

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390147

研究課題名(和文)次世代肺がんチロシンキナーゼ阻害薬の感受性マーカーの同定と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of target for next generation tyrosine kinase inhibitor and clinical markers for sensitive patients

研究代表者

高井 大哉 (Takai, Daiya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肺がんは現在毎年6万人以上が命を落とす、がん死における最も多いがんである。申請者らは、最近の分子標的薬開発の状況に鑑み、ALKチロシンキナーゼと相同性の高いチロシンキナーゼの発現状況を網羅的に解析し、新たな治療標的となる分子FERを同定した。FERを過剰に発現する肺がん細胞株NCI-H661細胞において、FERをsiRNAベクターによって発現抑制すると、細胞はアポトーシスに至ることが明らかになった。また肺がん切除例における病理標本での検討から、FER過剰発現例は原発性肺がんの約10%で過剰発現を認め、予後が不良であった。これらの結果を論文にて報告した。

研究成果の概要(英文)：In Japan, more than sixty thousand patients are killed by lung cancer a year. Recent progress in development of molecular targeting medicine, we analyzed expression level of tyrosine kinases which have homology with ALK tyrosine kinase. We identified FER as possible target gene. In NCI-H661 cells, FER was overexpressed and knockdown of FER by siRNA induced apoptosis of the cells. In clinical specimens, approximately ten percent of lung cancer overexpressed FER and their postoperative outcome was poorer. We published these data and started collaboration with pharmaceutical company to develop FER inhibitors to cure lung cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：肺がん チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

2002年に上皮成長因子受容体(EGFR)阻害薬である gefitinib(イレッサ®)が市販され、肺がんの治療は新しい時代に入った。それまでの細胞傷害性抗がん剤と異なり、2004年に明らかにされたEGFRに変異のある症例については極めて高い治療効果を示し、耐性獲得や脳転移に効果が無いなどの問題はあつたものの、その効果はめざましかった。さらには2007年に本邦の間野・曾田らによってEML4-ALKの融合遺伝子が発見され、ALK阻害薬の crizotinib(ザコーリ®)も治験に入り、めざましい効果を示したことから、新規標的分子の探索が焦眉の課題となつた。

2. 研究の目的

当時の現状に鑑みて、少なくとも肺腺がんでは、未知のチロシンキナーゼなど標的分子が存在することが期待されたため、新規標的の探索を行い、実際に、同定された遺伝子の原発性肺がんにおける発現と臨床像の比較や、過剰発現している細胞株における、遺伝子発現抑制がどのような効果を及ぼすかについて検討を行う。このようにして、新規治療標的遺伝子の同定と、その治療標的としての可能性について検討する。

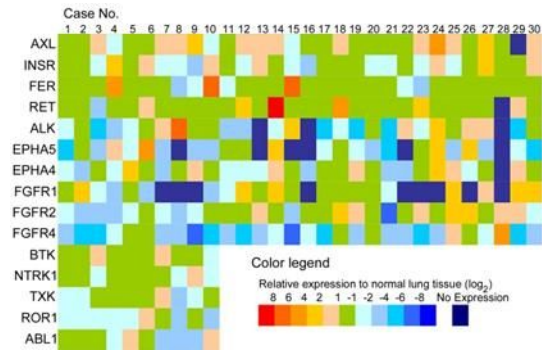
3. 研究の方法

EML4-ALK融合遺伝子を構築するALKは強いがん遺伝子であることから、ALKのチロシンキナーゼドメインと相動性の高い遺伝子について肺腺がん30例における発現量を検討し、過剰発現を認める遺伝子について、5'RACE法で融合を認めるか検討を行う。過剰発現のあるがんとそうでないがんについて臨床・病理的な検討を加えつつ、また、その遺伝子を過剰に発現している細胞株の探索を行い、siRNAで遺伝子発現抑制を行ったときの細胞増殖やアポトーシスについて検討を加える。

