

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590924

研究課題名（和文） 肺癌の人種的な差異の解明と新たな治療戦略の開発

研究課題名（英文） The elucidation of an ethnic difference of lung cancer and the development of a new therapy

研究代表者

石川 暢久 (Nobuhisa Ishikawa)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90423368

研究成果の概要（和文）：

呼吸器疾患の血清バイオマーカー値の有用性を日欧における人種的な違いに着目して検討を行ったところ、日本人と比較して欧米人の値は高い傾向を認め、異なるカットオフ値の設定が必要であると思われた。また、EGFR-TKI投与前の血清KL-6値が高値を示す症例では、正常値の症例と比較して、予後が優位に不良であった。さらに、EGFR遺伝子変異を認めない症例であっても血清KL-6値が正常値の症例は、EGFR-TKI治療の適応となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The circulating levels of KL-6 and SP-D in European were higher than those in Japanese control subjects suggesting that the cut-off level for these biomarkers in the European are probably higher than in the Japanese population. We demonstrated that pretreatment serum levels of KL-6 can serve as an independent prognostic factor for NSCLC patients treated with epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) in a large multi-institutional setting. We also showed that among NSCLC patients with wild-type *EGFR*, progression free survival (PFS) was significantly shorter in patients with high serum KL-6 levels than in patients with normal serum KL-6 levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌，肺線維症，慢性閉塞性肺疾患，ムチン，バイオマーカー，人種差

1. 研究開始当初の背景

(1) 呼吸器疾患の人種的な違い

薬剤の開発がグローバル化する中で、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (epidermal growth factor receptor tyrosine

kinase inhibitors; EGFR-TKI)の臨床効果とその薬剤性肺障害の発生頻度に人種的な違いを認めることが明らかになり、呼吸器疾患における人種的な違いに関する研究の重要性が高まってきている。その解明は、EGFR-TKI

の有効症例が多いとされるわが国が先進的に進めるべき重要な研究課題であり、呼吸器疾患の発症メカニズムの解明につながるものと思われる。

間質性肺炎の血清マーカーとして開発・臨床応用に成功した Krebs von den Lungen-6 (KL-6) は、現在わが国の日常臨床において年間約 180 万検体の測定が行われている呼吸器疾患バイオマーカーである。また、KL-6 は、腺癌関連糖鎖抗原として開発された経緯もあり、肺胞上皮細胞や肺癌細胞の関連抗原分子としての性格も有しており、間質性肺炎以外の呼吸器疾患では、進行した肺癌症例でも高値を示すことが知られているが肺癌症例におけるその意義は十分に解明されていない。また、KL-6 は、欧米では臨床研究として測定が実施されているに過ぎず、診断薬としての実地臨床応用は行われていない。さらに、HapMap データベース上では (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), MUC1 の遺伝子多型(rs4072037)の頻度に人種的な違いを認めること、rs4072037 と血清 KL-6 値が相関することより考えて(Janssen R, et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006), 日本人と欧米人では異なるカットオフ値の設定が必要ではないかと推測している。

(2) EGFR-TKI 耐性機序の解明

現時点では、EGFR-TKI の臨床効果は EGFR 遺伝子変異を解析することで、高率に予測可能であるが、耐性機序については未だ不明な点が多い。私達は、EGFR-TKI 耐性予測マーカーの研究を継続的に行い、ムチン関連分子が EGFR-TKI 耐性機序に関与しているのではないかと推測した。しかし、肺癌組織や肺癌患者血清中における KL-6 の発現レベルとその臨床的な意義については十分な検討がなされていない。

KL-6 抗体を用いた治療への応用に関しては、癌細胞株を用いた検討では抗 KL-6 抗体が、MUC1 の capping により細胞表面の E-cadherin を露出させ、E-cadherin を介した細胞凝集、増殖抑制が起こること、LAK 感受性を増強させることが分かっている(Doi M, *Cancer Science* 2006)。しかし、生体内モデルにおいてこの抗体療法が何らかの抗腫瘍効果を認めるのかについては不明である。近年、ムチンを分子標的とした癌免疫療法の効果を示唆する報告も増えている点も踏まえて、ヒト肺癌細胞を用いた同所移植性肺癌マウスモデルを用いて、EGFR-TKI の耐性機序、EGFR-TKI 治療における人種的な差異を解明し、新たな治療戦略の開発を目指したい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、呼吸器疾患の人種的な違

