

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09606

研究課題名(和文) 肺癌におけるMet遺伝子を標的とした個別化療法の確立

研究課題名(英文) Personalized therapy targeting Met gene in lung cancer

研究代表者

笠原 寿郎 (Kasahara, Kazuo)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30272967

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)：我々は、非小細胞肺癌細胞株を用いてcMet発現、リン酸化を検討したところ、5細胞我々は、非小細胞肺癌細胞株を用いてcMet発現、リン酸化を検討したところ、5細胞株で高発現、リン酸化亢進を認め、他の5種類では発現は弱くリン酸化も低かった。HGFを添加したところMet高発現細胞株でリン酸化亢進が認められたが、短時間で消失した。Met阻害剤の効果はMet発現とリン酸化状態に相関した。HGF刺激の元で下流シグナルを解析すると、HGF刺激で29遺伝子が発現増加し、138遺伝子は低下した。現在までに非小細胞肺癌の腫瘍検体と臨床情報を集積したが、今回の研究ではcMetと予後との関連は明らかにはならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、非小細胞肺癌細胞株を用いてcMet発現、リン酸化を検討したところ、5細胞我々は、非小細胞肺癌細胞株を用いてcMet発現、リン酸化を検討したところ、5細胞株で高発現、リン酸化亢進を認め、他の5種類では発現は弱くリン酸化も低かった。HGFを添加したところMet高発現細胞株でリン酸化亢進が認められたが、短時間で消失した。Met阻害剤の効果はMet発現とリン酸化状態に相関した。HGF刺激の元で下流シグナルを解析すると、HGF刺激で29遺伝子が発現増加し、138遺伝子は低下した。現在までに非小細胞肺癌の腫瘍検体と臨床情報を集積したが、今回の研究ではcMetと予後との関連は明らかにはならなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined cMet expression and phosphorylation in non-small cell lung cancer cell lines, and 5 cell lines had higher expression and enhanced phosphorylation of cMet. In the other five types, expression was weak and phosphorylation was low. When HGF was added, phosphorylation was enhanced in the Met-highly expressing cell line, but it disappeared in a short time. The effect of Met inhibitor was correlated with Met expression and phosphorylation status. Analysis of the downstream signals under HGF stimulation revealed that HGF stimulation increased the expression of 29 genes and decreased 138 genes. To date, we have collected tumor samples and clinical information for non-small cell lung cancer, but this study did not reveal a relationship between cMet and prognosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：cMet 非小細胞肺癌 個別化療法

## 1、 研究開始当初の背景

肺癌薬物療法は分子標的が同定され、細分化されてきた。我々は増殖因子受容体であり、かつ EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤の耐性因子として重要な cMet に注目してきた。我々はこれまでに cMet が DNA 複製に必要でイリノテカンの標的である DNA トポイソメラーゼ I (Topo-I) は発現と関連しており、Topo-I は cMet により調節されていることを報告した

( Sakai A, et al JTO 2012 9, 1337-1344 図

1, )

さらに小細胞肺癌症例の臨床検体を用いた解析では、cMet 高発現は予後不良因子と同定された(図 2)。

上記のごとく Met 発現は非小細胞肺癌においても Topo-I 発現に影響していることが予測され、また重要な予後因子と推測される。しかしながら我々の知見は限られた細胞株の中でのものであり、また小細胞肺癌に限局されたものである。我々はこの問題を解決するために本研究を計画した。

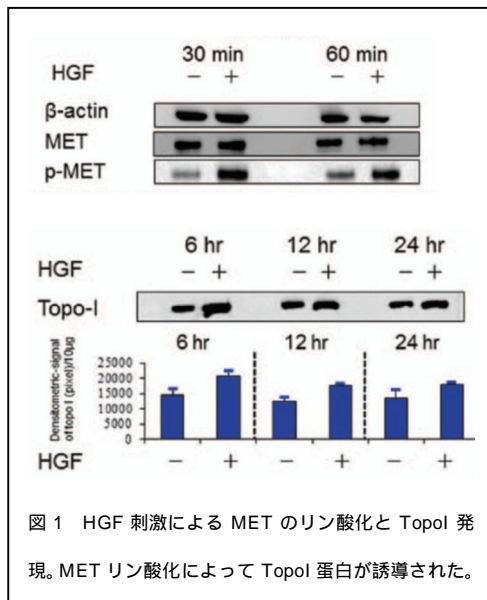


図 1 HGF 刺激による MET のリン酸化と Topo-I 発現。MET リン酸化によって Topo-I 蛋白が誘導された。

## 2、 研究の目的

我々は Met が非小細胞肺癌において重要な役割を果たしていると仮説し、その下流シグナルの解析、とくに Topo-I の調節機構と臨床上の意義について検討することを目的とした。1 検討 1：細胞株を用いて遺伝子増幅細胞株と遺伝子変異株等の細胞株が Met 刺激・抑制でリン酸化等の異常が生じていないかを明らかにする。

検討 2：臨床検体を用いて Met 遺伝子増幅と変異・蛋白発現を解析し、臨床上的特徴を明らかにする。

## 3、 研究の方法

非小細胞肺癌株 9 種類を用いて解析した。

cMet および Topo-I 蛋白発現は Western blot 法を用いて行った。

上記の細胞株から PC-9 と A549 を選び HGF による cMet の刺激、Met 阻害剤である SU11274 による Met 阻害を行いマイクロアレイをもついた pathway 解析を行うことで下流シグナルの変化を解析した。

臨床検体における Met 発現状況免疫染色および遺伝子増幅を fluorescence in situ

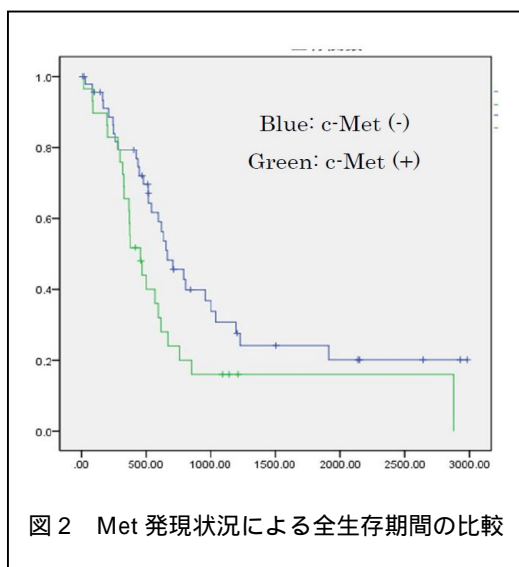
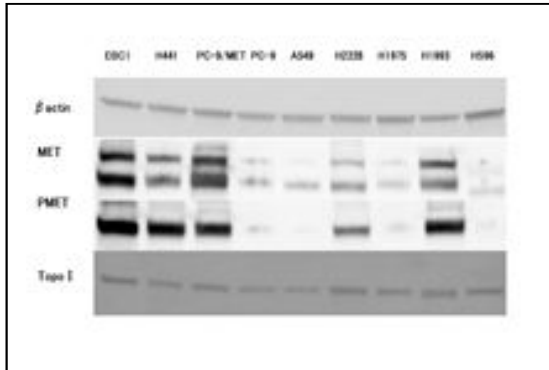


図 2 Met 発現状況による全生存期間の比較

hybridization(FISH)法で検討し、Topol との関連解析した。

#### 4、 研究成果

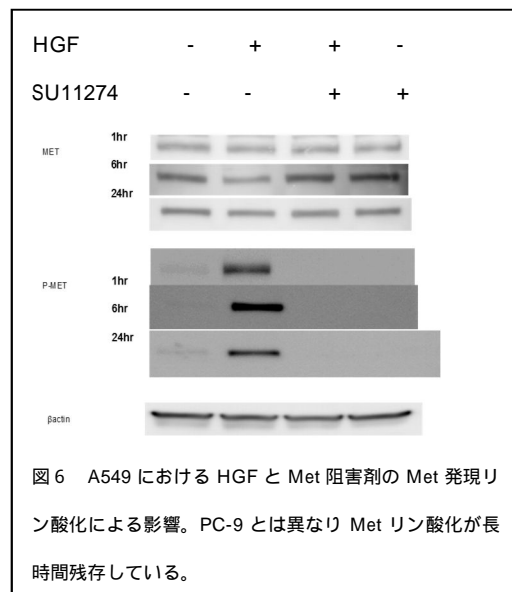
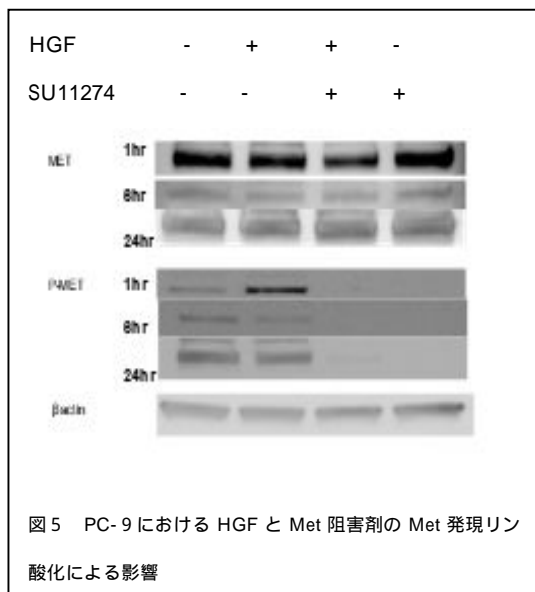


