

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791619

研究課題名（和文）EGFR阻害剤による急性肺障害発症のメカニズム解明とその抑制方法の開発

研究課題名（英文）Investigation to elucidate the mechanism of the onset of acute lung injury 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）：上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）は重篤な副作用である急性肺障害が問題となっているが、その原因はいまだにわかっていない。そこで本研究では、EGFR 阻害剤で処理した腫瘍細胞が肺の線維芽細胞の線維化を誘導するかどうかを検討した。その結果、EGFR 阻害剤により腫瘍細胞から産生される因子が肺線維芽細胞の線維化を促進し、急性肺障害の原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)-tyrosine kinase inhibitor (TKI), although that cause is still unknown. In the present study, we investigated that cancer cells treated with EGFR blocker induce fibrosis of human lung fibroblast. These data suggested that acute interstitial pneumonia was induced some unknown factors from cancer cells treated with EGFR blocker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、急性肺障害

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体（Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR）は、様々な悪性腫瘍で過剰発現しており、EGFR の阻害剤は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急性肺障害による死亡例が頻発しているため、その原因解明が急務となっている。そこで、この研究では EGFR に対する分子標的治療薬による急性肺障害の原因究明とその抑制方法を検討する。

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。そのため、EGFR に対する抗体や、EGFR のチロシンキナーゼ選択的阻害剤 (EGFR-TKI) が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。一方で、EGFR 阻害剤による重篤な副作用である急性肺障害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、急性肺障害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-TKI および EGFR 抗体で処理し、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、急性肺障害として発症する間質性肺炎のマーカーであ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 (Fibrosis of normal lung cells is caused by some particular factors from cancer cells treated with EGFR-TKI. Ishiguro Y, Ishiguro H, Tsukuda M. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008)。

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探索するため、EGFR 阻害剤で処理した腫瘍細胞からタンパクを抽出し、様々なタンパクの発現を一度に検出することのできるメンブレンアレイを用いて検討したところ、EGFR-TKI および EGFR 抗体で処理した細胞では何も処理をしていないコントロールの細胞と比べると、IL-6 の産生量が有意に亢進していた。そこで、IL-6 の存在下でヒト肺繊維芽細胞を培養したところ、大変興味深いことに、間質性肺炎のマーカーである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。以上のことから、IL-6 が間質性肺炎の原因であると考えられた (投稿準備中)。なお、ここまでの研究は、平成 20 年度および平成 21 年度交付を受けた科学研究費補助金「若手研究(B)」で明らかにした。

そこで今回の研究では、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三次元共培養システムを用いて解明する。さらに、IL-6 の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急性肺障害として発症する間質性肺炎の抑制方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) EGF で刺激した腫瘍細胞におけるシグナル伝達分子の動きをウェスタンブロッティング法を用いて検討する。さらに、EGFR 阻害

剤でそれらの分子がどのように動くかを同様にウェスタンブロッティング法にて検討する。

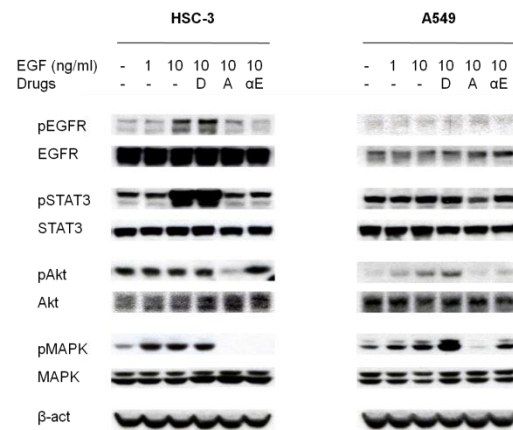
(2) サイトカインアレイを用いて EGFR 阻害剤で刺激した腫瘍細胞から産生される因子を検討する。

(3) 肺線維芽細胞を IL-6 存在下で培養し、線維化が起こるかどうかをウェスタンブロッティング法および realtime PCR にて検討する。

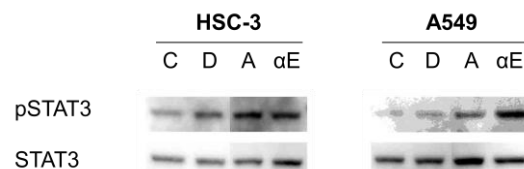
(4) 腫瘍細胞と肺線維芽細胞を 3 次元共培養し、肺線維芽細胞において線維化が起きているかどうかをウェスタンブロッティング法および realtime PCR にて検討する。

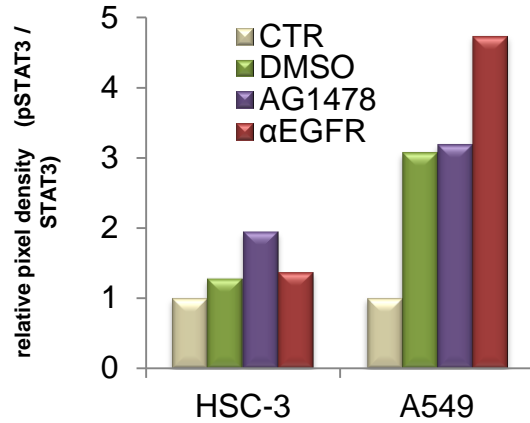
4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞を EGF で刺激をすると EGFR がリン酸化され、その下流シグナル伝達分子である STAT3, Akt, MAPK もリン酸化され、そのリン酸化は EGFR 阻害剤で抑制された。