いを呼吸器疾患バイオマーカーに着目して、臨床像のみならず遺伝子レベルからも解明することである。さらに、EGFR-TKI の耐性機序を解明し、新たな治療戦略の開発を目指すことも目指したい。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 2 つのアプローチを考案した。

(1) 呼吸器疾患の人種的な違いの解明

ムチン関連分子などの呼吸器疾患のバイオマーカーの測定意義を検討し、欧米人においても有用であることを示すとともに、呼吸器疾患の臨床像における人種的な差異についても検討する。

さらに、ムチン関連分子を遺伝子レベルで検討することにより呼吸器疾患患者における人種的な違いを検討する。

(2) EGFR-TKI 耐性機序の解明と新たな治療戦略の開発

EGFR-TKI を実際に投与した切除不能非小細胞肺癌症例における血清 KL-6 値測定の意義について、広島大学を中心とした多施設で検討を行った。薬剤性肺障害を発症した症例と発症しなかった症例に分けて解析を行った。外科的切除された非小細胞肺癌 103 症例における KL-6 の発現パターンならびに血清 KL-6 値が予後因子となりうるか検討した。

ヒト肺癌細胞株をヌードマウスへ同所移植したモデルを用いて、ムチン関連分子の EGFR-TKI の耐性への関与を検討した。

4. 研究成果

(1) 呼吸器疾患の人種的な違いの解明

呼吸器疾患の人種的な違いに関しては、研究期間中に新たに Vuokko L Kinnula 教授（フィンランド・ヘルシンキ大学・呼吸器内科）を研究グループに加え、フィンランド人のコントロール症例における血清 KL-6、SP-A、SP-D 値について検討を行った。その結果、血清 KL-6 値ならびに SP-D 値は、日本人と比較して欧米人では明らかに高い傾向を認めたが、SP-A 値には人種的な違いを認めなかった(Ishikawa N, et al. *BMC Pulmonary Medicine* 2011), (Ilumets H, et al. *BMC Pulm Med* 2011)。現在、これらのバイオマーカーの遺伝子多型と血清値の関係を検討することにより呼吸器疾患の人種的な違いを解明することを目指している。また、間質性肺炎や肺癌などの呼吸器疾患における血清バイオマーカーの有用性ならびに臨床像の違いについては、症例の集積に予定より時間がかかったが、現在検討を行っているところである。

(2) EGFR-TKI 耐性機序の解明と新たな治療戦略の開発

EGFR-TKIを実際に投与した切除不能非小細胞肺癌症例における血清KL-6値測定の意義について、広島大学を中心とした多施設で検討を行った。登録された341症例の中で20症例にEGFR-TKIによる薬剤性肺障害を発症した。薬剤性肺障害の発症の危険因子を検討したところ、投与前に間質性肺炎を合併していることのみが危険因子であることが分かった。

EGFR-TKIによる薬剤性肺障害を発症した20症例においては、治療開始前ならびにEGFR-TKIによる薬剤性肺障害発症時の血清KL-6の絶対値は、薬剤性肺障害の進展ならびに重症度を反映しなかった。しかし、治療開始前から薬剤性肺障害までの血清KL-6値の変化は致死的な症例とステロイド治療に反応する症例の鑑別に有用であった。

次に、薬剤性肺障害を発症しなかった症例においては、EGFR-TKI投与前の血清KL-6値が500U/ml以上の症例では、500U/ml以下の症例と比較して、無増悪生存期間が優位に不良であった。さらにEGFR遺伝子変異を含めたサブグループ解析を行ったが、EGFR遺伝子変異を認めない症例であっても血清KL-6値が500U/ml以下の症例は、EGFR-TKI治療の適応となる可能性が示唆された。