cMet、リン酸化 Met、Topol の発現状況を図 1、2 に示す。Met は EBC-1, H441, PC-9/Met、H2228、H1993 で高発現を示した。PC-9、A549、H1975、H596 では発現は低かった。Topol の発現は EBC-1、H441、H2228、H1993 で高かった(図 3)。

Met と Topol の発現の相関を検討したところ、正の相関がみられた。

HGF 刺激による Met 発現とリン酸化

PC-9 と A549 において HGF 刺激と Met 阻害剤の影響を検討した(図 5, 6)。興味深いことに

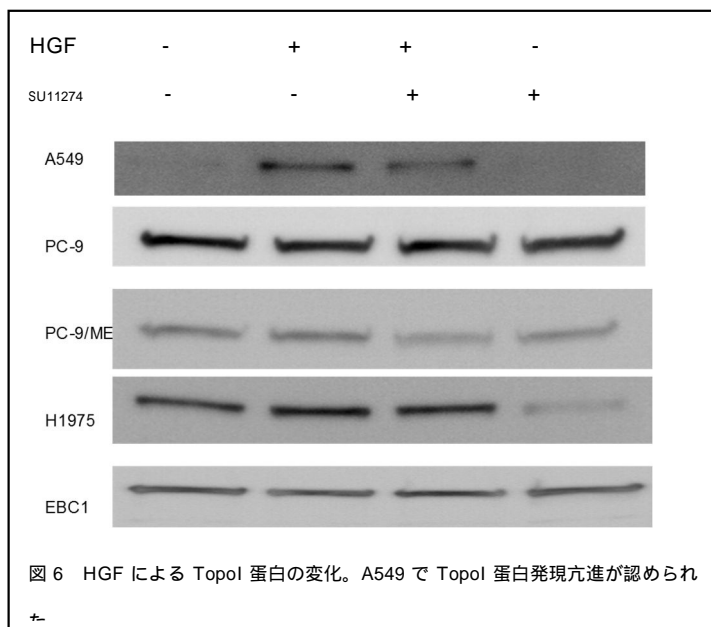


同様に cMet 高発現のある細胞においても PC-9 では HGF 刺激によるリン酸化は持続しなかったが、A549 においては 24 時間の時点でも Met リン酸化は持続して見られた。同様の現象は EBC-1 や H2228(いずれも Met 高発現株)においても認められなかった。

これらの細胞株における Met 刺激による

Topol の発現を解析したところ Met リン酸化が長時間持続している A549 においてのみ Topol 蛋白発現が亢進していることが明らかとなった(図 7)。

A549 細胞を用いて Met の legand である HGF および Met 阻害剤の SU 11274 で暴露し、下流シグナルを検討した。A549 細胞では Met のリン酸化が HGF 刺激により誘導され、SU11274

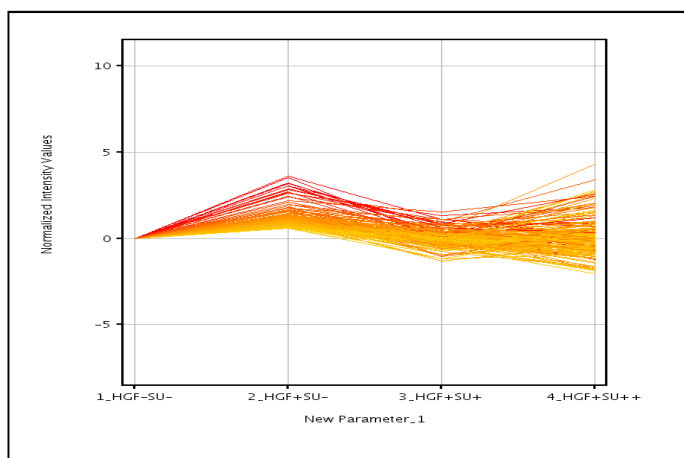


により抑制された(図5)。またTopoI蛋白も同様にHGFにより誘導されて、Su11274により抑制された。この際の遺伝子発現をマイクロアレイで解析したところ158遺伝子と29遺伝子がそれぞれ有意な上昇、低下を示した。

NSCLC臨床検体を用いてMet遺伝子、蛋白発現および増幅を解析した。78例を集積したが、56例でFISHによるMet遺伝子増幅が解析可能であった。解析可能であった56

例中11例でMet/CEP7-4の遺伝子増幅が観察された(図7)。患者背景には増幅の有無では有意な差は見られず(表1)、全生存期間にも差は無かった。

考察と結論として、本研究から増殖因子受容体cMetがTopoIの発現を調節している可能性が強く示唆された。臨床検体を用いた解



析ではMetと予後との関連が認められず、小細胞肺癌と異なった結果となった。本研究のリミテーションとして、少数例しか解析できなかったこと、検査(遺伝子増幅、免疫染色)が妥当ではなかった可能性がある。今後症例数の増加と検査の改善が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Satoshi, Saeki Keigo, Waseda Yuko, Murata Akari, Takato Hazuki, Ichikawa Yukari, Yasui Masahide, Kimura Hideharu, Hamaguchi Yasuhito, Matsushita Takashi, Yamada Kazunori, Kawano Mitsuhiro, Furuichi Kengo, Wada Takashi, Kasahara Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Lung cancer in connective tissue disease-associated interstitial lung disease: clinical features and impact on outcomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 799 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2017.12.134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Tamami, Hara Johsuke, Yamamura Kenta, Okazaki Akihito, Ohkura Noriyuki, Sone Takashi, Kimura Hideharu, Abo Miki, Yoshimura Kenichi, Fujimura Masaki, Kasahara Kazuo, Nakao Shinji	4. 巻 44
2. 論文標題 Role of prostaglandin I2 in the bronchoconstriction-triggered cough response in guinea pigs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Lung Research	6. 最初と最後の頁 455 ~ 463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01902148.2019.1590883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Araya T, Kita T, Ueda T, Terada N, Sakai T, Yamamura K, Kurokawa K, Uchida Y, Sone T, Kimura H, Kasahara K	4. 巻 Mar
2. 論文標題 Real-World Evidence of Safety and Efficacy of Carboplatin plus Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and Preexisting Interstitial Lung Disease: A Retrospective Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Canadian Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5315903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murata Akari, Watanabe Satoshi, Ikawa Yuka, Saeki Keigo, Yamamura Kenta, Matsuoka Hiroki, Tanimura Kota, Tambo Yuichi, Kasahara Kazuo	4. 巻 46
2. 論文標題 Remission of psoriasis with nintedanib for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e118 ~ e119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14641	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Satoshi, Saeki Keigo, Waseda Yuko, Murata Akari, Takato Hazuki, Ichikawa Yukari, Yasui Masahide, Kimura Hideharu, Hamaguchi Yasuhito, Matsushita Takashi, Yamada Kazunori, Kawano Mitsuhiro, Furuichi Kengo, Wada Takashi, Kasahara Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Lung cancer in connective tissue disease-associated interstitial lung disease: clinical features and impact on outcomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Thorac. Dis	6. 最初と最後の頁 799 ~ 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2017.12.134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ariyasu Ryo, Nishikawa Shingo, Uchibori Ken, Oh-hara Tomoko, Yoshizawa Takahiro, Dotsu Yosuke, Koyama Junji, Saiki Masafumi, Sonoda Tomoaki, Kitazono Satoru, Yanagitani Noriko, Horiike Atsushi, Inase Naohiko, Kasahara Kazuo, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 117
2. 論文標題 High ratio of T790M to EGFR activating mutations correlate with the osimertinib response in non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2017.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okazaki Akihito, Hara Johsuke, Ohkura Noriyuki, Fujimura Masaki, Sakai Tamami, Abo Miki, Katayama Nobuyuki, Kasahara Kazuo, Nakao Shinji	4. 巻 48
2. 論文標題 Role of prostaglandin E 2 in bronchoconstriction-triggered cough response in guinea pigs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pulm Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pupt.2017.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Nishikawa, Hideharu Kimura, Hayato Koba, Taro Yoneda, Satoshi Watanabe, Tamami Sakai, Johsuke Hara, Takashi Sone, Kazuo Kasahara, Shinji Nakao	4. 巻 10
2. 論文標題 Selective gene amplification to detect the T790M mutation in plasma from patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) who have developed epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) resistance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 1431-1439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2018.01.144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	曾根 崇  (Sone Takashi)  (30420334)	金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授   (13301)	臨床情報の収集、解析
研究分担者	木村 英晴  (Ki mura Hideharu)  (40444202)	金沢大学・附属病院・講師   (13301)	細胞実験の指導、臨床情報の収集・解析