

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791210

研究課題名 (和文) EGFR 阻害剤による間質性肺炎の原因究明と抑制方法の開発

研究課題名 (英文) Investigation to determine the cause of interstitial pneumonia by the EGFR inhibitors, and the development of that suppression method

研究代表者

石黒 由香利 (ISHIGURO YUKARI)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：00423830

研究成果の概要 (和文)：上皮成長因子 (EGF)は腫瘍に対して増殖因子として働くため、その受容体 (EGFR)の阻害剤は悪性腫瘍に対する効果的な分子標的治療薬として注目されている。しかし、重篤な副作用である特発性間質性肺炎による死亡例が頻発しているため、原因の解明が急務となっている。そこで、この研究ではEGFR阻害剤による間質性肺炎の原因解明とその抑制方法を検討した。頭頸部癌細胞株であるHSC-3をEGFRチロシンキナーゼ阻害剤 (AG1478)もしくはEGFR抗体存在下で培養すると、IL-6の発現が増加することが判明した。EGFR阻害剤で処理をした腫瘍細胞の培養上清をコンディショニングメディウムとしてヒト肺由来線維芽細胞を培養し、RNAを抽出してreal-time quantitative RT-PCR法で線維化のマーカーであるコラーゲンの発現量を検討した。EGFR阻害剤処理をしたHSC-3の培養上清で培養した線維芽細胞ではコラーゲンの発現量が有意に増加していた。これらの結果から、EGFR阻害剤で処理された腫瘍細胞から産生されるIL-6が線維芽細胞の線維化を誘導している可能性が示唆され、EGFR阻害剤による重篤な副作用の一因となっているのではないかと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Acute interstitial pneumonia is one of serious side effects of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, although that cause is still unknown. Here we report that cancer cells treated with EGFR inhibitors induce fibrosis of normal lung cell. Human tongue squamous cell carcinoma (HSC-3) was cultured with EGFR-tyrosine kinase inhibitor (AG1478) or EGFR antibody. IL-6 expression level was elevated by EGFR inhibitors in HSC-3. Those supernatants were used as the conditioned medium. Then, OUS-11, normal human lung fibroblast-like cell line, was cultured with the conditioned medium. We investigated the expression of collagen, which was the marker for fibrosis, to confirm whether fibrosis was induced or not in OUS-11. That result showed that the expression level of collagen in OUS-11 treated with conditioned medium was higher than control cells. These data suggested that acute interstitial pneumonia was induced IL-6 from cancer cells treated with EGFR inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：EGFR 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子 (EGF) は様々な悪性腫瘍においてに過剰発現しており、増殖因子として働くため、その受容体 (EGFR) の阻害剤は悪性腫瘍に対する効果的な分子標的治療薬として注目されている。しかし、重篤な副作用である特発性間質性肺炎による死亡例が頻発しているため、原因の解明が急務となっている。

## 2. 研究の目的

様々な悪性腫瘍において EGFR が過剰発現しているため、C225 のような EGFR に対する抗体や、イレッサやタルセバのような EGFR のチロシンキナーゼ選択的阻害剤 (EGFR-TKI) が分子標的治療薬として注目されている一方で、EGFR 阻害剤による重篤な副作用である特発性間質性肺炎が重大な問題となっている。死亡例も頻発しているため、原因の解明が急務となっているが、その原因は未だ不明である。

そこで我々は、EGFR 阻害剤で処理した腫瘍細胞から産生される何らかの因子が、間質性肺炎の原因となっているのではないかと考え、頭頸部癌細胞を EGFR 阻害剤で処理し、その培養上清を用いてヒト肺繊維芽細胞を培養したところ、間質性肺炎のマーカーとして知られるコラーゲン遺伝子の発現が劇的に上昇することを発見し、報告した (Cancer cells treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitor induce fibrosis of normal lung cell. Ishiguro Y, Ishiguro H, Tsukuda M. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007)。さらに、コラーゲン遺伝子の発現を上昇させている原因因子をメンブレンアレイを用いて探索したところ、EGFR 阻害剤で処理した腫瘍細胞では何も処理していないコントロール細胞と比べ、IL-6 の産生が亢進していた。

興味深いことに、IL-6 の存在下でヒト肺繊維芽細胞を培養するとコラーゲン遺伝子の発現が上昇し、IL-6 の中和抗体を加えるとコラーゲンの上昇が抑えられたことから、IL-6 が間質性肺炎の原因であると考えられた。そこでこの研究では、EGFR 阻害剤を作用させた腫瘍細胞から IL-6 が産生されるメカニズムを解明し、IL-6 産生を抑制する方

法を検討することにより、重篤な副作用である特発性間質性肺炎の原因究明とその抑制方法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) EGFR阻害剤による IL-6 の産生促進を検討する。

頭頸部癌細胞を EGFR 阻害剤で処理し、その培養上清中の IL-6 の量を、ELISA 法を用いて測定する。さらに、EGFR 阻害剤で処理をした腫瘍細胞から RNA を抽出し、real-time quantitative RT-PCR 法にて IL-6 の量を定量する。