4. 研究成果

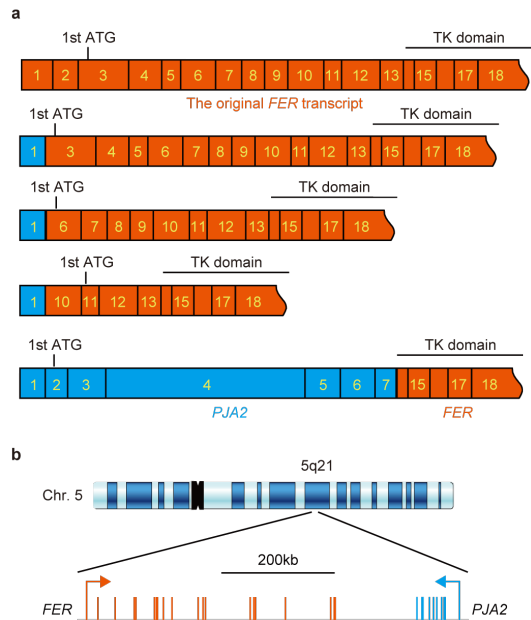
原発性肺腺がん30例におけるALK相同遺伝

子の発現状況をチロシンキナーゼドメインの部分でRT-PCRを行い検討した。FERチロシンキナーゼで3例で過剰発現を認めた。



チロシンキナーゼの発現状況 FERで症例4,10,15の3例で過剰発現を認める(30遺伝子の解析から抜粋)また、RETで症例6,14,18で過剰発現を認める。

FERについては、5'RACEにより、症例10のFERの5'側を決定したところ、隣接するPJA2遺伝子とのキメラトランスクリプトを認めたが、ゲノムレベルでは転座を認めず、トランスクリプトによるものと考えた。

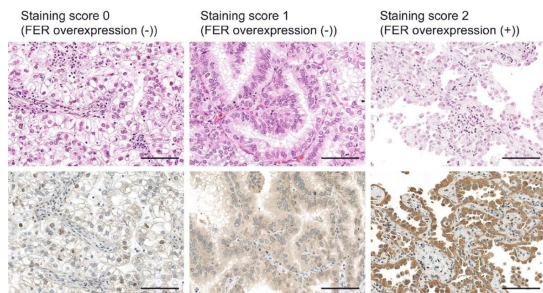


FERとPJA2のトランスクリプト。PJA2とFERは染色体5番長腕で互いに向き合う位置にあるが、キメラトランスクリプトを認める症例でも、染色体の転座は認めなかつた。

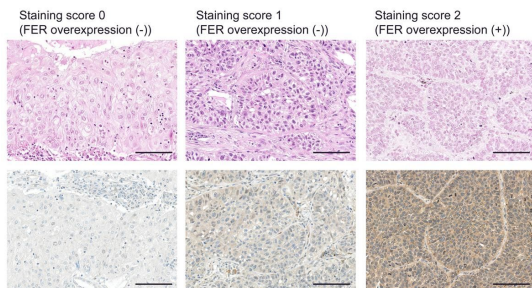
実際に、FER過剰発現症例では、FERとPJA2

のキメラトランスクリプトが認められ、PJA2 はほぼ全組織で発現している遺伝子であるため、FER の過剰発現に伴い PJA2 とのキメラトランスクリプトが発現していると考えられた。

