

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790571  
 研究課題名 (和文) 非小細胞肺癌患者における 抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 由来ペプチド抗体の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of peptide antibodies derived from EGFR in non-small cell carcinoma  
 研究代表者  
 東 公一 ( Koichi Azuma )  
 久留米大学・医学部・助教  
 研究者番号：00368896

研究成果の概要：今回の研究は肺癌患者血清より EGFR 由来抗ペプチド抗体の検出を行い、抗体測定することにより、遺伝子検索なしに、より迅速に、より簡便に遺伝子変異を検出することを目標としたが、その結果、2 種類のペプチドを同定し、その抗体価と EGFR 遺伝子変異との関係を解析し、ペプチド抗体と変異の可能性を見いだした。最終登録が平成 21 年 3 月であり、今後、治療効果予測の可能性を検討予定である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：内科

科研費の分科・細目：呼吸器

キーワード：内科、癌

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において肺癌は死因の第一位であり、今後も増加することが予想される疾患である。肺癌は小細胞癌と非小細胞肺癌に分類され、その頻度はそれぞれ 20% と 80% である。小細胞肺癌は手術不能で化学療法が第一選択とされる。さらに非小細胞肺癌患者の 60% は、発見時にすでに切除不能例の

ため、根治困難であり延命処置としての抗癌剤投与や放射線療法が行われている。つまり、小細胞肺癌と併せると全肺癌患者の約 60-70% は、発見時に固形がん治療の第一選択である手術療法が受けられない計算になる。肺癌治療では、もはや局所療法だけでは根治は望めず、有効で安全な全身治療が鍵をにぎる。全身治療薬として、90 年代

にはカンプトテシン、ビノレビン、タキソテール、タキソールやジェムザールなどの新規抗癌剤が臨床試験の結果が報告されたが、根治は望めず数ヶ月の延命効果を認めるのみであった。現在、分子標的阻害剤の開発が盛んであるが、ゲフィチニブは上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とした分子標的阻害剤である。単独投与により化学療法無効非小細胞肺癌例の10-20%の奏効率を得た。2004年2つのグループよりゲフィチニブが著効した非小細胞肺癌患者の癌組織のEGFRの80%に遺伝子変異を認めることが報告された。その遺伝子変異は、exon18-21領域に集中しているとされている。EGFR遺伝子変異はゲフィチニブの奏効率と相関があることも報告されている。

申請者はGene expression cloning methodを使用し、癌抗原遺伝子及びそれらがコードする癌抗原ペプチドを同定している(業績参照)。さらに共同研究者により癌抗原遺伝子に対応する各種抗ペプチド抗体が癌患者血清中でも上昇していることを報告し、担がん患者個々における癌抗原遺伝子に対応する各種抗ペプチド抗体を発見し、その抗体測定により治療効果および予後を判定している。本研究は、非小細胞肺癌患者血漿中における抗EGFR由来抗ペプチド抗体をマイクロサスペンションアレイを用いて測定し、非小細胞肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異を検出することを目的とする。さらに抗EGFRペプチド抗体を測定することにより、ゲフィチニブ投与前に腫瘍縮小効果、副作用発現の予測の可能性について検討することを目的とする。

## 2. 研究の目的

近年、ゲフィチニブが著効した肺癌患者の癌組織におけるEGFRの遺伝子配列に変異の存在が明らかにされ、ゲフィチニブの奏効率とEGFR遺伝子変異に関連があることが報告された。これらの遺伝子解析は臨床上有益であり、肺癌治療におけるオーダーメイド治療の実現にも貢献すると考えられる。今回の研究は肺癌患者血清よりEGFR由来抗ペプチド抗体の検出を行い、抗体測定することにより、遺伝子検索なしに、より迅速に、より簡便に遺伝子変異を検出することを目標とする。さらに抗EGFR由来抗ペプチド抗体でゲフィチニブ投与前に治療効果の予測が可能となれば、今後のオーダーメイド肺癌治療の実現に非常に意義があると思われる。

