

肺腺癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) と Estrogen Receptor β (ER β) に関する検討

稲田 秀洋 野村 将春 桑島 由佳
坂田 義詞 名和 公敏 前田 純一
宮島 邦治 大平 達夫 坪井 正博
平野 隆 加藤 治文

東京医科大学外科学第一講座

【要旨】 原発性肺腺癌患者において上皮成長因子受容体 (EGFR) とエストロゲン受容体 α 及び β (ER α 、ER β) の発現、EGFR 突然変異との関係、そして overall survival への関与について検討した。

対象は、原発性肺腺癌患者 ($n=82$) で EGFR 突然変異群 ($n=43$ 、以下 MU (mutation) 群と表記。それ以外は WT (wild type) 群と表記。) を含む。EGFR 突然変異の有無はシークエンス法により判定した。DNA における各遺伝子の発現を定量的 PCR によって測定した。

EGFR の発現は、MU 群で有意に増加していた ($p<0.001$)。ER β の発現は、MU 群で増加している傾向があった ($p=0.06$)。WT 群での EGFR の発現は、ER β ($r=-0.68$) の発現とは逆相関を示したが、MU 群では同様の関係はみられなかった。各遺伝子 (EGFR、ER α 及び ER β) では overall survival に影響を及ぼさなかったが、EGFR の発現が低い群では、ER β の発現の増加が予後に関与していた ($p=0.03$)。これらの結果より、特に EGFR の発現が低い症例群において、ER β が肺腺癌の治療戦略上、新たな分子標的になる可能性が示唆された。

はじめに

わが国における、死因の第 1 位は悪性新生物であるが、全ての悪性新生物では、非小細胞性肺癌 (Non-small cell lung cancer; NSCLC) が 1998 年以降、第 1 位を占めている。わが国ばかりでなく、アメリカ合衆国や、ヨーロッパにおいても同様のデータが出されている¹⁾。しかも、ここ数十年で新たな抗癌剤が出てきているにもかかわらず、死亡者数は年々増加傾向にある²⁾。

これまでも肺癌には様々な癌遺伝子、癌抑制遺伝

子の関与が考えられ、癌遺伝子に関しては、その発現を抑制することにより癌細胞の増殖や転移を抑えられると期待されてきた³⁾。中でも、ErbB ファミリーの 1 つである 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、同時に様々な悪性腫瘍においても過剰発現がみられることが報告されている⁴⁾。特に NSCLC では 40~80% の症例に過剰発現しており⁵⁾、この過剰発現が生存期間の短縮につながっていると報告されている⁶⁾。これまでも EGFR に対して様々な研究がなされてきたが、近年報告された EGFR の突然変異は、い

2007 年 12 月 19 日受付、2008 年 1 月 21 日受理

キーワード：上皮成長因子受容体、エストロゲン受容体、遺伝子突然変異、原発性肺腺癌

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第一講座 野村 将春)

Tel: 03-3342-6111 (内線 5070) Fax: 03-3349-0326

くつかの新しい知見により多くの研究者にインパクトを与えた⁷⁸⁾。それはこの突然変異が、我々日本人を含めた東アジア人種の、非喫煙者の女性の肺腺癌に高頻度で認められ、さらに突然変異のある肺癌患者には EGFR の Tyrosine kinase domain を標的にした阻害剤 (Tyrosine kinase inhibitors: TKIs) が非常に効果的であるという事実である。突然変異の存在と薬剤の有効性ととのメカニズムに関しては、これまでにいくつかの報告があるが⁹⁾¹⁰⁾、その一つとして EGFR 遺伝子変異は、EGFR の ATP 結合部位に構造変化を起こす結果、リガンドの刺激がなくても恒常的に活性化するようになり、細胞の悪性化に関わる一方で、ゲフィチニブへの親和性も高まり、癌細胞がアポトーシスを起こし、腫瘍縮小効果を示す事などが考えられている¹¹⁾。

大規模な臨床試験においても、阻害薬の一つであるゲフィチニブが、非喫煙者、女性、腺癌、東洋人に高い奏効率があることが明らかにされた¹²⁾¹³⁾。また、ゲフィチニブに効果のあった肺癌検体の解析により EGFR をコードする遺伝子のうち、エクソン 19 の LREA 領域の欠失とエクソン 21 コドン 858 の点突然変異 L858R の 2 つで全体の 85% を占めていた事なども報告されている¹⁴⁾。