次に、FER 過剰発現の臨床例における解析を行った。FER を免疫染色で確認したところ、腺がん、扁平上皮がんともに過剰発現が認められた。



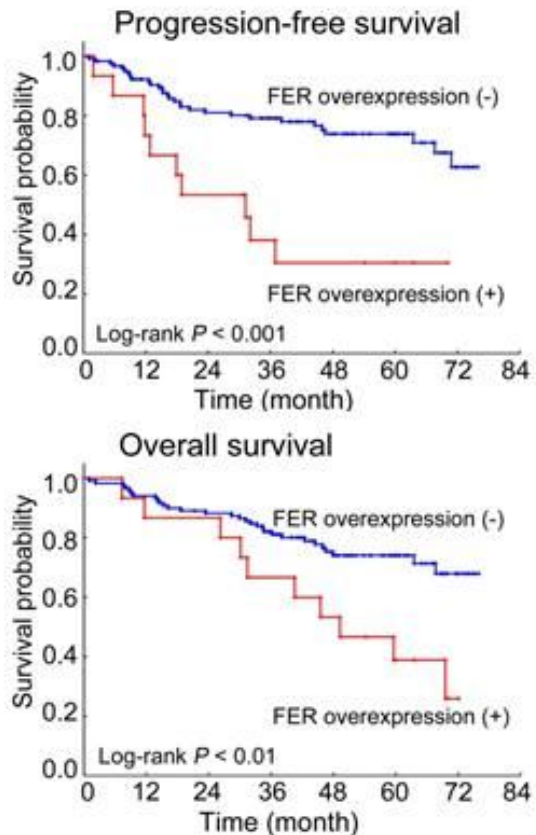
肺腺がんにおける FER の免疫染色



肺扁平上皮がんにおける FER の免疫染色

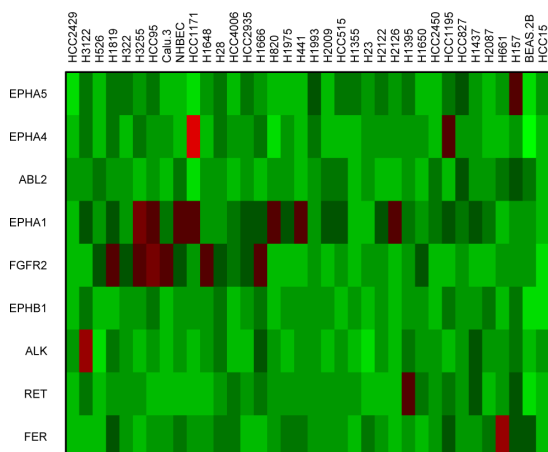
FER の免疫染色では、腺がんでは検討した 236 例中 24 例が過剰発現、扁平上皮がんでは 127 例中 7 例で過剰発現を認めた。6 例の小細胞がん、6 例の多型がんでも検討を行ったが、FER の過剰発現は認められなかった。6 例の大細胞がんでは 1 例で過剰発現が認められたが、いずれも少数例での検討であり、その頻度については、腺がん、扁平上皮がんと比べて正確なものではない。

つぎに、FER の発現状態と術後の予後について検討を行ったところ、FER 過剰発現の見られる肺がんでは、術後再発までの期間及び全生存期間の短縮が認められた。



FER 過剰発現と術後予後との相関。FER 過剰発現のある肺がんでは、術後再発の頻度が高く、全生存期間の短縮が見られた。

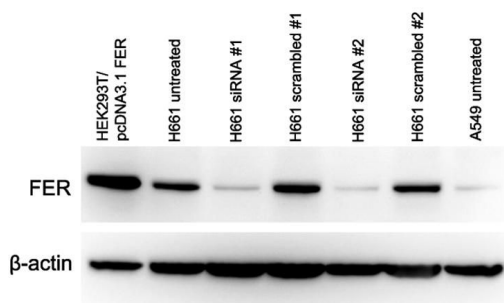
次に FER の肺がん細胞株における発現状況を、アメリカ生物情報研究所 (NCBI) で公開されている発現プロフィールを用いて検索を行ったところ、NCI-H661 株で FER の過剰発現を認めた。



FER 過剰発現細胞の検索 (抜粋)。H661 で FER の過剰発現を認める。

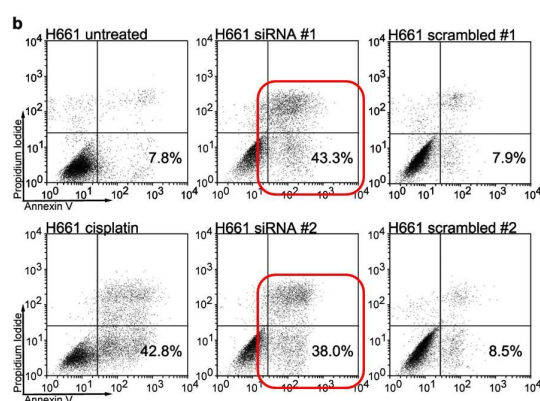
そこで、FER に対する、siRNA 発現ベクターを構築し、2 つの異なる配列で、FER の発現

