

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590354

研究課題名（和文） リン酸化 EGFR 抗体を用いた肺癌の Gefitinib 感受性診断法の確立

研究課題名（英文） Establishment of the diagnostic method using antibody against phosphorylated EGFR for responsiveness to gefitinib therapy of lung cancer patients

研究代表者

泥谷 直樹（HIJIYA NAOKI）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80305036

研究成果の概要：

肺癌に対する抗癌剤である Gefitinib は、よく効く症例がある反面、まったくの無効例や重篤な副作用を発症する症例も多く、その奏効予測因子の同定が求められている。我々は EGFR のリン酸化が Gefitinib 感受性と高度に相関することを見出した。この知見に基づき、Gefitinib 投与前にその奏効性をより簡便、迅速かつ正確に予測する診断法を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：病理学・人体病理

キーワード：EGFR、リン酸化、肺癌、Gefitinib、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

Gefitinib（商品名 Iressa）は、Epidermal growth factor receptor（EGFR：上皮成長因子受容体）のチロシンキナーゼ活性を阻害する分子標的物質で、非小細胞肺癌に対する抗癌剤として用いられている。劇的な腫瘍消失・縮小効果をみる症例がある反面、まったくの無効例や、急性肺障害・間質性肺炎等の重篤な副作用を発症する症例も多く、その奏効予測因子の同定が重要となっている。これまで、Gefitinib の感受性に関与する臨床的な背景因子として、「非喫煙者」、「腺癌」、「女性」、「日

本人（東洋人）」が明らかにされていたが、2004 年、EGFR 遺伝子に変異を有する肺腺癌症例では Gefitinib の感受性が極めて高いことが報告され（N Engl J Med. 2004, 50, 2129-2139、Science. 2004, 304, 1497-1500）、EGFR 遺伝子の変異と Gefitinib 感受性の有意な相関性が指摘された。しかしながら、遺伝子解析は煩雑で高度な技術が必要なため、一般の病院で施行することは困難であった。

2. 研究の目的

我々は、EGFR 蛋白質の 992 番目のチロシ

ンのリン酸化を特異的に認識する抗体 (pEGFR Tyr992 抗体) を用いた染色結果が治療効果ときわめてよく相関することを発見した。この知見に基づき、Gefitinib 感受性をより簡便、迅速かつ正確に判定する診断法の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) Gefitinib 感受性と EGFR 遺伝子変異、EGFR リン酸化の相関

原発肺腺癌切除後再発に対して Gefitinib を投与された 21 症例について、手術時に採取された癌組織を用いて EGFR 遺伝子解析および免疫組織化学的解析を行った。

(2) Gefitinib 感受性診断キットの開発

pEGFR Tyr992 を特異的に認識するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作製して、ELISA 法を用いた pEGFR Tyr992 検出キットを構築する。

4. 研究成果

(1) イレッサ奏功性と EGFR 遺伝子変異、EGFR リン酸化の相関性

リン酸化 EGFR を特異的に認識する抗体を用いて 21 例のイレッサ投与例を免疫組織学的に解析したところ、イレッサが有効であった 9 例では全例 (100%) EGFR のリン酸化を確認した (図 1、表 1)。

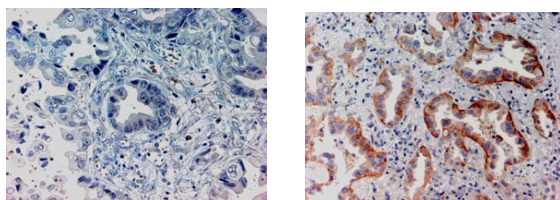


図 1. リン酸化 EGFR 特異的抗体を用いた免疫組織化学

EGFR 変異がない肺癌組織 (左) と、EGFR 変異がある肺癌組織 (右)

表 1. イレッサ奏功性と、EGFR 遺伝子変異および EGFR リン酸化の相関性

奏功性	EGFR 遺伝子変異*		EGFR リン酸化**	
	なし	あり	陰性	陽性
有効 (n=9)	0	9	0	9
無効 (n=12)	10	2	9	3
合計	10	11	9	12

* $P=0.0002$

** $P=0.0011$

pEGFR Tyr992 の免疫組織化学は、EGFR 遺伝子の変異解析を代替する有効な Gefitinib 感受性予測検査となり得ることが示された。

(2) マウス抗 pEGFR Tyr992 モノクローナル抗体の作製

pEGFR Tyr992 を含む合成ペプチドでマウスを免疫して、ミエローマ細胞との細胞融合、ELISA 法による 1 次スクリーニングを行い、有望なクローンを数個得た (図 2)。

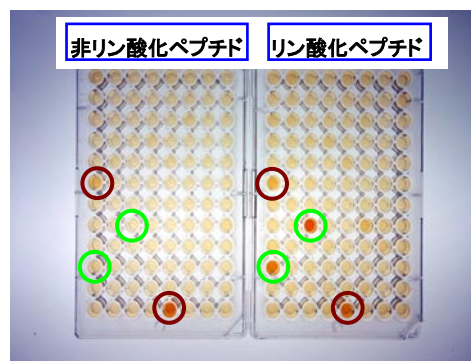


図 2. リン酸化 EGFR 特異的モノクローナル抗体の樹立

ELISA の結果を示す。左のプレート非リン酸化ペプチドをコートしたもの、右のプレートは免疫に用いたリン酸化ペプチドをコートしたものである。それぞれのプレートにハイブリドーマ (免疫したマウスの脾細胞とミエローマ細胞の融合細胞) の培養上清を加えた。赤丸のウェルはいずれのプレートにも発色している。これに対して、緑丸のウェルはリン酸化ペプチドのみに発色しており、リン酸化ペプチド特異的抗体であることがわかる。

(3) マウス抗 pEGFR Tyr992 モノクローナル抗体の大量精製

上述のハイブリドーマを無血清培地にて大量培養して、培養上清を回収、濃縮した後、プロテイン G カラムを用いて、抗体を精製した。

(4) ウサギ抗 pEGFR Tyr992 ポリクローナル抗体の大量精製

マウスの免疫に用いた pEGFR Tyr992 を含む合成ペプチドで、ウサギを免疫して、抗血清を採取する。これをアフィニティーカラムで精製して、抗体を得た

(5) pEGFR Tyr992 を検出する ELISA システムの構築

pEGFR Tyr992 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナ

ル抗体を用いてサンドウィッチELISAシステムを組んだ (図3)。

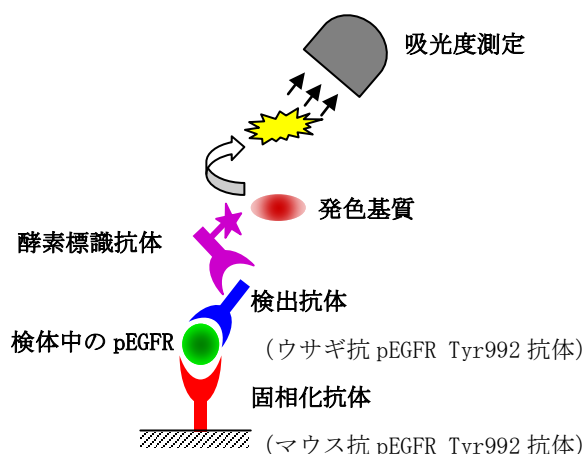


図 3. pEGFR Tyr992 ELISA システムの原理

陽性サンプルは免疫に用いたpEGFR Tyr992を含む合成ペプチドで、陰性サンプルは非リン酸化ペプチドである。陽性サンプルにのみ発色が確認されれば、次に培養細胞の溶解液をサンプルとする。あらかじめEGFで刺激してEGFRが高リン酸化状態にある細胞の溶解液は、未刺激の細胞の溶解液に比べ、強く発色することを確認する。

(6) 臨床検体を用いた ELISA システムの検証

構築された ELISA システムが組織の pEGFR Tyr992 を特異的に検出するか調べた。外科的切除された未固定の肺癌組織から非癌部と癌部を採取して、それぞれ組織溶解液を抽出し、ELISA を試行した。免疫染色にて、pEGFR Tyr992 は癌細胞のみならず、気管支上皮細胞や血管内皮細胞でも軽度の染色性を示すことを確認している。そのため、非癌部や pEGFR Tyr992 陰性癌組織の溶解液も、ELISA である程度の発色性は示した。現在、バックグラウンドの軽減化と、カットオフ値の算定を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Phosphorylation status of epidermal growth factor receptor is closely associated with responsiveness to

gefitinib in pulmonary adenocarcinoma.

Hijiya N., Miyawaki M., Kawahara K., Akamine S., Tsuji K., Kadota J., Akizuki S., Uchida T., Matsuura K., Tsukamoto Y., Moriyama M. *Hum Pathol.*, 39, 316-323, 2008, 査読あり

2. Arpp/Ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury. Tsukamoto Y., Hijiya N., Yano S., Yokoyama S., Nakada C., Uchida T., Matsuura K., Moriyama M. *Histochem Cell Biol.*, 129, 55-64, 2008, 査読あり

3. Genotyping of the cagA gene of *Helicobacter pylori* on immunohistochemistry with East Asian CagA-specific antibody. Kanada R., Uchida T., Tsukamoto Y., Nguyen LT., Hijiya N., Matsuura K., Kodama M., Okimoto T., Murakami K., Fujioka T., Yanagisawa S., Moriyama M. *Pathol Int.* 58, 218-225, 2008, 査読あり

4. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant downregulation of miR-141 and miR-200c Nakada C., Matsuura K., Tsukamoto Y., Tanigawa M., Yoshimoto T., Narimatsu T., Nguyen LT., Hijiya N., Uchida T., Sato F., Mimata H., Seto M., Moriyama M. *J Pathol.*, 216, 418-427, 2008, 査読あり

5. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. Tsukamoto Y., Uchida T., Karnan S., Noguchi T., Nguyen LT., Tanigawa M., Takeuchi I., Matsuura K., Hijiya N., Nakada C., Kishida T., Kawahara K., Ito H., Murakami K., Fujioka T., Seto M., Moriyama M. *J Pathol.*, 216, 471-482, 2008, 査読あり

6. Enhanced phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at the site of tyrosine 992 in esophageal carcinomas. Miyawaki M., Hijiya N., Tsukamoto Y., Nakada C., Kawahara K., Moriyama M. *APMTS*, 116, 1097-1106, 2008, 査読あり

7. Upregulated expression of cardiac ankyrin-repeated protein in renal podocytes is associated with proteinuria severity in lupus nephritis. Matsuura K., Uesugi N., Hijiya N., Uchida T., Moriyama M. *Hum Pathol.*, 38, 410-419, 2007, 査読あり

8. ARPP protein is selectively expressed in renal oncocytoma, but rarely in renal cell carcinomas. Shomori K, Nagashima Y, Kuroda N, Honjo A, Tsukamoto Y., Tokuyasu N., Maeta N., Matsuura K., Hijiya N., Yano S., Yokoyama S., Ito H., Moriyama M. *Mod Pathol.*, 20, 199-207, 2007, 査読あり

9. Immunohistochemical diagnosis of the cagA-gene genotype of Helicobacter pylori with anti-East Asian CagA-specific antibody. Uchida T., Kanada R., Tsukamoto Y., Hijiya N., Matsuura K., Yano S., Yokoyama S., Kishida T., Kodama M., Murakami K., Fujioka T., Moriyama M. *Cancer Sci.*, 98, 521-528, 2007, 査読あり

10. Aortic root subadventitial hematoma. Miyamoto S., Hadama T., Iwata E., Anai H., Sako H., Wada T., Tanaka H., Hamamoto H., Hijiya N. *Heart Vessels.* 22, 136-138, 2007, 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 泥谷直樹, Phosphorylation status of EGFR is closely associated with responsiveness to gefitinib in pulmonary adenocarcinoma, 第 66 回日本癌学会総会, 平成 19 年 10 月 3 日～5 日, 横浜

2. 泥谷直樹, 抗リン酸化 EGFR 抗体を用いた肺腺癌の Gefitinib 感受性予測診断法の確立, 第 96 回日本病理学会学術集会, 平成 19 年 3 月 13 日～15 日, 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泥谷 直樹

大分大学・医学部・助教

研究者番号 : 80305036

(2) 研究分担者

守山 正胤

大分大学・医学部・教授