+,± vs. -)	4.72	1.54-17.44	0.0064*	4.25	2.00-9.58	0.0002*
Vascular invasion (+ vs.-)	9.87	3.01-44.06	9.80E-05*	6.48	3.00-15.09	1.50E-06*
Pleural invasion (1, 2 vs. 0)	1.33	0.20-4.98	0.72	1.76	0.59-4.26	0.28
pStage_ver.7 (IB vs. IA)	2.32	0.75-6.98	0.14	3.04	1.44-6.44	0.0041*
ECT2 expression (high vs. low)						
234992_x_at	8.45	2.80-26.32	0.0003*	7.04	3.28-14.92	2.67E-06*
219787_s_at	4.96	1.59-14.98	0.0072*	3.86	1.75-8.16	0.0012*

(C)

234992_x_at						
Multivariate analysis	OS			RFS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Lymphatic permeation (+,± vs. -)	1	0.24-4.70	> 0.99	1.41	0.58-3.62	0.46
Vascular invasion (+ vs.-)	5.06	1.13-28.15	0.033*	3.76	1.42-10.30	0.0076*
pStage_ver.6 (IB vs. IA)				2.95	0.62-13.39	0.17
ECT2 expression (high vs. low)						
234992_x_at	11.67	2.57-60.07	0.0016*	6.54	2.54-16.83	1.50E-04*
219787_s_at						
219787_s_at						
Multivariate analysis	OS			RFS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Lymphatic permeation (+,± vs. -)	1.48	0.33-7.53	0.61	1.8	0.69-4.90	0.23
Vascular invasion (+ vs.-)	4.88	0.93-30.39	0.061	3.55	1.22-10.59	0.02*
pStage_ver.6 (IB vs. IA)				2.03	0.45-8.60	0.34
ECT2 expression (high vs. low)						
234992_x_at						
219787_s_at	2.88	0.77-10.48	0.11	1.85	0.72-4.50	0.19