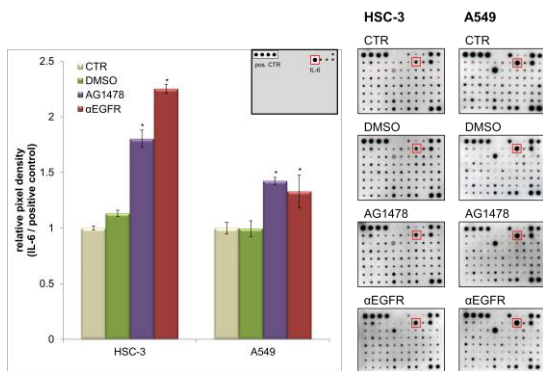


しかし、EGFR 阻害剤を腫瘍細胞に長時間作用させるとリン酸化が抑制されていた STAT3 が再びリン酸化されていることが判明した。

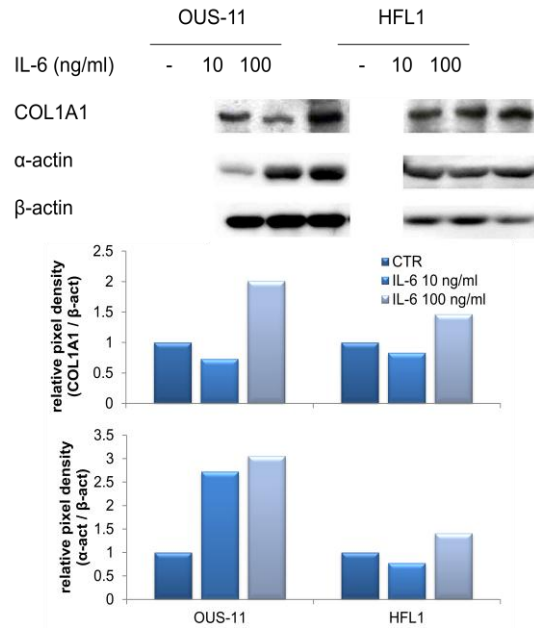




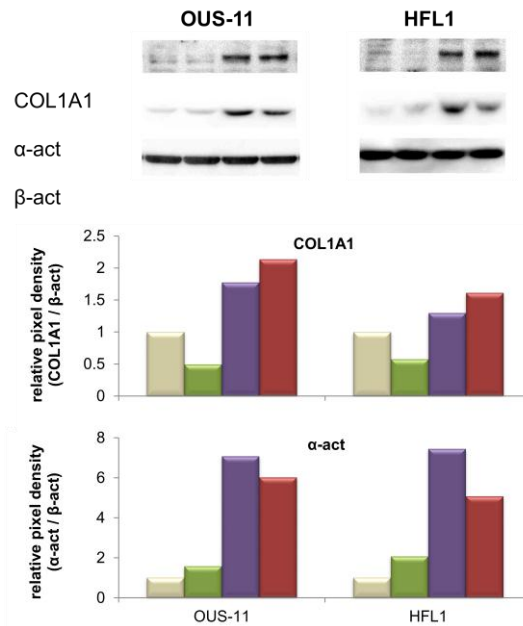
(2) STAT3 のリン酸化が EGFR 阻害剤によって起こる原因を究明するため、サイトカインアレイを用いて検討を行ったところ、EGFR 阻害剤を作用させた腫瘍細胞では IL-6 の産生量が増加していることが判明した。



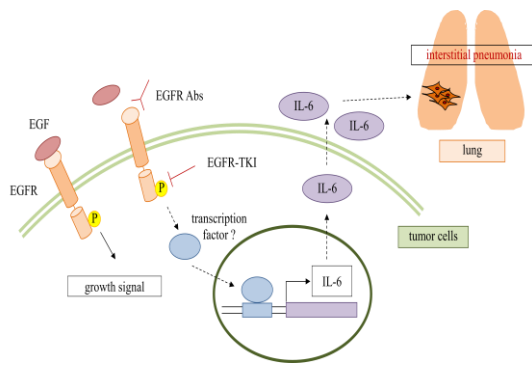
(3) IL-6 が肺線維芽細胞における線維化の原因となっているかを検討するため、肺線維芽細胞を IL-6 で刺激したところ、線維化のマーカである COL1A1 及び α-actin の発現量が増加していた。



(4) 腫瘍細胞と肺線維芽細胞を 3 次元共培養して、これまでの現象が起こるかどうかを検討したところ、同様の結果が得られた。



以上の結果より、EGFR 阻害剤により何らかの原因で IL-6 の産生量が増加し、その IL-6 によって肺線維芽細胞の線維化が起こるのではないかと考えられた



()

研究者番号：

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 2 件)

- ① Sakakibara A, Tsukuda M, Kondo N, Ishiguro Y, Kimura M, Fujita K, Takahashi H, Matsuda H. Examination of the optimal condition on the in vitro sensitivity to telomelysin in head and neck cancer cell lines. *Auris Nasus Larynx*. 査読有, 38(5), 2011, 589-99.
- ② 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), 2011, 957-63.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 石黒 由香利, 石黒 齊, 佃 守. Cancer cells treated with EGFR blocker induce fibrosis of normal human fibroblast cells. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010, 9, 24. 大阪国際会議場 (大阪)

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者