## 3. 研究の方法

### A. EGFR 遺伝子変異解析

得られた肺癌組織(ホルマリン固定)についてDNAを抽出しEGFR exon18-21の遺伝子変異の解析を行う。解析法は、direct sequence法もしくはthe peptide nucleic acid-locked nucleic acid (PNA-LNA) PCR clamp法を用いる。この検査は当初、外部業者へ委託予定だったが、平成19年当研究室で検査可能となった。

### B. 血液検査およびEGFR由来抗ペプチド抗体測定

採血後は血漿を-80℃で保存する。登録終了後、EGFRの遺伝子配列を基に作成した80種類のEGFR由来ペプチドを用いてマイクロサスペンションアレイにて抗EGFR由来抗ペプチド抗体の測定を行う。

### C. 統計学的解析

患者背景、肺癌の組織分類、進行度および化学療法の奏効率と遺伝子変異の特徴を

解析する。抗体量と遺伝子変異の関係についても解析する。Fisher Exact test において、2 群間の特異度および感度を算出する。抗体量は、mean±SEM で表され、肺癌患者および健常人の比較は、unpaired T test で行う。ゲフィチニブによる抗 EGFR 由来抗ペプチド抗体量の変化は、ANOVA によって、前、投与 2 および 4 週後の変化率を解析する予定である。p<0.05 で有意差ありとする。統計ソフトは SAS, JUMP を使用する。

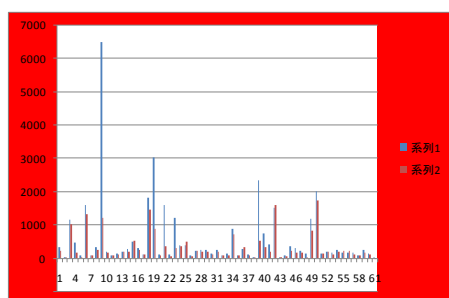
#### 4. 研究成果

(1) 2007 年-2009 年 3 月にかけて非小細胞肺癌に対してイレッサもしくはタルセバを投与した 40 名の患者より同意を得て、治療前後の血清を得る。

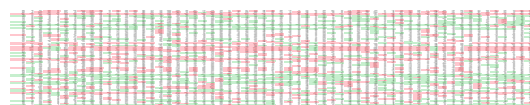
(2) 上記得られた患者組織及び細胞診から EGFR 遺伝子変異の測定を 2009 年 3 月に終了した。

(3) EGFR 遺伝子の配列より 60 種類の EGFR 由来ペプチドを作成して患者血清を用いてマイクロサスペンションアレイにより患者血清と反応の見られたペプチドを同定した。

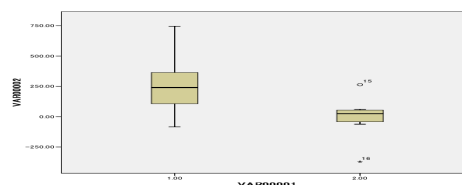
(Patient 1)



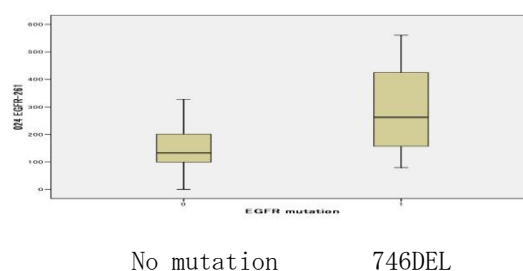
(Patient1-40 のデータ)



(4) これらの結果より患者血清よりペプチド数種類のペプチドを同定した。同定したペプチドAの抗体価をイレッサを投与して 90 日以上効果のみられている患者群と効果のない群において比較した。ペプチドAはイレッサ投与を行い効果のある群有意に上昇していた。



(5) 同定したペプチドBもペプチドBと同様の傾向がありさらに遺伝子変異と相関していることを見いだした。



(6) 現在、最終登録症例と合わせて再現性の確認を行っている。

## 5. 主な発表論文等

イレッサ投与の最終登録が平成21年3月であり、イレッサの効果が持続しているために、今後、治療効果予測の可能性を検討予定である。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 公一 ( Koichi Azuma )  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：00368896