KL-6抗体を用いて組織免疫染色を施行し、肺癌手術症例103症例におけるKL-6の発現と血清KL-6値を含めた臨床病理学的因子との関係を検討した。肺癌組織におけるKL-6の発現は、極性を保ったものと極性を喪失したものの二つに分けられ、血清中KL-6は極性を喪失したもので高値を示すことを明らかにした。さらに、血清KL-6高値は独立した予後因子となりうることも明らかにした。

当初、ヒト肺癌細胞株をヌードマウスへ同所移植したモデルを用いる予定であったが、肺への生着率が低いことが分かった。その後、様々な検討を重ね、免疫不全マウス(NOD SCIDマウス)にはヒト肺癌細胞株が生着することが分かったが、当初予定した検討を期間内に行うことが出来なかった。

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 20 件)

1. Ishikawa N, Mazur W, Toljamo T, Vuopala K, Rönty M, Horimasu Y, Kohno N, Kinnula VL. Ageing and long-term smoking affects KL-6 levels in the lung, induced sputum and plasma. *BMC Pulm Med*

- 11(1):22, 2011. (査読有)
2. Ilumets H, Mazur W, Toljamo T, Louhelainen N, Toljamo T, Nieminen P, Kobayashi H, Ishikawa N, Kinnula VL. Ageing and smoking contribute to plasma surfactant proteins and protease imbalance with correlations to airway obstruction. *BMC Pulm Med* 11(1):19, 2011. (査読有)
3. Kondo T, Hattori N, Ishikawa N, Murai H, Haruta Y, Hirohashi N, Tanigawa K, Kohno N. KL-6 Concentration in Pulmonary Epithelial Lining Fluid and Is a Useful Prognostic Indicator in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiratory Research* 12(1):32, 2011. (査読有)
4. Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, Horimasu Y, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N, Kinnula VL. Surfactant protein A and KL-6 are elevated in the induced sputum of COPD; a sequential sputum analysis. *Respiration* (印刷中) (査読有)
5. Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a Prognostic Biomarker for Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer* (印刷中) (査読有)
6. Masuda T, Hattori N, Hamada A, Iwamoto H, Ohshimo S, Kanehara M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Kohno N. Erlotinib efficacy and cerebrospinal fluid concentration in lung adenocarcinoma patients developing leptomeningeal metastases during gefitinib therapy. *Cancer Chemoth Pharm* (印刷中) (査読有)
7. Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. Mucins carrying selectin ligands as predictive biomarkers of disseminated intravascular coagulation complication in acute respiratory distress syndrome. *Chest* 139(2):296-304, 2011. (査読有)
8. Ishikawa N, Ohlmeier S, Mazur W, Salmenkivi K, Myllärniemi M, Kinnula VL. Hemoglobin in human lung, its loss in Pulmonary Fibrosis but not in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiratory Research* 11(1):165, 2010. (査読有)
9. Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama Y, Kohno N. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* 65: 334-340, 2010. (査読有)

