

令和元年5月29日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09590

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患(COPD)合併肺癌における発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigate the role of TNF and EGFR in the onset and progression of lung cancer complicated with COPD

研究代表者

山岡 利光 (Yamaoka, Toshimitsu)

昭和大学・先端がん治療研究所・准教授

研究者番号：40384359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体EGFRが腫瘍壊死因子(TNF)による細胞・組織障害から保護している事を見いだした。本研究は、肺組織に特異的にTNFを高発現し慢性閉塞性肺疾患(COPD)様の病理所見を示すSPC-TNFマウスに生来EGFR発現が低下しているEgfr^{vel}マウスを交配する事で作製された新規肺障害モデルマウスTNF-Egfr^{vel}マウスに対し、ニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン(NNK)投与による肺癌を発生させる事で、COPD合併肺癌における慢性炎症の果たす役割を分子生物学的に解明ヒトCOPD合併肺癌に臨床展開し、COPD合併肺癌患者群の特性を明らかにする事を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は、癌による死因の第1位であり、この難治性癌の新たな治療戦略の確立が急務である。慢性閉塞性肺疾患(COPD)は喫煙とは独立した肺癌の危険因子であり、喫煙とCOPDに伴う様々な分子が肺における発癌を促している事が示唆されているが、いまだ具体的なメカニズムは解明されていない。本研究計画によってCOPD合併肺癌の基礎から臨床展開までの一貫した研究基盤を確立できると考える。この領域の研究成果は、COPDの死因として高い比率を閉める肺癌の予防策につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Smoking in many cases can inevitably lead to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the risk increases if tobacco is smoked continuously for 40 years at 20 cigarettes/day, which is a common level in regular smokers. COPD and tobacco smoke are independent risk factors for lung cancer, however, the mechanisms of carcinogenesis of the lung involving tobacco smoke or COPD are not clear. In this research we would like to provide some progress on understanding areas such as novel mutations or cytokine production in these fields. I would like to find some novel mutations or alterations of cytokines, which might induce lung cancer in this model mouse research and eventually if possible, it would be useful to confirm human tissue samples from those suffering lung cancer combined with COPD. Understanding the carcinogen pathway would then enable us to develop intervention treatment to either prevent or reduce the risks of COPD combined lung cancer in the future.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 上皮成長因子受容体 腫瘍壊死因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、増殖因子受容体である EGFR と ErbB2 が炎症性サイトカインで強力なアポトーシス誘導能を有する腫瘍壊死因子 (TNF) から間接的に活性化 (トランス活性化) を受けることにより上皮細胞と組織を TNF により誘導されるアポトーシスから保護していること、そして EGFR の下流の AKT 活性化が、細胞の生存 (アポトーシス回避) に寄与することを報告した (Yamaoka et al. PNAS 2008)。EGFR は、その過剰発現や過剰な活性化が発癌との関連が報告され、多く癌種で治療標的とされている。しかしながら、正常組織においては、炎症などによる組織損傷から細胞を保護し再生させる役割を担っていると考えられる。

申請者らは、肺組織特異的に TNF を高発現し慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 様の病理所見を示す SPC-TNF トランスジェニックマウス (以下、SPC-TNF マウス) (Miyazaki et al J Clin Invest. 1995) に生来 EGFR の発現が低下している *Egfr^{vel}* マウスを交配させることにより、肺組織で TNF が高発現し、かつ EGFR の発現が抑制された新規肺障害モデルマウス (TNF-*Egfr^{vel}* マウス) を作製した。このマウスは、SPC-TNF マウスで観察される COPD 様病理所見である肺胞隔壁の破壊と末梢気道壁の肥厚に加えて、肺胞中隔への著しいリンパ球やマクロファージの浸潤を認めた。慢性炎症の持続は癌の発生との関連が報告されているが、この新規肺障害モデルマウス (TNF-*Egfr^{vel}* マウス) では、腫瘍の発生は観察されなかった。