抑制に成功した。また併せてこれらの siRNA について、scramble control を作成し、FER の発現に影響のないことを確認した。



ヘアピン siRNA ベクターによる FER の発現抑制。ヘアピン siRNA ベクターにより FER の発現抑制が起きている。またコントロールとして、FER の過剰発現のない A549 細胞では FER の発現は弱いながらも認められる。

FER に対する siRNA ベクターの導入により細胞死が見られたことから、フローサイトメトリーによるアポトーシスの解析を行ったところ、FER の発現抑制により NCI-H661 細胞でアポトーシスが生じていることが明らかになった。



FER の siRNA ベクターによる発現抑制によるアポトーシス 2 つの異なる配列で FER の発現を抑制するといずれもアポトーシスを生じている。Cisplatin は positive control。Negative control の scrambled 配列のベクターではアポトーシスの亢進はない。

以上の結果から、FER は肺腺がんの約 10%で

過剰発現をしており、その予後は悪いが、過剰発現症例で、治療標的となり得ることが示された。

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15件)

- Suppression of Tgfβ1 in lung alveolar epithelium-derived cells using adeno-associated virus type 2/5 vectors to carry short hairpin RNA. Kage H, Sugimoto K, Sano A, Kitagawa H, Nagase T, Ohishi N, Takai D. **Experimental Lung Research**. 37(3):175-185, 2011
- Polymerase reaction without primers throughout for the reconstruction of full-length cDNA from products of rapid amplification of cDNA ends (RACE). Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Watanabe K, Emoto N, Nagase T, Ohishi N, Takai D. **Biotechnol Lett** 33(7):1301-1307, 2011
- CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. Kitano K, Watanabe K, Emoto N, Kage H, Hamano E, Nagase T, Sano A, Murakawa T, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. **Cancer Sci** 102(12):2126-2131, 2011
- Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. **Int J Cancer** 130(11):2580-2590, 2012
- Pulmonary Venous Invasion, Determined by Chest Computed Tomographic Scan, as a Potential Early Indicator of Zygomycosis Infection: A Case Series. Kitagawa H, Watanabe K, Kage H, Inoh S, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D. **J Thorac Imaging**

27(4):W97-99, 2012

6. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1 and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, Sasaki H, Uozaki H, Fukayama M, Seto Y, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. **Jpn J Clin Oncol.** 42(2):148-152, 2012

7. Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model. Yamauchi H, Motomura N, Chung UI, Sata M, Takai D, Saito A, Ono M, Takamoto S. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 145(2):522-530, 2013

8. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1 family polypeptide A1 gene (UGT1A1) polymorphisms are associated with toxicity and efficacy in irinotecan monotherapy for refractory pancreatic cancer. Takahara N, Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Satoh Y, Takai D, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Miyabayashi K, Mohri D, Kawakubo K, Kogure H, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Ijichi H, Tada M, Yatomi Y, Koike K. **Cancer Chemother Pharmacol.** 71(1): 85-92, 2013

9. High-grade lung adenocarcinoma with fetal-lung-like morphology – Clinicopathological, immunohistochemical, and molecular analyses of 17 cases. Morita S, Yoshida A, Goto A, Ota S, Tsuta K, Yokozawa K, Asamura H, Nakajima J, Takai D, Mori M, Oka T, Tamaru J, Itoyama S, Furuta K, Fukayama M, Tsuda H. **American J of Surg. Pathology.** 37(6):924-932, 2013

10. FER overexpression is associated with poor postoperative prognosis and cancer-cell survival in non-small cell lung cancer. Kawakami M, Morita S, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Watanabe K, Hamano E, Ohishi N, Nakajima J, Yatomi Y, Nagase T, Fukayama M, Takai D. **Int J Clin Exp Pathol.** 6(4):598-612, 2013

11. A pilot study of salvage irinotecan monotherapy for advanced biliary tract cancer. Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Takahara N, Satoh Y, Takai D, Kogure H, Yamamoto N, Hirano K, Tada M, Yatomi Y, Koike K. **Anticancer Res.** 33(6):2619-2622, 2013