(2) EGFR 阻害剤で処理した腫瘍細胞から IL-6 が産生促進するメカニズムを検討する。

IL-6 の産生を調節している転写因子を検出するため、EGFR 阻害剤で処理をした腫瘍細胞からタンパク質を分離し、ウェスタンブロッティングを用いて各種転写因子の発現と活性化を検出する。

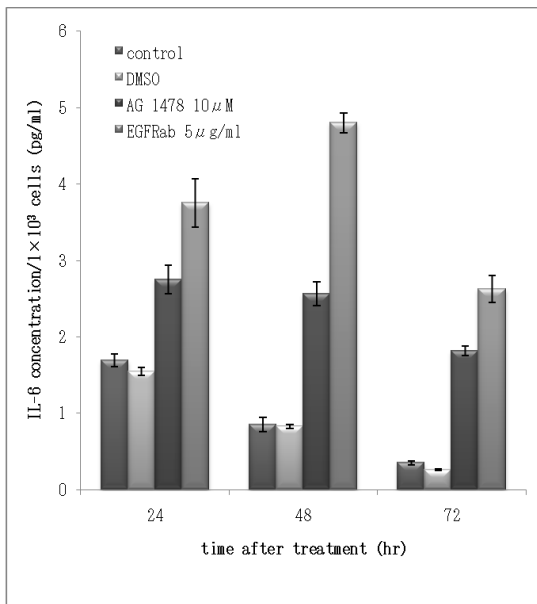
(3) 繊維芽細胞におけるコラーゲンの発現を検討する。

腫瘍細胞に EGFR 阻害剤を作用させて培養し、その培養上清をコンディションメEDIUM としてヒト肺由来の繊維芽細胞を培養し、コラーゲンの発現量を real-time quantitative RT-PCR 法を用いて測定する。

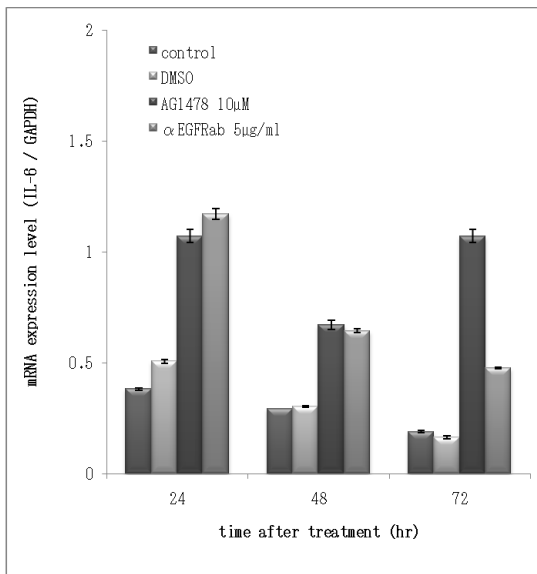
## 4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞における EGFR 阻害剤による IL-6 の産生促進の検討

① 頭頸部癌の細胞株である HSC-3 を EGFR-tyrosine kinase inhibitor (AG1478) 及び EGFR 抗体で処理し、24、48、72 時間後に培養上清を採取した。HSC-3 から産生された IL-6 の量を定量するため、培養上清中の IL-6 の量を ELISA 法を用いて測定した。その結果、どの時間においても EGFR 阻害剤で処理すると IL-6 の発現量が増加していた。



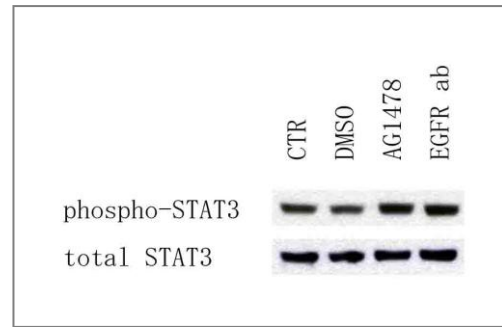
② HSC-3 を EGFR 阻害剤で処理し、24、48、72 時間後に RNA を抽出し、real-time quantitative RT-PCR 法にて IL-6 の量を定量した。その結果、培養上清同様、どの時間においても EGFR 阻害剤で処理すると IL-6 の発現量が増加していた。



(2) EGFR阻害剤で処理したHSC-3からIL-6が産生されるメカニズムの検討

IL-6により活性化されると考えられる転写因子のリン酸化を検出するため、AG1478及びEGFR抗体で処理をした腫瘍細胞からタンパク質を分離し、ウェスタンブロッティング法を用いて種転写因子の発現と活性化を検出した。その結果、AG1478でもEGFR抗体でもSTAT3のリン酸化が誘導されており、IL-6に