喫煙でも誘導される炎症性サイトカインである TNF は、タンパク質を分解する酵素のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を異常に活性化することで肺胞壁を破壊し慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を発症させる中心的な役割を担っている。

また、喫煙は、肺癌の発症と密接な関連が報告されている。日本人を対象とした統計では肺癌患者の約 40% に COPD の合併が報告されている。しかし、COPD 患者で、どのように肺癌が発症し進展しているかは解明されていない。タバコ成分のうちマウスに肺癌を発症させる物質に、ニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) がある。マウスの腹腔内に投与した後、NNK は 2-4 ヶ月程度で肺癌を発症させる事が報告されている。しかし、この発癌の機序は、十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、喫煙と密接に関連する COPD 合併肺癌の発症や進展に果たす TNF や EGFR の役割を、肺組織特異的に TNF を高発現し COPD 様病理所見を示す SPC-TNF マウスや新規肺障害モデルマウスである TNF-*Egfr^{vel}* マウスに、NNK を腹腔内に投与することで COPD 合併肺癌マウスモデルを作成し検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

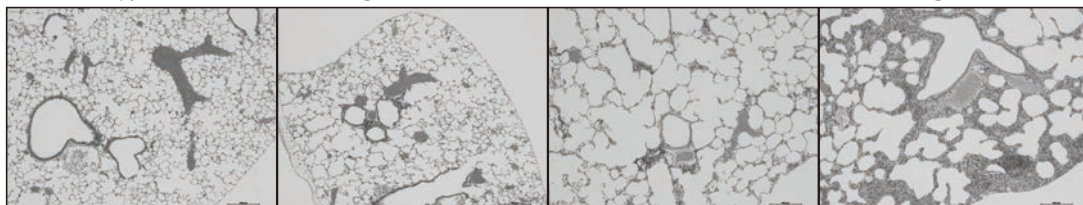
(1) COPD 様病理所見を有する SPC-TNF マウスと EGFR 発現の生来低下した *Egfr^{vel}* マウスを交配する事で、両者の形質を有する新規肺障害モデルマウス TNF-*Egfr^{vel}* を作製した。これらのマウスに対しニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) 投与による肺癌を発症させる事で、COPD 合併肺癌における慢性炎症の果たす役割を明らかにする。

(2) COPD 合併肺癌は、COPD 患者の死因として高い比率を占める。申請者ら腫瘍分子生物学研究所が中心となり、呼吸器内科、呼吸器外科、腫瘍内科、臨床病理診断科とともに「肺癌診療における残余検体と診療情報の収集と保管システム」を整備した。このシステムにより、同意が得られた肺癌患者から採取された残余検体の 2 次利用が可能となった。上記、(1) により得られた前臨床的情報を臨床展開し、COPD 合併肺癌患者群の特性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF) を肺組織特異的に発現する遺伝子改変マウスである SPC-TNF トランスジェニックマウス (以下、SPC-TNF マウス) は、1995 年に、肺線維症の疾患病態の解析を目的に作成、報告された。生来、肺組織特異的に TNF を高発現するこのマウスは肺組織に COPD 様の変化を生じる。我々は、これまでに、この SPC-TNF マウスに EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) を経口投与することで、肺組織 (間質) に著しいリンパ球の浸潤を認めた。このことから上皮成長因子である EGFR は、炎症性サイトカインである TNF に誘導される肺障害から肺組織を保護する役割があることが示唆された。しかし、この EGFR-TKI による肺障害の増悪の機序として、この実験系において使用された EGFR-TKI による特異的作用であることを否定することは困難である。そこで生来 EGFR の発現や活性が低下した