12. Combined Large Cell Neuroendocrine Carcinoma and Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in a Female Patient Who Never Smoked. Yoshida Y, Ota S, Murakawa T, Takai D, Nakajima J. **Ann Thorac Cardiovasc Surg.** 2013 Epub ahead

13. Detection of novel paraja ring finger 2-fer tyrosine kinase mRNA chimeras is associated with poor postoperative prognosis in non-small cell lung cancer. Kawakami M, Ishikawa R, Amano Y, Sunohara M, Watanabe K, Ohishi N, Yatomi Y, Nakajima J, Fukayama M, Nagase T, Takai D. **Cancer Sci.** 104(11): 1447-1454, 2013

14. Successful Treatment of Mediastinal Unicentric Castleman's Disease Using Video-Assisted Thoracoscopic Surgery with Preoperative Embolization. Amano Y, Takai D, Ohishi N, Shinozaki-Ushiku A, Fukayama M, Akahane M, Nakajima J, Nagase T. **Case Rep Med.** 2013: 354507, 2013

15. Disruption of the expression and function of microRNAs in lung cancer as a result of epigenetic changes. Watanabe K & Takai D. **Frontiers in Genetics** 4: 275, 2013

〔学会発表〕(計 8件)

1. Crosstalk Between Alveolar Epithelial Cells And Fibroblasts Through Transforming Growth Factor β 1 And Prostaglandin Synthase 2 Results In Suppression Of Fibroblast Growth. Kage H, Amano Y, Ishikawa R, Sunohara M, Kawakami M, Emoto N, Watanabe K, Hamano E, Ohishi N, Nagase T, Takai D. American Thoracic Society International Conference, May 13th – May 18th, 2011, Denver, CO, USA

2. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and the recurrence of non-small cell lung cancer. Kitano K, Goto A, Fukayama M, Watanabe K, Emoto N, Kage H, Hamano H, Nagase T, Sano A, Murakawa T, Nakajima J, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 8th – Jan 11th, 2012, San Diego, CA, USA

3. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small cell lung cancer. Watanabe K, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Emoto N, Hamano E, Amano Y, Ishikawa R, Sunohara M, Kawakami M, Kitano K, Nakajima J, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 8th – Jan 11th, 2012, San Diego, CA, USA

4. Vandetanib Can Overcome the Acquired Resistance to Gefitinib Due to RET Overexpression in Lung Cancer. Sunohara M, Kawakami K, Watanabe K, Morita S, Kage H, Amano Y, Fukayama M, Nagase T, N. Ohishi N, Takai D. The 24th EORTC-NCI-AACR Symposium on ‘Molecular Targets and Cancer Therapeutics’ Nov 6th –Nov 9th, 2012, Dublin, Island

5. Identification of FER as a New Molecular Target in Non-small Cell Lung Cancer Kawakami M, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Watanabe K, Hamano E, Ohishi N, Nagase T, Yatomi Y, Takai D. The 24th EORTC-NCI-AACR Symposium on ‘Molecular Targets and Cancer Therapeutics’ Nov 6th –Nov 9th, 2012, Dublin, Island

6. Loss of PABPN1 and alternative polyadenylation yield poor prognosis in non-small cell lung cancer. Ichinose J, Watanabe K, Sano A, Nagase T, Nakajima J, Fukayama M,

Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 6th – Jan 9th, 2014, San Diego, CA, USA

7. Can lung cancer with overexpression of RET-*proto* oncogene be a good candidate for vandetanib treatment? Sunohara M, Morita S, Kawakami M, Watanabe K, Kage H, Amano Y, Ishikawa R, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 6th – Jan 9th, 2014, San Diego, CA, USA

8. Histone methylation-mediated silencing of mir-139 enhances an aggressive phenotype of non-small cell lung cancer. Watanabe K, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Ichinose J, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Nagase T, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 6th – Jan 9th, 2014, San Diego, CA, USA

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kokyuki.umin.jp/305.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 大哉 (TAKAI, Daiya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361493

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし