

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501306

研究課題名(和文)肺癌におけるcMetとTopoisomerase Iの関連

研究課題名(英文)Relation cMet and Topoisomerase I in lung cancer

研究代表者

笠原 寿郎 (Kasahara, Kazuo)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30272967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の治療では個別化療が進歩している。cMetは増殖因子受容体で、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する薬剤耐性因子として重要である。DNAトポイソメラーゼI(Topoi)はDNA複製に必要で、イリノテカンの標的酵素である。我々はこの二つの関連に注目している。我々は肺癌細胞株を用いてcMetがTopoiの発現を調整しており、Topoi阻害剤であるイリノテカンの感受性を規定することを示した。さらに肺癌症例の病理検体でMet蛋白とTopoiが関連していることを示し、さらにcMet蛋白が化学療法を受けた症例の予後因子であることを証明した。本研究は肺癌治療の個別化療法の進歩に有意義と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Personalized therapy progresses in the treatment of the lung cancer. cMet is important as a drug-resistant factor for the EGFR tyrosine kinase inhibitor. DNA topoisomerase I (Topoi) is necessary for replication of DNA and is a target enzyme of irinotecan. We focused on the relation between these two proteins. cMet up-regulate expression of Topoi in lung cancer cell lines, and we showed that it prescribed sensitivity of irinotecan, a Topoi inhibitor. Furthermore, We showed that Topoi correlated to Met protein in the tumor sample of the lung cancer patients and that cMet protein was the prognostic factor. As for this study, it is significant for progress of the personalized therapy for lung cancer treatment.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：肺癌 cMet Topoisomerase I 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

肺癌の治療は、近年の分子生物学の進歩と大規模臨床試験により分子標的が同定され、細分化されるようになってきた。我々は増殖因子受容体であり、かつ EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤の耐性因子として重要な cMet に注目している。また DNA トポイソメラーゼ I (TopoI) は DNA 複製に必要で、イリノテカンの標的酵素である。我々は cMet と TopoI の関連に注目した。

2. 研究の目的

本研究は肺癌における cMet と TopoI の関連を明らかにすることであり、cMet が TopoI の上流にあり cMet の刺激を介して TopoI の発現が調整されていると仮説した。この研究により cMet 高発現悪性腫瘍に新しい治療戦略を構築することである。

3. 研究の方法

まず第一の研究として、ゲフィチニブ耐性で cMet 蛋白高発現の肺癌株 PC-9/Met と親株である PC-9 を用いて、Met 蛋白発現と TopoI 蛋白・活性・mRNA 発現の程度に関連をそれぞれ western blot 法、RT-PCR 法を用いて解析した。また cMet の離岸度である HGF による Met 刺激および siRNA を用いた Met の阻害実験を行った。さらに cMet の過剰発現細胞株 (EBC-1, H441)、cMet 低発現細胞株 (A549, H2228)、PC-9 及び PC-9/Met を含む 8 種類の細胞株で Western blot 法で検討した。TopoI 阻害剤である SN38 に対する感受性は WST 法を用いて行った。

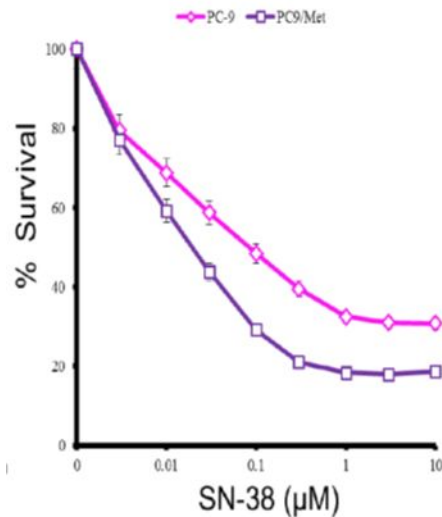
細胞株で得られた知見を臨床検体で確認する目的で小細胞肺癌 78 例の腫瘍組織を用いて、cMet、pMet、TopoI を免疫組織学的に解析し臨床情報と比較検討した。