Fig.1 マウス肺組織の H-E 染色
wild type マウス *Egfr^{vel}* マウス SPC-TNF マウス TNF-*Egfr^{vel}* マウス



x100

マウスである *Egfr^{vel}* マウスを SPC-TNF マウスと交配することで、肺組織特異的に TNF を高発現し、かつ EGFR 発現や活性が低下した TNF-*Egfr^{vel}* マウスを作製した。この TNF-*Egfr^{vel}* マウスの肺組織は、*Egfr^{vel}* マウスや SPC-TNF マウスと比較して間質への著しいリンパ球の浸潤と間質の肥厚が観察された (Fig. 1)。しかし、肺腫瘍の存在は確認されなかった。

(2) 次に実験計画に従い、TNF-*Egfr^{vel}* マウスに対しニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) を腹腔内投与し肺腫瘍の発生を観察した。しかしながら、この TNF-*Egfr^{vel}* マウスモデルの肺組織をニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) 投与後、1 か月、3 か月、6 か月、12 か月と継時的に肺組織を採取し組織学的に検討するも腫瘍の発生を確認できなかった。

(3) ニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) によるマウス肺組織の化学発がんに関しては、マウスの系統により発がんに差があるとの報告もある。そこで計画書の研究が計画通りに遂行されない時の代替策として記載されていた方法である AJ マウス系統でのニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) 発がんを試みることにした。SPC-TNF マウスが、C57BL/6J マウス系統であり、この C57BL 系統のために TNF-*Egfr^{vel}* マウスにニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) の投与により肺組織にがんの発生が確認されなかったと推察した。そこで、A/J マウスと SPC-TNF マウスを、約 10 世代の戻し交配することで、C57BL 系統から A/J マウス系統の SPC-TNF マウスを作製した。さらに、この A/J マウス系統の SPC-TNF マウスと *Egfr^{vel}* マウスを交配させ、A/J マウス系統の TNF-*Egfr^{vel}* マウスを作製した。この A/J マウス系統の TNF-*Egfr^{vel}* マウスにニコチン由来タバコ特異的ニトロソアミン (NNK) を腹腔内投与することで肺組織での発がんを観察した。これらの一連の作業に時間を要し現在、肺組織の発がんを継時的に観察している。

(4) 「肺癌診療における残余検体と診療情報の収集と保管システム」に登録された COPD 合併肺癌症例を抽出した。現在、この「肺癌診療における残余検体と診療情報の収集と保管システム」に登録されている症例数は、250 例である。このうち COPD 合併肺癌症例は、105 例が確認された。この患者群と非 COPD 合併肺癌症例の、145 例を用いて、上記のマウスを用いた検討から得られた成果を、今後、検証する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nakatani K, Yamaoka T, Ohba M, Fujita KI, Arata S, Kusumoto S, Taki-Takemoto I, Kamei D, Iwai S, Tsurutani J, Ohmori T. KRAS and EGFR amplifications mediate resistance to rociletinib and osimertinib in acquired afatinib-resistant NSCLC harboring exon 19 deletion/T790M in EGFR. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(1):112-126. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0591.
- ② Yamaoka T, Ohba M, Arata S, Ohmori T. Establish the dual resistant cells to EGFR-TKI and MET-TKI in lung adenocarcinoma PC-9 cells with 2-step of dose-escalating in vitro. *J Vis Exp.* 2017
- ③ Ando K, Miyata Y, Hirai Y, Mizuma H, Yamaguchi M, Murata Y, Homma T, Ohta S, Yamamoto M, Kusumoto S, Yamaoka T, Tanaka A, Yokoe T, Ohnishi T, Ohmori T, Inoue S, Sagara H. A comparison of adverse effect of two anti-IL-5 therapies in adults with uncontrolled asthma: a network meta-analysis of phase 3 trials. *The Showa University Journal of Medical Sciences* Vol. 29 (2017) No. 4
- ④ Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Murata Y, Kusumoto S, Ando K, Ishida H, Ohnishi T, Sasaki Y. Distinct Afatinib Resistance Mechanisms Identified in Lung Adenocarcinoma Harboring an EGFR Mutation. *Mol Cancer Res.* 2017 Jul;15(7):915-928.
- ⑤ Ando K, Murata M, Kusumoto S, Yamaoka T, Tanaka A, Yokoe T, Okuda K, Ohnishi T, Inoue S, Ohmori T, Sagara H. Comparing the Adverse Event Profiles of Nivolumab and Docetaxel in Previously-treated or Refractory Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis of Two Phase 3 Trials. *The Showa University Journal of Medical Sciences* Vol. 29 (2017) No. 1 p. 69-77
- ⑥ Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Kishino Y, Murata Y, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Hirose T, Ohnishi T, Sasaki Y. Acquired Resistance Mechanisms to Combination Met-TKI/EGFR-TKI Exposure in Met-Amplified EGFR-TKI-Resistant Lung Adenocarcinoma Harboring an Activating EGFR Mutation. *Mol Cancer Ther.* 2016 Dec;15(12):3040-3054.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 山岡利光, 楠本壮二郎, 安藤浩一, 石田博雄, 大西司, 相良博典, 大森亨. T790M-EGFR によりアフチニブ耐性をきたした肺腺癌細胞株におけるロシレチニブ耐性機序の検討. 第 59 回日本肺癌学会学術集会 (2018. 11: 東京)
- ② 山岡利光, 中谷香織, 大場基, 藤田健一, 岩井信市, 大森亨. EGFR-T790M を発現した肺腺癌細胞における第 3 世代 EGFR-TKI, ロシレチニブの獲得耐性機序の検討. 第 76 回日本癌学会総会 (2018. 9: 大阪)

- ③ 伊東 里紗, 鈴木 俊宏, 山岡 利光, 大森 亨, 西尾 和人, 小笠原 裕樹. 3次元培養法を用いたキナーゼ阻害剤の感受性評価. 第76回日本癌学会総会 (2018.9: 大阪)
- ④ Kaori Nakatani, Toshimitsu Yamaoka, Tohru Omori, Iori Taki, Daisuke Kamei, Kenichi Fujita, Shinichi Iwai, Yasutsuna Sasaki. Acquired Resistance Mechanisms of Third Generation EGFR-TKI in Acquired Afatinib Resistance Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M by Exposing Afatinib. 18th world Congress of Basic and Clinical Pharmacology. (2018.7.1 Kyoto) Abstract P04-6-22
- ⑤ 中谷香織, 山岡利光, 大森亨, 大場基, 藤田健一, 滝伊織, 亀井大輔, 岩井信市, 佐々木康綱. EGFR T790M 発現肺腺癌細胞株を用いた第3世代EGFR-TKI 耐性細胞の樹立とその機序の検討. 第138回日本薬学会 (2018.3: 金沢)
- ⑥ 伊東 里紗, 鈴木 俊宏, 山岡 利光, 大森 亨, 西尾 和人, 小笠原 裕樹. 3次元培養法を用いた抗がん剤に対する薬剤耐性の評価. 生命科学系学会合同年次大会. (2017.12: 神戸)
- ⑦ 山岡 利光, 大場 基, 荒田 悟, 大森 亨. EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌細胞株 PC-9 における afatinib 獲得耐性機序の検討. 第58回日本肺癌学会学術集会 (2017.10: 横浜)
- ⑧ 山岡 利光, 大場 基, 荒田 悟, 大森 亨. 肺腺癌細胞株 PC-9 におけるアファチニブ獲得耐性機序. 第75回日本癌学会総会 (2017.9: 横浜)
- ⑨ 大場 基, 外谷 衣都子, 荒田 悟, 山岡 利光, 入江 一浩, 佐々木 康綱. 10-methyl-aplog-1 は、HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果を増強する. 第75回日本癌学会総会 (2017.9: 横浜)
- ⑩ Toshihiro Suzuki, Risa Ito, Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, Kazuto Nishio and Yuki Ogasawara. Tyrosine kinase inhibitor resistance were decreased in spheroid culture platform. AACR 108th Annual Meeting 2017. (2017.4. Washington, DC) Abstract 4098
- ⑪ 山岡 利光, 大森 亨, 大場 基, 村田 泰規, 大木 康成, 楠本 壮二郎, 大西 司, 相良 博典. EGFR-Mutation を伴う肺腺癌細胞株における EGFR-TKI と MET-TKI への獲得耐性機序. 第57回日本呼吸器学会学術講演会 (2017.04: 東京)
- ⑫ 山岡 利光, 大森 亨, 大場 基, 荒田 悟, 岸野 康成, 村田 泰規, 岸野 康成, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 大西 司, 佐々木 康綱. EGFR-Mutation を伴う肺腺癌細胞株における EGFR-TKI と MET-TKI への獲得耐性機序の検討. 第75回日本癌学会総会 (2016.10: 横浜)
- ⑬ 大森 亨, 山岡 利光, 大場 基, 荒田 悟, 村田 泰規, 岸野 康成, 楠本 壮二郎, 廣瀬 敬, 大西 司, 西尾 和人. EGFR-TKI 耐性ヒト非小細胞肺癌に対する新規 IGF リガンド抗体 BI836845 と afatinib の併用効果. 第75回日本癌学会総会 (2016.10: 横浜)
- ⑭ 山岡 利光, 大森 亨, 大場 基, 村田 泰規, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 佐々木 康綱. Mechanism underlying acquisition of dual resistance to EGFR and MET inhibitors by EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会 (2016.07: 神戸)
- ⑮ Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, Motoi Ohba, Yasunori Murata, Yasunari Kishino, Sojiro Kusumoto, Hiroo Ishida, Tsukasa Ohnishi and Yasutsuna Sasaki. Mechanism underlying acquisition of dual resistance to EGFR and MET inhibitors by EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. AACR 107th Annual Meeting 2016. (2016.4. New Orleans, LA) Abstract 2018
- ⑯ Tohru Ohmori, Toshimitsu Yamaoka, Satoru Arata, Motoi Ohba, Yasunori Murata, Yasunari Kishino, Sojiro Kusumoto, Masanao Nakashima, Takashi Hirose, Tsukasa Ohnishi and Kazuto Nishio. Combination effect of afatinib and BI836845, a humanized IGF ligand-neutralizing antibody, on EGFR-TKI-resistant NSCLC cells. AACR 107th Annual Meeting 2016. (2016.4. New Orleans, LA) Abstract 1208
- ⑰ Toshihiro Suzuki, Ikuko Nagasawa, Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, Kazuto Nishio, Kiyotaka Koyama and Yuki Ogasawara. The effect of kinase signaling for miR-205 regulation in gefitinib-resistant lung cancer cell lines. AACR 107th Annual Meeting 2016. (2016.4. New Orleans, LA) Abstract 1893
- ⑱ 岸野 康成, 村田 泰規, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 白井 崇生, 濱田 和幸, 山岡 利光, 片岡 大輔, 山本 滋, 大西 司, 大森 亨, 佐々木 康綱, 門倉 光隆, 相良 博典. 肺癌患者における COPD の有無による合併症, 併存症の比較検討. 第56回日本呼吸器学会学術講演会 (2016.04: 京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 康綱
ローマ字氏名：Sasaki Yasutsuna
所属研究機関名：昭和大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：20235279

研究分担者氏名：大森 亨
ローマ字氏名：Ohmori Tohru
所属研究機関名：昭和大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10276529

研究分担者氏名：荒田 悟
ローマ字氏名：Arata Satoru
所属研究機関名：昭和大学
部局名：遺伝子組換え実験室
職名：准教授
研究者番号（8桁）：20159502

研究分担者氏名：中畷 賢尚
ローマ字氏名：Nakashinma Masanao
所属研究機関名：昭和大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：90365768

研究分担者氏名：楠本 壮二郎
ローマ字氏名：Kusumoto Sojiro

所属研究機関名：昭和大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：30465091

研究分担者氏名：本間 まゆみ

ローマ字氏名：Homma Mayumi

所属研究機関名：昭和大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：20527171

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。