しかし、EGFR 遺伝子に突然変異が認められてもゲフィチニブを含む TKIs の効果がない症例や、逆に突然変異がなくても効果のある症例がある。その原因として、以下の事柄が考えられている。それは、1) エクソン 20 に存在する点突然変異¹⁵⁾ 2) EGFR 遺伝子の増幅の有無 3) 癌細胞増殖に関わる EGFR 遺伝子以外の遺伝子の関与などである。EGFR の増幅と TKIs の効果に関しては Cappuzzo らが FISH (fluorescence in situ hybridization) を用い、EGFR 遺伝子の発現が強い症例ほど効果があると報告している¹⁶⁾。また Nomura らは、東アジア人種では EGFR の突然変異が 2 本鎖 DNA のうちで、より増幅している DNA 鎖により多く存在している事などを報告し¹⁷⁾、EGFR 遺伝子の突然変異と増幅が結びつくことにより腫瘍活性が高くなり、同時に TKIs による治療効果が期待できる可能性を示唆した。しかし、EGFR 以外の遺伝子の肺癌における関与については、既にいくつかの遺伝子の突然変異の報告がなされているが¹⁸⁾、それらすべてを併せても全肺癌の大よそ半数をカバーするに過ぎず、新たな遺伝子の発見が待望されている。

エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) は、乳癌におけるホルモン療法のターゲットとして研究さ

れてきた。ER には ER α と ER β という 2 種類の亜型が存在する。ER α の遺伝子は第 6 染色体短腕に、ER β の遺伝子は第 14 染色体の長腕にと別々に存在するが DNA 結合ドメインに高い相同性が認められ、同程度の親和性でエストロジオールと結合する。しかし、アミノ基末端領域の相同性は低く、リガンドの種類によって異なった生理作用を示すと考えられている。肺癌においてはいくつかの報告で、両方の ER が関与している可能性が示唆されている¹⁹⁾。Stabile らは、ER α と ER β が NSCLC の培養細胞や腫瘍組織、正常肺の細胞から発現していることを示し、17 β エストロジオールが NSCLC の発育の促進物質として作用することを明らかにした²⁰⁾。肺癌においても乳癌と同様に EGFR と ER が相互作用し、EGFR の過剰発現は ER の発現を抑制すること、またその逆の作用が報告されている²¹⁾²²⁾。また、ER の発現と生存期間に関する報告はあるが、コンセンサスは得られていない。EGFR と ER がお互いに影響しあう以上、これらの遺伝子を同時に検討する必要がある。今回、我々は特に肺腺癌患者において、これらの遺伝子の発現と相互関係、そして生存期間を含む臨床学的データに関して詳細な比較検討を行った。

研究材料及び方法

対象

2002 年～2004 年までの間に、東京医科大学病院で原発性肺腺癌と診断した症例の内、EGFR を測定しえた 82 例を対象とした。全例日本人、年齢は 41 歳から 81 歳、平均年齢 65 歳、男性 45 例、女性 37 例であった。全症例とも当院の倫理委員会で認められた承諾書が得られている。

DNA の抽出

Genra Puregene protocol (Genra Systems) を用いて各症例から DNA を抽出した。まず、組織を Cell Lysis Solution 中に入れ Proteinase K Solution を加えた上で (55°C、3 時間) インキュベートした。その後、細胞懸濁液に RNase A Solution を加え (37°C、30 分間) インキュベートした。試料を室温まで冷却、Protein Precipitation Solution を加え 20 秒間攪拌した後、14,000×g で 3 分間、遠心分離した。次に DNA を含む上清を 2-propanol と Glycogen Solution の中に加え、転倒混和した後、14,000×g で 1 分間、遠心分離した。上清を捨て 15 分間、風乾した。得られた DNA の濃度を ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technol-

ogies) を用いて A260 : A280 の比で計算し 1 ng/ μ l となるように DNA を調節した。

EGFR 遺伝子の突然変異の検出

EGFR 遺伝子変異のタイプと突然変異検出のための方法論については、既に発表されている方法に従った²³⁾。我々は、腫瘍組織の DNA を用いて、EGFR チロシンキナーゼ領域のエクソン 18-21 に対して PCR を施行した後、同部位のシーケンスを行った。

定量 PCR (qPCR)