4. 研究成果

ゲフィチニブ耐性で cMet 蛋白高発現の肺癌株 PC-9/Met と親株である PC-9 を用い

た検討から、cMet 高発現株である PC-9/Met は TopoI 阻害剤である SN38ni に対して抗感受性を示した (図 1)。

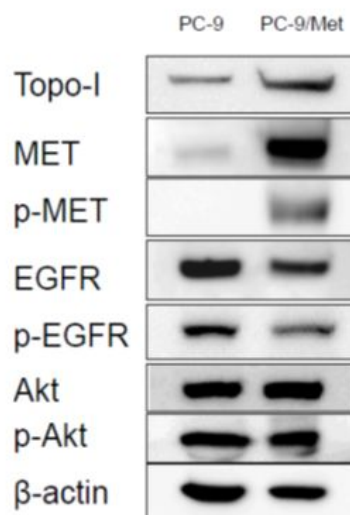
図 1 SN38 に対する感受性の結果
PC-9/Met は PC-9 に比較して約 3 倍高感受性であった



次に Met 蛋白発現と TopoI 蛋白・活性を検討した。PC-9/Met では Met 蛋白の抗発現を認めるがこれに加えて核蛋白中の TopoI 蛋白の高発現、TopoI 活性の上昇を認めた (図 2)

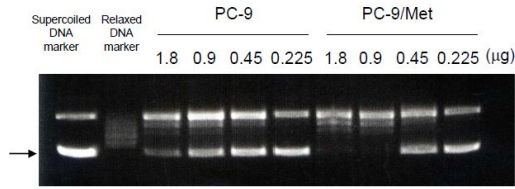
図 2 蛋白発現の結果

【蛋白発現】



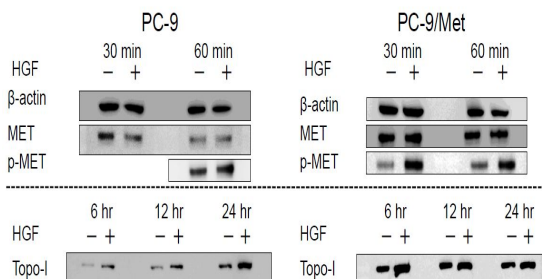
TopoI 活性

【Topo I activity】



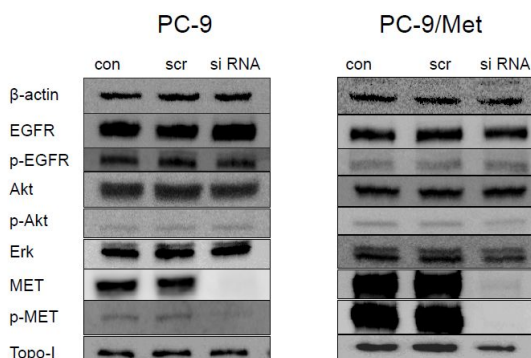
HGF による Met 刺激実験では刺激により両細胞株でリン酸化 Met(pMet)の更新が確認され、HGF が Met を刺激していることが確認できる。この Met の活性化に伴い核内の TopoI 蛋白の発現更新が確認された(図 3)。

図 3 HGF による cMet の刺激により TopoI 蛋白が誘導された



siRNA を用いた Met の阻害実験の結果では Met 発現を抑制し、Met 蛋白・活性を枯渇することにより TopoI 蛋白も低下した(図 4)

図 4 siRNA により Met 蛋白を阻害したところ TopoI 蛋白も低下した



以上の結果から PC-9 および PC-9/Met の系においては、TopoI は cMet による発現調整を受けていることが明らかとなった。さらに cMet 高発現細胞は TopoI 阻害剤に対して高感受性であることも示された。

次に cMet の過剰発現細胞株 (EBC-1, H441)、cMet 低発現細胞株(A549, H2228)、PC-9 及び PC-9/Met の 8 種類の細胞株を用いて解析した。各種細胞の Met 発現量は差があるものの cMet 発現と TopoI 発現には関連があり、また cMet 高発現細胞は SN38 に対しても高感受性であった。