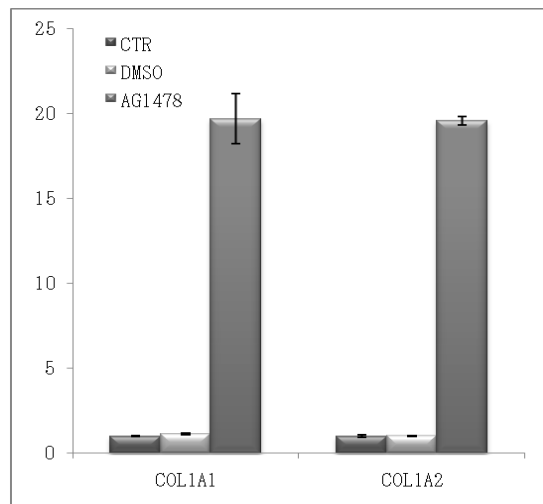
よって細胞が活性化されていることが判明した。



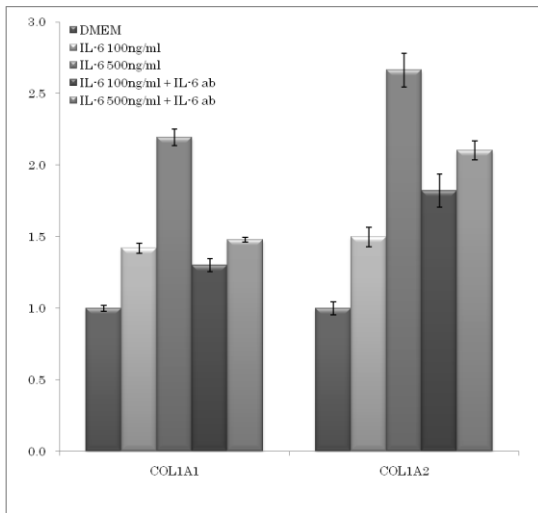
(3) 繊維芽細胞におけるコラーゲン遺伝子の発現の検討

線維芽細胞において、コラーゲン遺伝子の発現量増加が線維化の指標となるため、HSC-3から産生されるIL-6が線維化の原因となっているかどうかを検討した。

① HSC-3にEGFR阻害剤を作用させて培養し、その培養上清をコンディションメディウムとして線維芽細胞を培養し、その細胞におけるコラーゲン遺伝子の発現量をreal-time quantitative RT-PCR法を用いて検討したところ、コントロールのメディウムと比較して、AG1478を作用させたHSC-3の培養上清で培養した線維芽細胞においてコラーゲン遺伝子の発現量が増加していた。



② 線維芽細胞をIL-6存在下で培養し、同様にコラーゲン遺伝子の発現量を測定したところ、IL-6の濃度依存的にコラーゲン遺伝子 (COL1A1, COL1A2) の発現量が増加し、その発現はIL-6の中和抗体により抑制されることが判明した。



## 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 7 件)

- ① Ishiguro H, Akimoto K, Nagashima Y, Kojima Y, Sasaki T, Ishiguro-Imagawa Y, Nakaigawa N, Ohno S, Kubota Y, Uemura H. aPKC $\lambda$ /iota promotes growth of prostate cancer cells in an autocrine manner through transcriptional activation of interleukin-6. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有, 106(38), 2009, 16369-74.
- ② Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Ozono S, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Kubota E, Hata R. Restoration of BRAK / CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 査読有, 100(11), 2009, 2202-9.
- ③ Kondo N, Tsukuda M, Ishiguro Y, Kimura M, Fujita K, Sakakibara A, Takahashi H, Toth G, Matsuda H. Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 査読有, 23(4), 2009, 957-63.
- ④ Taguchi T, Tsukuda M, Imagawa-Ishiguro Y, Kato Y, Sano D. Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell

lines to gefitinib. Oncol Rep. 査読有, 19(1), 2008, 65-71.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 加藤 靖正, 田口 享秀, 石黒 由香利, 佃 守. 頭頸扁平上皮癌において、GefitinibはBRAK/CXCL14の発現を介して抗腫瘍効果を示す. 第22回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2009, 12, 大阪.
- ② 小澤 重幸, 加藤 靖正, 伊藤 慎, 小森 令賀, 椎木 直人, 槻木 恵一, 前畑 洋次郎, 田口 享秀, 石黒(今川)由香利, 佃 守, 畑 隆一郎, 久保田 英朗. ケモカイン BRAK/CXCL14 をマーカー分子とした頭頸部扁平上皮癌への新たな併用療法の試み. 第19回日本口腔粘膜学会総会・学術集会, 2009, 6, 葉山町.
- ③ 石黒 由香利, 石黒 斉, 佃 守. Fibrosis of normal lung cells is caused by some particular factors from cancer cells treated with EGFR-TKI. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, 10, 名古屋.
- ④ 石黒 斉, 秋本 和憲, 長嶋 洋治, 小島 康幸, 石黒 由香利, 佐々木 毅, 上村 博司, 大野 茂男, 窪田 吉信. The role of aPKC  $\lambda$  in prostate cancer progression. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, 10, 名古屋.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 由香利 (ISHIGURO YUKARI)  
横浜市立大学・医学研究科・特任助教  
研究者番号：00423830