蛍光色素として SYBR Green 用いて ABI 7000 PCR system (Applied Biosystems) にて定量 PCR (qPCR) を行った。反応系は、それぞれ cDNA 1 μ l、2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l、Water 10.5 μ l、適当な濃度の primer をあわせ全量 25 μ l で、それぞれ 2 穴ずつ準備した。反応は、MicroAmp Optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems) を用いた。反応条件は、stage 1 : 95°C 10 min を 1 サイクル、stage 2 : 95°C 15 sec と stage 3 : 60°C 1 min を 1 サイクルとして計 40 サイクル反応させて終了とした。生成物の量は ABI 7000 で連続的に計測した。primer に関しては以下のものを使用した。なお、内因性コントロールとしては β -actin を使用した。使用したプライマーは以下の通りである。

β -actin : 5'-AGTCCTGTGGCATCCACGAAACT-3' (forward)

5'-ACTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3' (reverse)

EGFR : 5'-ATGAACTACTTGGAGGACCGTC-3' (forward)

5'-TGCCTCCTTCTGCATGGTATTC-3' (reverse)

ER α : 5'-ATGGTCAGTGCCTTGTGGATGCT-3' (forward)

5'-TGATCATGTGAACCAGCTCCCTGT-3' (reverse)

ER β : 5'-TGGGCACCTTTCTCCTTTAGTGGT-3' (forward)

5'-TCTTGCTTACACCAGGGACTCTT-3' (reverse)

統計処理

EGFR 突然変異と臨床的事項の相関は、Chi-square test を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法で行い、有意差検定は log-rank test を用いた。なお、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結 果

EGFR 遺伝子の突然変異

全 82 例中、突然変異の全体の頻度は、43 例 (52%) であった。43 例中、エクソン 19 の欠失は 24 例 (56%)、とエクソン 21 コドン 858 の点突然変異 (L858R) は、19 例 (44%) であった。全例においてエクソン 20 の T790M は認められなかった。MT 群は女性、非喫煙者で有意に多かった ($p = 0.007$)。両群間で病期に差はみられなかった ($p = 0.66$) (Table 1)。

定量 PCR (qPCR)

定量 PCR で得られた各遺伝子の発現データは、同時に測定した β -actin の発現データで補正し、log 値で表わして比較した。EGFR 遺伝子の発現 (mean (SD)) は MT 群では 0.58 (1.34)、WT 群では -0.64 (0.98) であり、MT 群で有意に増加していた ($p < 0.001$)。ER α の発現は MT 群で 0.43 (1.03)、WT 群では 0.22 (0.93) であり、有意差は認められなかった ($p = 0.33$)。ER β の発現は、MT 群で 1.36 (0.99) WT 群で 0.85 (0.75) であり、two-sample t-test では有意差を認めた ($p = 0.01$)。しかし、多変量解析後には有意差は認めなかった ($p = 0.06$) (Table 2)。

WT 群では、EGFR と ER α の発現は正相関を示したが ($r = 0.68$)、MU 群ではその関係は認められなかった ($r = -0.02$) (Fig. 1A)。さらに、WT 群では EGFR と ER β の発現は逆相関を示したが ($r = -0.68$)、MU 群ではその関係は認められなかった

Table 1 Association between EGFR mutation and clinicopathological factors

	EGFR mutation		P*
	Positive (52.4%) (43 samples)	Negative (47.6%) (39 samples)	
Age			
<60	9	17	0.05
≥ 60	34	22	
Gender			
Male	17	28	0.007
Female	26	11	
Smoking			
No	26	11	0.007
Yes	17	28	
Stage			
I/II	29	29	0.66
III/IV	14	10	

*continuity adjusted chi-square test

Table 2 The expressions of EGFR, ER α and ER β by EGFR mutations

	EGFR mutation	Mean (SD)	p^*	p^{**}
Log (EGFR)	No	-0.64 (0.98)	<0.001	<0.001
	Yes	0.58 (1.34)		
Log (ER α)	No	0.22 (0.93)	0.33	0.33
	Yes	0.43 (1.03)		
Log (ER β)	No	0.85 (0.75)	0.01	0.06
	Yes	1.36 (0.99)		