次に細胞株で得られた知見を臨床検体で解析を行った。金沢大学附属病院呼吸器内科で診療を受けた小細胞肺癌 78 例の腫瘍組織を用いて、cMet、pMet、TopoI を免疫組織学的に解析し臨床情報と比較検討した。

表 1

年齢	≤64/≥65(中央値)	33/45	67
性別	女性	16	20.5%
	男性	62	79.5%
喫煙歴	非喫煙者	2	2.6%
	喫煙者	76	97.4%
ハートフォードステータス	0,1	67	85.9%
	2,3,4	11	14.1%
臨床病期	限局型	44	57.1%
	進展型	33	42.9%
一次化学療法	Pt + CPT11	13	17.1%
	CPT11+GEM	1	1.3%
	Pt+VP16	58	76.3%
	Pt+VP16+VCR	4	5.3%

表 1 に症例の背景を示した。小細胞肺癌においては重喫煙者が多く、また限局型・進展型ほぼ同数であった。イリノテカンを含む化学療法は 14 例で施行されていた。腫瘍検体を免疫組織学的に評価したところ

cMet は 37.7%、pMet は 29.3%、TopoI は 51.3%の症例でそれぞれ陽性であった。TopoI の蛋白発現と pMet の間に有意な相関が認められた。これは細胞実験における知見を裏打ちするものと考えられる(表 2)。

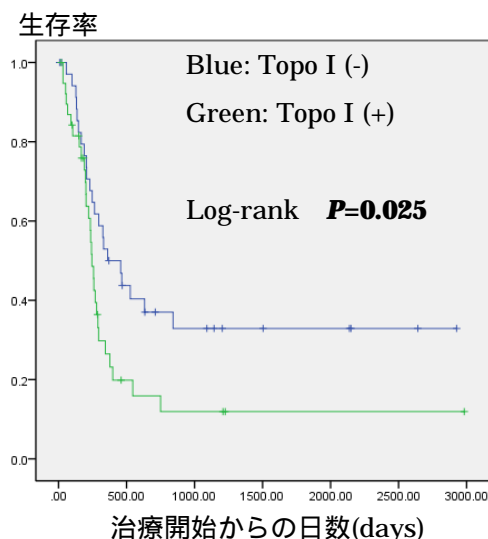
表 2 TopoI と pMet の関連

		p-Met	
		陰性	陽性
Topo I	陰性	15	20
	陽性	7	31

P=0.023

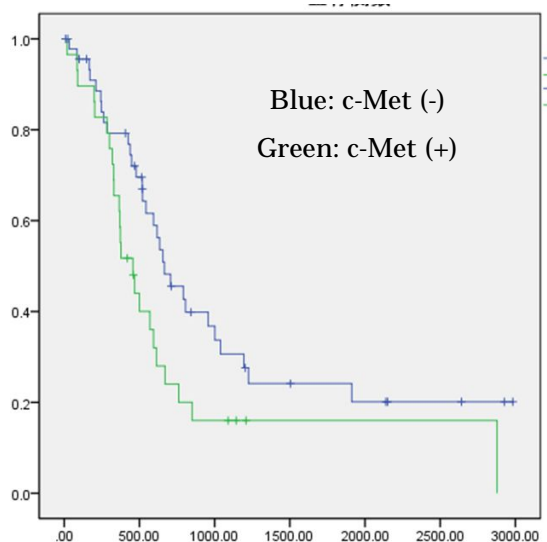
cMet と TopoI 発現の抗腫瘍効果、生存期間に与える影響について解析した。TopoI 発現は全症例を含んだ解析においては陽性症例では無増悪生存期間、全生存期間ともに有意に短く(無増悪生存期間 陽性症例 35 週 vs 陰性症例 51 週、 $p=0.025$ (図 5) 全生存期間 71 週 vs 90 週 $p=0.026$) 予後不良であった。少数例ではあるが TopoI 阻害剤である CPT-11 投与症例では抗腫瘍効果が高かった。