10. Kinnula VL, **Ishikawa N**, Bergmann U, Ohlmeier S. Proteomic approaches to study human parenchymal lung diseases: Focus on Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Expert Review of proteomic* 6: 619-29, 2009. (査読有)
11. Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, Hamada H, **Ishikawa N**, Haruta Y, **Hattori N**, Tanigawa K, **Kohno N**. Circulating KL-6/MUC1 as an independent predictor for disseminated intravascular coagulation in acute respiratory distress syndrome. *J Intern Med* 263: 432-9, 2008. (査読有)
12. **Ishikawa N**, **Hattori N**, Yokoyama A, Tanaka S, Nishino R, Yoshioka K, Ohshimo S, Fujitaka K, Ohnishi H, Hamada H, Arihiro K, **Kohno N**. Usefulness of monitoring the circulating Krebs von den Lungen-6 levels to predict the clinical outcome of patients with advanced nonsmall cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* 122:2612-20, 2008. (査読有)
13. **石川暢久**, **河野修興**. Non-coding regionにおける遺伝子制御の最近の知見 VNTR(variable number of tandem repeats) 遺伝子多型による癌の進行度診断. *Surgery Frontier* 17: 56-58, 2010. (査読無)
14. **石川暢久**, **河野修興**. 間質性肺炎と肺癌. *癌と化学療法* 37: 6-9, 2010. (査読無)
15. **石川暢久**, **河野修興**. シアル化糖鎖抗原 KL-6. 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査 (第7版): 358-360, 2009. (査読無)
16. **石川暢久**, **河野修興**. 間質性肺炎のマーカー KL-6, SP-A, SP-D. *診断と治療* 97: 1773-1777, 2009. (査読無)
17. **石川暢久**, **河野修興**. 薬剤性肺障害. *リウマチ科* 40: 363-370, 2008. (査読無)
18. **石川暢久**, **河野修興**. 間質性肺炎のマーカー KL-6. *日本胸部臨床* 67:S26-30, 2008. (査読無)
19. **石川暢久**, **河野修興**. 腫瘍マーカーのバイオマーカーとしての臨床的意義. *医学のあゆみ* 224: 1159-1163, 2008. (査読無)
20. **石川暢久**, **河野修興**. 腫瘍マーカーは肺がん診療に、どのように使われますか? *ナーシングケア Q&A* 19: 72-73, 2008. (査読無)

[学会発表] (計6件)

1. 河瀬成穂, **服部登**, **石川暢久**, 高野 淳, 堀益 靖, 磯部 威, 濱田泰伸, 横山彰仁, **河野修興**. EGFR-TKIによる致死的薬剤性肺障害における KL-6 値の有用性の検

討. 第69回日本癌学会総会 (2010.9.22 ~24 大阪)

2. **石川暢久**. 呼吸器疾患の血清マーカー. 第44回日本呼吸器学会中国四国地方会 (2009.7.17~18 松江).
3. 吉岡宏治, **石川暢久**, 稲田順也, 田中惣之輔, 大下慎一郎, 長尾早江子, 春田吉則, 村井博, **服部登**, **河野修興**. 非腫瘍性呼吸器疾患における sialyl Lewis a を有する KL-6 の検討. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 (2009.6.12~14 東京).
4. 田中惣之輔, **石川暢久**, 吉岡宏治, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, **服部登**, **河野修興**. 外科的切除を行った非小細胞性肺癌における KL-6/MUC1 の検討. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 (2009.6.12~14 東京).
5. **Ishikawa N**, Takano A, Miyagi Y, Yasui W, Inai K, Hosokawa M, Tsuchiya E, **Kohno N**, Nakamura Y, Daigo Y. Cancer-testis Antigen LY6K is a Serologic Biomarker and a Therapeutic Target for Lung and Esophageal Carcinomas. 第67回日本癌学会学術総会 (2008.10.28~10.30 名古屋).
6. **石川暢久**, **服部登**, 横山彰仁, 吉岡宏治, 田中惣之輔, 河瀬成穂, 藤高一慶, 濱田泰伸, **河野修興**. Gefitinib 使用患者における血清 KL-6 値モニタリングの意義. 第48回日本呼吸器学会総会 (2008.6.15 ~6.17 神戸)

[図書] (計2件)

1. **石川暢久**, 河野修興: KL-6. 間質性肺炎疾患診療マニュアル (南江堂): pp123-125, 2010. (査読無)
2. **石川暢久**, 河野修興. 肺毒性・心毒性. *癌化学療法 update 2010-2011* (中外医薬社): pp546-552, 2009. (査読無)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 暢久 (Nobuhisa Ishikawa)
 広島大学・大学院医歯薬総合研究科・
 助教
 研究者番号: 90423368

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

河野 修興 (Nobuoki Kohno)
 広島大学・大学院医歯薬総合研究科・
 教授
 研究者番号: 80215194

服部 登 (Noboru Hattori)

広島大学・大学院医歯薬総合研究科・
准教授
研究者番号：00283169