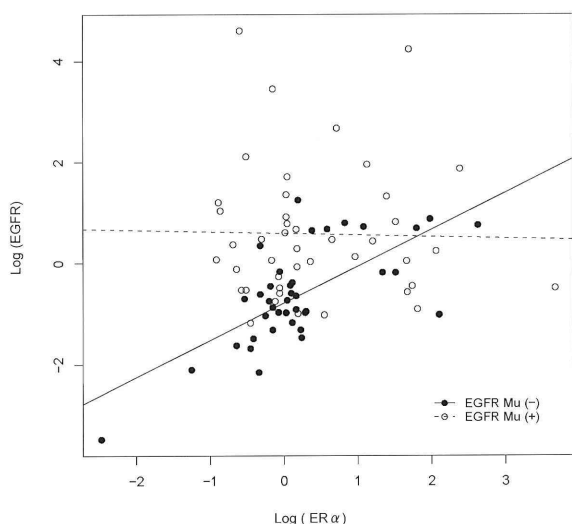


Fig. 1A The association between expression of EGFR and that of ER α depended on EGFR mutations. The slope of EGFR regressed on ER α on log scale was -0.02 (95% CI: -1.29 to 1.25) in positive EGFR mutations, but was 0.68 (0.31 to 1.05) in negative mutations after adjusting for age gender and smoking.

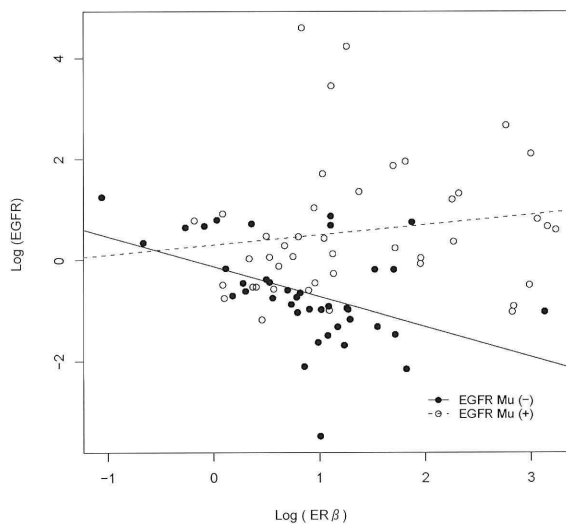


Fig. 1B The association between EGFR and ER β expressions also depended on EGFR mutations but was in opposite direction. The slope of EGFR regressed on ER β on log scale was 0.23 (95% CI: -0.10 to 0.56) in positive EGFR mutations, but was -0.68 (-1.15 to -0.21) in negative mutations after adjusting for age, gender and smoking.

($r=0.23$) (Fig. 1B)。

生存曲線

Kaplan-Meier 法を用いた生存曲線においては各遺伝子の発現は単独では影響を及ぼさなかった。しかし、EGFR の発現が低い症例群では高 ER β 発現群において有意に予後が悪い結果であった ($p=0.03$) (Fig. 2)。

考 察

これまで、乳癌において ER と EGFR の間に逆相関関係が報告されており、近年、肺癌においても同様の関係が確認されている。Stabile²²⁾、Levin²⁴⁾らは、EGFR の過剰発現は ER の発現を抑制すること、またその逆の作用などを報告している。肺癌においては、

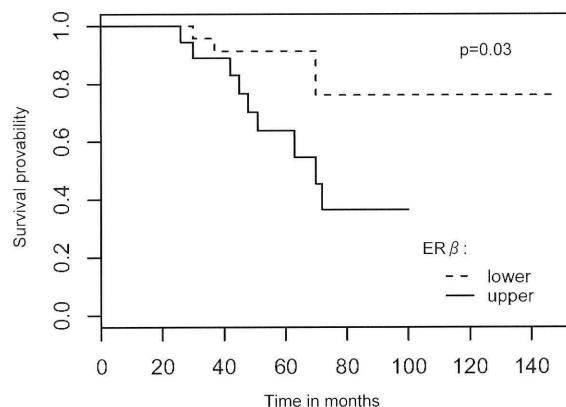


Fig. 2 The effect of ER β expression on survival was observed to be different in those with lower EGFR levels dichotomized by median value ($p=0.03$).

EGFR の突然変異の報告があるが、ER の突然変異の報告はなく、逆に乳癌では ER の突然変異は認められるが、EGFR の突然変異の報告はない。従って、肺癌において、ER と EGFR の関係を調べるには EGFR の突然変異は避ける事の出来ない事象である。

今回、我々は EGFR と ER の関係をより明確にする目的で、EGFR の突然変異のある肺腺癌患者とない肺腺癌患者をほぼ同数を作法的に選び出し検討した。我々が対象とした EGFR 遺伝子に突然変異のある群 (MU 群) では、女性及び非喫煙者が有意に多く、以前の報告と同様の結果であった¹²⁾¹³⁾。EGFR の発現は MU 群では WT 群に比較して有意に高かった。両群で ERs の発現を比較すると、ER α では両群間で差を認めないが、ER β では MU 群で高い傾向を示した。さらに、EGFR と ERs の相関関係を見ると WT 群では EGFR と ER β の間に逆相関がみられたのに対し、MU 群ではその関係はみられなかった。これまでに、肺癌のセルラインにおいて、EGFR と ER β との間に逆相関が認められている²²⁾。今回、我々は初めて臨床検体でその関係を確認した。但し、この関係は WT 群のみに限られていた。MU 群では逆に、ER β の発現が WT 群に比較してより高い傾向を示した。mutation により EGFR の発現が増加すれば、一般的には ER の発現が減少する事が予想される。しかし、その現象がみられなかったという事は、EGFR の mutation が存在する前から ER β の発現増加が存在していた可能性を示唆する。換言すれば、ER β の発現増加が EGFR の mutation の成因に関与している可能性が考えられる。この可能性に関しては、今後、培養細胞を用いた実験が期待される。

肺癌においては、以前から EGFR の突然変異の有無は予後に影響を及ぼさないことが報告されている²³⁾。ER に関して、Schwartz らは、ER β が発現している男性では有意に予後が悪く、男女全体では有意差がないと報告し²⁵⁾、逆に Kawai らは、性別にかかわらず、ER β の発現していない群では有意に予後が悪いと報告しており²⁶⁾、コンセンサスは得られていない。乳癌の領域では、ER α 陽性例のほうが、一般的に予後が良いと報告されている²⁷⁾²⁸⁾。ER β 陽性例は、タモキシフェンなどの抗エストロゲン剤に対する反応がよく、良好な予後が得られるとしている。しかし、EGFR のファミリーである Her2 が発現している症例では、予後が悪い事が報告されている²⁹⁾。今回の我々の検討では、EGFR 及び ER の発現自体は予後に関係してい

なかった。しかし、EGFR の発現がより低い群では ER β の発現の高い群で予後が悪化していた。これは、Kawai ら²⁶⁾の結果とは全く逆になるが、彼らの報告では腺癌以外の症例も含まれていること、EGFR 遺伝子の突然変異が考慮されていないこと、免疫組織化学的染色の結果だけで陽性、陰性を判定していることなどから、方法的な問題に起因するものと思われる。どちらかと言えば、我々の結果は、東アジア人種以外では EGFR の突然変異の頻度が低いことや、さらに男性では特に発現が低い症例が多く含まれている可能性などを考慮すると、Schwartz ら²⁵⁾の結果に近いものと考えられる。

EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるゲフィチニブを用いた臨床試験では、プラセボと比較し有意な生存期間の延長を示さない³⁰⁾ことが報告され、より適切な治療選択基準が求められている。今回の検討では、肺腺癌の患者で EGFR の発現の低い群では ER β が予後規定因子である可能性が示唆された。したがって、ER β は、肺腺癌患者を治療する上で、新たなターゲットになる可能性が考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究に関して、ご指導、ご協力をいただいた外科学第一講座の教員の方々へ心より感謝致します。

文 献

- 1) Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. *The lancet oncology* **2**: 533-543, 2001
- 2) Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH: Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **346**: 92-98, 2002
- 3) Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD: Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* **58**: 892-900, 2003
- 4) Normanno N, Maiello MR, De Luca A: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? *J Cell Physiol* **194**: 13-19, 2003
- 5) Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J, Dmitrovsky E: Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer research* **53**: 2379-2385, 1993
- 6) McClelland RA, Barrow D, Madden TA, Dutkows-

- ki CM, Pamment J, Knowlden JM, Gee JM, Nicholson RI: Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* **142**: 2776-2788, 2001
- 7) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**: 1497-1500, 2004
 - 8) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**: 2129-2139, 2004
 - 9) Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD: Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers? *Trends in molecular medicine* **10**: 481-486, 2004
 - 10) Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Ligorio C, Cancellieri A, Damiani S, Spreafico A, Paties CT, Lombardo L, Calandri C, Bellezza G, Tonato M, Crino L: Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1133-1141, 2004
 - 11) Choi SH, Mendrola JM, Lemmon MA: EGF-independent activation of cell-surface EGF receptors harboring mutations found in gefitinib-sensitive lung cancer. *Oncogene* **26**: 1567-1576, 2007
 - 12) Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J: Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* **21**: 2237-2246, 2003
 - 13) Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC: Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* **290**: 2149-2158, 2003
 - 14) Shigematsu H, Gazdar AF: Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *International journal of cancer* **118**: 257-262, 2006
 - 15) Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**: 786-792, 2005
 - 16) Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witt S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Varella-Garcia M: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **97**: 643-55, 2005
 - 17) Nomura M, Shigematsu H, Li L, Suzuki M, Takahashi T, Estess P, Siegelman M, Feng Z, Kato H, Marchetti A, Shay JW, Spitz MR, Wistuba II, Minna JD, Gazdar AF: Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers. *PLoS Med* **4**: e125, 2007
 - 18) Gazdar AF, Minna JD: Inhibition of EGFR signaling: all mutations are not created equal. *PLoS Med* **2**: e377, 2005
 - 19) Patel JD, Bach PB, Kris MG: Lung cancer in US women: a contemporary epidemic. *JAMA* **291**: 1763-1768, 2004
 - 20) Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM: Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer research* **62**: 2141-2150, 2002
 - 21) Yarden RI, Wilson MA, Chrysogelos SA: Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth. *Journal of cellular biochemistry Suppl* **36**: 232-246, 2001
 - 22) Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, Zhang W, Grandis JR, Siegfried JM: Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects. *Cancer research* **65**: 1459-1470, 2005
 - 23) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **97**: 339-346, 2005
 - 24) Levin ER: Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Molecular endocrinology* **17**: 309-317, 2003
 - 25) Schwartz AG, Prysak GM, Murphy V, Lonardo F, Pass H, Schwartz J, Brooks S: Nuclear estrogen

- receptor beta in lung cancer: expression and survival differences by sex. *Clin Cancer Res* **11**: 7280–7287, 2005
- 26) Kawai H, Ishii A, Washiya K, Konno T, Kon H, Yamaya C, Ono I, Minamiya Y, Ogawa J: Estrogen receptor alpha and beta are prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 5084–5089, 2005
- 27) Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, 3rd, McGuire WL: The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* **46**: 2884–2888, 1980
- 28) Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N: Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer research* **47**: 6126–6133, 1987
- 29) Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M: c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* **330**: 1260–1266, 1994
- 30) Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V, Carroll K: Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* **366**: 1527–1537, 2005

Epidermal growth factor receptor and Estrogen receptor β in lung adenocarcinoma

Hidehiro INADA, Masaharu NOMURA, Yuka KUWAJIMA,
Yoshinori SAKATA, Kimitoshi NAWA, Junichi MAEDA,
Kuniharu MIYAJIMA, Tatsuo OHIRA, Masahiro TSUBOI,
Takashi HIRANO, Harubumi KATO

First Department of Surgery, Tokyo Medical University

Abstract

We investigated the relationship between three genes, (ER α , ER β and EGFR) and with clinical data, including overall survival in the patients with primary lung adenocarcinoma with or without EGFR mutations. We sequenced exon 18–21 of the EGFR gene from DNA isolated from 82 resected lung adenocarcinoma samples to detect EGFR mutations. The number of the patients with EGFR mutations was 43 (52%). Real-time quantitative PCR was carried out to detect expression of the three genes. EGFR expression increased significantly in positive EGFR mutations ($p < 0.001$). ER β expression had a tendency to be more amplified in patients with major EGFR mutations than those without mutations ($p = 0.06$). There was a negative correlation between the amplification of the ER β gene and that of the EGFR gene in the patients without mutations ($r = -0.68$). The intensity of amplification of ER β gene in patients with lower EGFR subjects was associated with a poor overall survival ($p = 0.03$). These findings suggest that ER β may become another target of the strategy of lung cancer treatment, especially in patients with lower expression of EGFR.

<Key words> Epidermal growth factor receptor (EGFR), Estrogen receptor (ER), Gene mutation, Primary lung adenocarcinoma