図 5 TopoI 発現の程度による生存期間；無増悪生存期間



cMet 発現の程度と化学療法に対する反応性(奏効割合)、化学療法の無増悪生存期間との間には関連は見られなかった。cMet 蛋白発現陽性症例と陰性症例では全生存期間を検討した。cMet 陽性症例の全生存期間中央値は 43 週であり、cMet 陰性症例では 66 週であった。cMet 陽性症例の予後は有意に不良であった(図 6)。

図 6 cMet 発現状態による全生存期間の比較 $p=0.036$ (Log-rank 解析)



多変量解析の結果を表 3 に示した。から cMet 陽性は小細胞肺癌における独立した予後因子であることも明らかとなった。

因子	ハザード比	95%信頼区間	p 値
c-Met	2.793	1.449 to 5.386	0.002
性別	1.469	0.604 to 3.083	0.397
喫煙歴	0.579	0.101 to 3.571	0.540
PS	2.137	0.878 to 3.327	0.094
臨床病期	2.954	1.562 to 5.202	0.001
年齢	0.858	0.471 to 5.59	0.616
Topo I	1.655	0.888 to 3.083	0.113

以上の結果から肺癌において、cMet と TopoI は明らかに関連しており、cMet は TopoI を up-regulate していると考えられる。cMet 陽性の肺癌症例は予後不良であり、これらに対する治療戦略の確立は急務である。TopoI 阻害剤は基礎実験で示されたように cMet 高発現細胞株に高い感受性を有しているため、予後不良の肺癌症例の治療戦略として有望である。

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4件)

1, Tomoyuki Araya, Kazuo Kasahara, Shingo Nsihikawa, Hdeharyu Kimura, Takashi Sone, H Nagae, Y Ikehata, I Nagano, M Fujimura. Antitumor effects of inductive hyperthermia using magnetic ferucarbotran nanoparticles on human lung cancer xenografts in nude mice. *Onco Targets Ther.* 2013; 6: 237-242. doi: 10.2147/OTT.S42815 (査読あり)

2, Watanabe S1, Sone T, Matsui T, Yamamura K, Tani M, Okazaki A, Kurokawa K, Tambo Y, Takato H, Ohkura N, Waseda Y, Katayama N, Kasahara K. Transformation to small-cell lung cancer following treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors in a patient with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 82, 2, 2013, 370-372
10.1016/j.lungcan.2013.06.003(査読あり)

3, Sakai A. Kasahara K. Sone T. Detection of EGFR T790M Mutation in Pericardial Effusion from a Non-Small Cell Lung Cancer Patient with Erlotinib Therapy. *Case Rep Oncol* 2013;6:15-20
(DOI:10.1159/000345947) (査読あり)

4, A Sakai, K Kasahara, T Ohomri, H Kimura, T Sone, M Fujimura, S Nakao. MET Increases the Sensitivity of Gefitinib-Resistant Cells to SN-38, an Active Metabolite of Irinotecan, by Up-Regulating the Topoisomerase I Activity. *Journal of Thoracic Oncology*: 2012 - Volume 7 - Issue 9 - p 1337-1344
doi: 10.1097/JTO.0b013e31825cca4c(査読あり)

[学会発表](計2件)

1 Hideko Ikeda, Kazuo Kasahara, Koji Kurokawa, et al Prognostic impact of cMet/phosphor-Met and Topoisomerase I in small cell lung cancer. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference 2012年11月26日-28日
ヒルトン福岡シーホーク(福岡県)

2 池田栄子, 笠原寿郎, 黒川浩二, ほか Prognostic impact of cMet/phosphor-Met and Topoisomerase I in small cell lung cancer. 第50回日本癌治療学会学術総会 2012年10月25日~27日
パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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 笠原 寿郎
(Kasahara Kazuo)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 3 0 2 7 2 9 6 7

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

