

機関番号： 32202
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590351
 研究課題名（和文）癌遺伝子の異常によるシグナル伝達系の特異的活性化の解析と多分子標的療法への展開
 研究課題名（英文）Activation of signal transduction pathway by aberration of oncogenes: comprehensive analysis and application for multi-molecular targeting therapy

研究代表者
 土橋 洋 (DOBASHI YOH)
 自治医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：90231456

研究成果の概要（和文）：

上皮増殖因子受容体(EGFR)と刺激伝達経路の因子の異常を解析した。肺癌ではEGFRの活性化は37%に認められ、その増殖刺激の細胞内への伝達は11%に見られた。EGFR遺伝子の質的変化は24%で見られ、これも増殖刺激の伝達や転移と関連していた。その下流因子の一種、Aktの遺伝子増加は45%の症例で認め、これはEGFRとは排他的に増殖に関与していた。肉腫では、増殖のみならず神経、横紋筋等の腫瘍の形態形成への関与も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The involvement of epidermal growth factor receptor (EGFR) cascade was analyzed in lung carcinomas and in soft tissue sarcoma. Overexpression/activation of EGFR was observed in 37% and constitutive activation of cascade was found in 11%. Mutation of EGFR was observed in 24% and associated with cell proliferation and metastasis. Increase of AKT genes were found in 45% with reciprocal relation against increase of EGFR gene. In sarcoma, mTOR activation was associated with morphogenesis in tumors of neural and skeletal muscle origin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：呼吸器・縦隔

1. 研究開始当初の背景

国内外で増殖関連因子、特に受容体型チロシンキナーゼは長年研究対象とされ続け、また近年は遺伝子変化に対応した薬剤療法を目指す分子標的療法という観点からも更に注目されている。その中で癌遺伝子増幅の視点からの抗癌剤創薬の研究は重要な柱

の一つをなす。我々はヒトの多臓器の腫瘍で癌遺伝子の増幅、蛋白過剰発現を研究し、特に肺癌、肉腫でEGFR系の上流(膜)の遺伝子、蛋白発現異常から下流(細胞内)因子の異常活性化の特異的関連を報告してきた。その中で一元的な受容体抑制療法に否定的見解も示してきた。国内外の細胞増殖の研

究では、細胞周期抑制系の不活化、また抑制系蛋白質の分解亢進などが明らかになり、より複雑で丹念な解析を必要とする新しい局面になった。我々も増殖関連蛋白分解系に関しては肺癌の組織型(分化度)特異的分解を報告したが、今回はEGFRの下流でのcdk抑制因子の不活化も含めた詳細なカスケード解析を予定した。一方、転移に関しては細胞遊走因子 autocrine motility factor(AMF)の解析結果を報告したが、これにもEGFRファミリー分子の関与が示唆され、下流の一因子として解析対象に加えた。こうした複数の因子(群)の培養細胞での機能解析とヒト腫瘍材料での解析から治療標的の解明へアプローチするという研究は、この分野における集約的研究として位置づけているが、従来の報告は少ない。**経緯**：我々は肺癌、骨軟部肉腫を中心に、個々の腫瘍症例に対して臨床・病理組織診断のみからは推定が難しい”がんの悪性度診断”という概念を考え、多方面からの包括的な悪性形質の解析を継続してきた。具体的には i) 特定の癌で注目された癌遺伝子増幅が他の多臓器の癌でも認められる, ii) 特定の複数癌遺伝子の増幅が complex として起きやすい, iii)臓器により癌遺伝子増幅、蛋白過剰発現がシグナル伝達系に及ぼす活性化には特異性がある事などを報告してきた。

2. 研究の目的

上記のように肺癌、軟部肉腫の癌遺伝子、特に上皮増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor;EGFR)とそのシグナルカスケードに関する遺伝子、蛋白質群の包括的解析から、増殖、形態維持、転移等、個々の癌の悪性形質を制御する複数の重要な因子、所謂”addicted gene”を解析し、”多分子標的療法”のターゲットとする。従来の画一的薬剤療法ではなく、個別化医療に即した分子標的療法という概念を掲げ、EGFR系の全データを包括し、個々の癌の形質に深く関与する上流、下流の複数の”addicted gene”の解明を目標とした。

3. 研究の方法

(2008年度) 癌における形質変化と今回の研究対象の遺伝子、蛋白発現の変化の因果関係を解明するため、肺癌手術材料でEGFRカスケードの諸蛋白質の発現により群分けし、変動する他の遺伝子を検索した。その結果をもとに臨床検体で諸因子の発現異常、活性化を検索する。最終的には個々のヒト腫瘍で“EGFR遺伝子の異常—シグナル伝達蛋白の異常—分解系の関与”の一連の事象に特異性を見出し、生物学的悪性度との関連を解析し、個々の症例別の”多分子標的療法”のための

データとする。

(1). 病理組織検体における発現検索：肉腫と肺癌に関して(肉腫115例、肺癌は220例)で下記を検討した。新鮮試料は引き続き連携協力者の山梨大学胸部外科、整形外科の協力も得て収集した。

① 抗体を用いた発現解析：**A.** 癌遺伝子蛋白(EGFR, HER-2, c-myc), **B.** EGFR経路下流因子(Akt, mTOR, S6K等), **C.** 分解系ligase等, 免疫組織染色, immunoblotで発現, 局在, リン酸化レベルの検討を行った。

② 遺伝子増幅, EGFR変異の解析：EGFR, HER2, c-mycの増幅解析は、BAC clone(東京医科歯科大学・稲澤教授より供与)のプロブでFISH解析を行った。EGFRはexon 18-21のclamp法でシークエンスした。

(2) シグナル伝達系の活性化の解析：

EGFRの変化と下流因子の活性化：EGFRの増幅と過剰発現, 塩基配列解析, リン酸化のカスケードの特異的活性化の解析を多数例で, Gefitinib感受性を念頭にAktと下流のmTOR, p70S6K, 4E-BP1に関して上記と同様にリン酸化の検索を, 異なったリン酸化部位を認識する複数種の抗体を用いてimmunoblot, 免疫染色を行った。

(2009年度以降)

(1). 肺癌における mTOR 下流の最重要因子の探索：mTOR蛋白質の高/低発現により群分けし、両群の発現遺伝子の差異を東レ社製3D-Geneによりアレイ解析した。

(2). cdk抑制因子蛋白の不活性化と分解系の解析の継続：

Skp2, Pirh2とcdk-inhibitorの生化学的解析は基質をp27に絞り、培養細胞で発現の相関とを解析した。また予備実験の意味無含め肺癌の扁平上皮癌と類似した性格の癌として口腔領域の扁平上皮癌で上記3種蛋白の発現をもとに臨床病理学的な解析を行った。

(3). 2009年度以降新たに入手した臨床検体で、EGFRの変異、HER2, c-myc遺伝子増幅を有する癌を2008年と同様に解析を継続した。

(4). データの統計解析：上記で得た多種の蛋白質の発現、活性、遺伝子増幅等の個々のデータを総括し、臨床的なパラメータ(TNM因子, 生存期間等)との相関を単変量、多変量解析を含めて統計解析した。本研究では特にEGFR系で活性化される責任下流因子、特にAkt-mTOR系の解析と手術後の臨床経過、Gefitinib投与の有無、効果等の観点から検討した。肺癌は遠藤、松原、骨軟部肉腫は柳川、佐藤が臨床データを提供した。

4. 研究成果

(1). EGFR関連蛋白質と下流因子の検索：山梨大学、金沢大学との共同研究で収集した症例中、解析可能な質的保存状態だったものは

肺癌150例, 肉腫120例であった。このサンプルでEGFRの異常と下流因子(Akt, mTOR, S6K, rS6, 4E-BP1蛋白)の特異的活性化の解析を行った。

① **EGFR と下流因子の活性化**: i) 肺癌: EGFR蛋白質の過剰発現、活性化はいずれも約37%に認められたが、小細胞癌では7%であり、その関与は低かった。EGFRの活性化例の55%にAkt-mTOR系の活性化を伴い、EGFR/Akt/mTOR/rS6の全体の構成的活性化は非小細胞癌の11%に見られた。特に腺癌(AC)では90%に、扁平上皮癌(SCC)では40%にmTORの活性化を認めたが、いずれもその60%が下流のS6K/rS6の活性化を伴っていた。EGFRの遺伝子変異例は24%に見られ、高頻度にEGFRの活性化を伴い、50%の症例がAkt/mTOR/rS6全体の活性化を伴っていた。またEGFR変異例では高頻度にEGFRの活性化を伴い、50%の症例がAkt/mTOR/rS6全体の活性化を伴っていた。この傾向はSCCでも同様であった。EGFR遺伝子変異例の22%にEGFR増幅を伴っていたが、下流因子の活性化の特異性は認めなかった。Aktの活性化は肺癌全体でリンパ節転移と関連し、組織型別ではSCCではmTOR, ACではrS6の活性化例で転移率が高かった。(以上、2009, 2010, 2011年, 日本病理学会、2010年日本癌学会, Cancer, 2009, Human Pathol. 2010, Front. Biosci.2010)

② **骨軟部肉腫**: 骨軟部肉腫ではEGFRの下流分子のAktが55%, mTORは61%で活性化され、特にmTORは神経系、横紋筋腫瘍の他、上皮性形態を示す腫瘍特異的に下流のS6K/4E-BP1も含めた系全体の活性化が見られ、これらの腫瘍の分化、形態形成への関与が示唆された(2009年、日本病理学会発表、Mod. Pathol. 2009)。

③ **Akt蛋白質の過剰発現、遺伝子増幅の関連**: Aktの過剰発現は肺癌全体の60%で、活性化は44%で認められた。また13%にAKT1,2遺伝子いずれかの増幅を、32%でpolysomyを認めた。AKT1,2増幅と高レベルpolysomyを示す症例では全例でAktの活性化を伴い、かつEGFRの変化が無く、両遺伝子の変化の排他性が示唆された(2011年、日本病理学会)。

④ **mTOR下流の最重要因子の探索**: アレイ解析により、肺癌におけるmTOR下流での高発現蛋白質で、増殖因子、癌遺伝子関連以外の候補を数種類クローニングした。今後、機能解析を含めた詳細な検討を継続する。

(2). **cdk抑制因子(CKI)の不活性化と分解系の解析**: CKIの一種、p27はubiquitin ligaseのSkp2, の他、Pirh2により分解を受ける。

① **Skp2等とCKIの発現レベルの相関解析**: 4種の培養細胞株にPirh2のcDNA, あるいはsiRNAを導入すると、過剰発現の際にはp27の

発現は減弱し、抑制するとp27が亢進し、拮抗的な関係が確認できた。

② **手術材料での解析**: 口腔癌57例でPirh2, p27の免疫組織染色により検索した結果、実際の組織でも両者の発現レベルは拮抗的であり、複数のp27分解蛋白質の中でもPirh2が主たる蛋白である可能性が示唆された。またPirh2過剰発現例は腫瘍径, stageと有意に相関し、また単変量解析では予後不良因子となった(2010年日本癌学会, Cancer Sci. 2009)。

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12件)

1. Dobashi, Y., Suzuki, S., Kimura, M., Matsubara, H., Tsubochi, H., Imoto, I. and Ooi, A. Paradigm of kinase-driven pathway downstream of EGFR/Akt in human lung carcinomas. (査読有) Hum. Pathol. 42(2):214-26, 2011.

2. Dobashi, Y., Koyama, S., Kanai, Y., and Tetsuka, K. Kinase-driven pathways downstream of EGFR in human lung carcinomas: perspectives on molecular targeting therapy. (査読有) Front Biosci. Landmark 16:1714-32, 2011.

3. Ooi, A., Zen, Y., Ninomiya, I., Tajiri, Y., Suzuki, S., Kobayashi, H., Imoto, I., Dobashi, Y. Gene Amplification of ERBB2 and EGFR in adenocarcinoma in situ and intramucosal adenocarcinoma of Barrett's esophagus. (査読有) Pathol Int. 60(6):466-71, 2010.

4. Suzuki, S., Dobashi, Y., Hatakeyama, Y., Tajiri, R., Fujimura, T., Heldin, C. H. and Ooi, A. Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and vascular endothelial growth factor-A expression, PDGF receptor- β phosphorylation, and microvessel density in gastric cancer. (査読有) BMC Cancer 10:659, 2010.

5. Dobashi, Y., Suzuki, S., Matsubara, H., Kimura, M., Endo, S. and Ooi, A.: Critical and diverse involvement of the Akt/mTOR signaling in human lung carcinomas. (査読有) Cancer 115(1):107-18, 2009.

6. Ooi, A., Suzuki, S., Nakazawa, K., Itakura, J., Imoto, I., Nakamura, H. and Dobashi, Y.: Gene amplification of *Myc* and its coamplification with *ERBB2* and *EGFR* in gallbladder adenocarcinomas. (査読有) Anticancer Res. 29(1):19-26, 2009.

7. Shimada, M., Kitagawa, K., Dobashi, Y., Isobe, T., Hattori, T., Uchida, C., Abe, K.,

Kotake, Y., Oda, T., Suzuki, ., Hashimoto, K. and Kitagawa, M.: High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers. (査読有) Cancer Science 100(5):866-872, 2009.

8. Dobashi, Y., Suzuki, S., Sato, E., Hamada, Y., Yanagawa, T. and Ooi, A.: EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. (査読有) Mod. Pathol. 22(10):1328-1340, 2009.

9. Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S. and Konishi, F.: Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. (査読有) Exp. Gerontol. 44(11):727-732, 2009.

10. Sato, J., Yanagawa, T., Dobashi, Y., Yamaji, T., Takagishi, K. and Watanabe, H. Prognostic significance of 18F-FDG uptake in primary osteosarcoma after but not before chemotherapy: a possible association with autocrine motility factor/ phosphoglucose isomerase expression. (査読有) Clin. Exp. Metasta. 25(4):427-435, 2008.

[学会発表] (計 25 件)

1. 鈴木 潮人、湊 宏、土橋 洋、田尻 亮輔、大井 章史. 唾液腺癌における EGFR, HER2 遺伝子増幅および蛋白過剰発現. 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 30 日 東京

2. 大井 章史、鈴木 潮人、田尻 亮輔、土橋 洋、源 利成. FISH を用いた大腸癌における EGFR 遺伝子の増幅の検討. 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 29 日 東京

3. 土橋 洋、鈴木 潮人、梶村 春彦、山田 茂樹、大井 章史. 肺癌におけるエフェクター分子 Akt の活性化と遺伝子変化. 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 28 日 東京

4. 土橋 洋、鈴木 潮人、大井 章史. Paradigm of kinase-driven pathway downstream of EGFR/Akt in human lung carcinomas. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪

5. 土橋 洋、鈴木 潮人、山田 茂樹、大井 章史. 肺癌における EGFR/Akt/mTOR/S6 kinase 経路の機能的関与の多様性. 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 東京

6. 土橋 洋、鈴木 潮人、山田 茂樹、大井 章史. 肺癌における EGFR/Akt/mTOR/S6 kinase 経路の機能的関与の多様性. 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 東京

7. 大井 章史、土橋 洋、鈴木 潮人、田

尻 亮輔、全 陽. バレット腺癌における ERBB2 及び EGFR の過剰発現と遺伝子増幅 - FISH を用いた検討 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 東京

8. 鈴木 潮人、土橋 洋、畠山 弥生、田尻 亮輔、大井 章史. 胃癌の新生血管に関する臨床病理学的検討. 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 東京

9. 土橋 洋、鈴木 潮人、大井 章史. 肺癌における EGFR の異常とその下流因子の関与. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 2 日 横浜

10. 北川 雅敏、島田 真衣、土橋 洋、服部 隆行、神武 洋二郎、橋本 賢二、北川 恭子. Pirh2 は p27 のユビキリンリガーゼとして人の癌の悪性度に関与する. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 2 日 横浜

11. 土橋 洋、鈴木 潮人、山田 茂樹、大井 章史. 間葉系腫瘍における EGFR カスケードの関与. 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 3 日 京都

12. 小林 信、影山 泰平、松本 俊英、長塩 亮、土橋 洋、佐藤 雄一、岡安 勲. 肺癌患者血性中の腫瘍特異的自己抗体としての抗 AMF 抗体の有用性. 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 2 日 京都

13. 大井 章史、幾川 恵史、鈴木 潮人、土橋 洋、全 陽. 乳癌における MYC 遺伝子の増幅の検討 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 1 日 京都

14. 鈴木 潮人、土橋 洋、畠山 弥生、田尻 亮輔、大井 章史. 胃癌における VEGF, PDGF シグナル経路の病理学的検討. 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 1 日 京都

15. 大井 章史、鈴木 潮人、井本 逸勢、土橋 洋. 胆嚢癌における Myc 遺伝子増幅、特に ERBB2 及び EGFR 遺伝子との同時増幅について. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 3 日, 名古屋.

16. 鈴木 潮人、土橋 洋. 活性変異型 PDGFR- β (D849N) の血管新生増強効果. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 2 日, 名古屋.

17. 鈴木 潮人、土橋 洋、大井 章史. PDGFR- β の活性化型変異 D849N は B16 メラノーマの増殖を促進する. 第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 16 日 金沢

18. 土橋 洋、鈴木 潮人、大井 章史. ヒト肺癌における EGFR の遺伝子異常、下流因子の活性化の意義とその分子病理学的意義. 第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 15 日 金沢

[図書] (計 3 件)

1. 土橋 洋: 細胞傷害と細胞増殖、シンプル病理学 第 6 版 (笹野公伸、岡田保典、安井 弥 編)、南江堂、東京、2010、5-14 頁.

2. Dobashi, Y., Kimura, M., Sato, E., Hamada, Y. and Ooi, A. Molecular targeting therapy in Bone and Soft Tissue Tumors: Perspectives on this new mode of therapy. In Soft Tissue cancers. Nova Science Publisher Ltd. N.Y. U.S.A. 2008, p1-36.

3. 木村麻衣子、土橋 洋：リン酸化研究の歴史と病理からのアプローチ。病理と臨床。 26 (8) : 864-866, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土橋 洋 (Dobashi Yoh)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90231456

(2) 研究分担者

遠藤 俊輔 (Endo Syunsuke)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：10245037
柳川 天志 (Yanagawa Takashi)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：50294971
北川 雅敏 (Kitagawa masatoshi)
浜松大学・医学部・教授
研究者番号：50294971

(3) 連携研究者

松原, 寛知 (Matsubara Hirochika)

山梨大学・医学部・附属病院・助手

研究者番号：00374166

佐藤 栄一 (Sato eiti)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：80293455

大井 章史 (Ooi Akishi)

金沢大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50160411