

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790892

研究課題名（和文） EGFR 変異陽性肺癌の発症関連因子の解析

研究課題名（英文） Why EGFR-mutant positive cancer preferentially arise from lung?

研究代表者 福原 達朗 (FUKUHARA TATSURO)

地方独立行政法人宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：80400365

研究成果の概要（和文）：Epidermal growth factor receptor (EGFR) 変異による細胞への効果を解析するため、変異 EGFR 発現ベクターを作成し、内因性 EGFR 陰性の細胞に導入した。変異型 EGFR 導入 K562 細胞では、ゲフィチニブ感受性を示した。さらに、耐性変異 T790M 陽性細胞は、ゲフィチニブ耐性を示した。EGFR を本来有しない細胞においても EGFR シグナル伝達経路は存在し、外来の変異 EGFR はそれを利用し、EGFR シグナル依存性を生むという結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：To clear the direct role of mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) in tumorigenesis, wild and mutant EGFR expressing cells were established using leukemic K562 cell line expressing no endogenous EGFR. These cell lines showed gefitinib-sensitivity, however, the EGFR T790M mutants expressing cells were gefitinib resistant. These results suggest that cells with wild or mutant EGFR are suitable for identification of oncogenic mechanism and mutant EGFR-induced addiction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：EGFR 変異陽性肺癌

1. 研究開始当初の背景

<EGFR 変異陽性肺癌の特徴>

EGFR（上皮増殖因子受容体）変異陽性肺癌は、近年増加傾向にある非喫煙者に発生する肺腺癌の一つである。EGFR-TKI（チロシンリン酸化酵素阻害薬：ゲフィチニブ、エルロチ

ニブ）という EGFR 変異陽性肺癌に対する特異的治療法が第一選択となるエビデンスとなったことは一筋の光明ではあるが、症例を蓄積し判明したこととして、根治にいたった症例はほとんどなく、数ヶ月から数年後に耐性化し、肺や脳、骨に再発する例が多く、依

然として長期予後は不良であり、発症機序の解明は重要である。

EGFR 変異陽性肺癌は、喫煙者に発生する肺癌と異なり発症の危険因子が不明であること、原発巣が小さいうちから遠隔転移しやすく、早期発見されにくく他臓器への転移による症状が発見の契機となることが多いことも特徴である。

<EGFR 変異陽性肺癌の疑問点>

肺癌で認められる EGFR 変異とは主に二種類の EGFR の変異をさす。一つは、exon 19 の欠失変異、もう一つは exon 21 の L858R の点突然変異である。これらの変異は EGFR を恒常的に活性化させ、実際にマウス肺に発現させると癌を形成することが報告されている

(Ji, et al. Cancer Cell, 2006)。一般的に EGFR は上皮系細胞にユビキタスに発現しており、多くの癌において EGFR の発現量の増加の報告がある。肺胞上皮細胞でもその他の臓器の細胞でも、EGFR 蛋白質そのものや塩基配列を変えるほどの細胞がうけるストレスにはおそらく違いはないと考えられるため、他の臓器細胞でも EGFR の上記変異は一定の確立で発生していることが予想される。しかし、上記の EGFR の変異を有する癌は、少数の例外を除けば、非小細胞肺癌のみである。この点から、以下の仮説が考えられる。すなわち「他臓器の細胞では、EGFR の上記変異が発生しても癌化しない。」

この仮説の傍証として、EGF によるシグナル伝達は頭頸部の扁平上皮癌細胞などの条件によっては、増殖抑制に働くという報告があげられる (Kamata et al. Cancer Reserch, 1986)。

2. 研究の目的

本研究では、他臓器細胞の EGFR 変異を発癌に結びつけない機序、逆に肺胞上皮細胞の発

癌に結びつける機序を明らかにし、EGFR 変異陽性肺癌の危険因子を同定し、早期診断法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

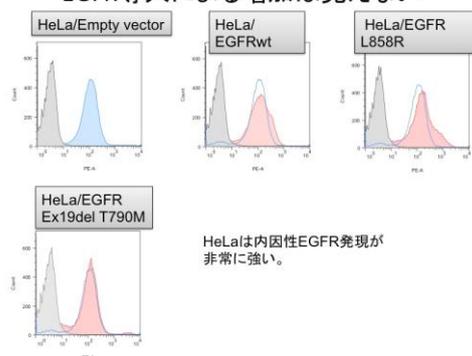
EGFR 変異の違いによる薬剤の効果の差異を解析するため、EGFR 発現レトロウイルスベクターを作成し、内因性の EGFR を持たない細胞に導入した。

解析に用いる遺伝子は以下の通りとした。EGFR 野生型 (EGFRwt). EGFRTKI 感受性の変異をもつもの、EGFR Exon19deletion: Δ 746-750 (Ex19del), EGFR Exon21 L858R (L858R). EGFRTKI 耐性である Exon20 T790M (T790M). 実際の臨床で見られる耐性パターンである, Ex19del+T790M, L858R+T790M. これらの遺伝子について pMXs-puro を元にレトロウイルスベクターを作成した。これらのベクターにより、他臓器由来の細胞株に変異 EGFR を強制発現させた。

4. 研究成果

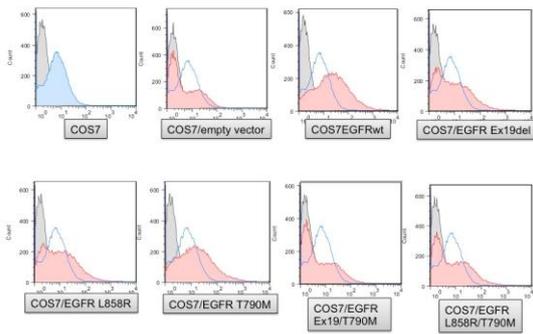
まず、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に EGFR 変異蛋白質をレトロウイルスベクターを用いて発現させた。

HeLa細胞は内因性EGFRが高度に発現しており、EGFR導入による増加は見えない



内因性の EGFR の発現量が高く、評価困難であった。続いて、アフリカミドリザル腎臓由来の COS7 に変異 EGFR を発現させた。

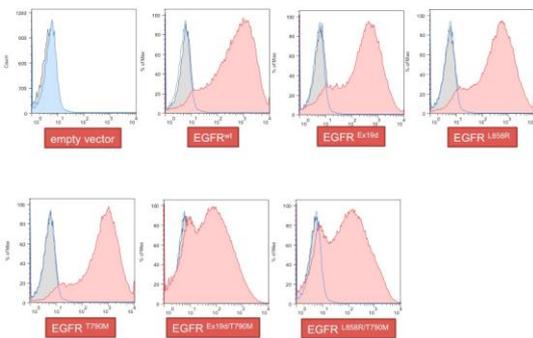
COS7細胞は内因性EGFRが中程度あり、EGFR導入による増加は軽度である



これまでの実験から少なくとも内因性のEGFRが機能している上皮系細胞においては、変異EGFRは発現の評価が困難であり、また発現したとしても細胞の増殖に関する影響は少ないと考えられた。

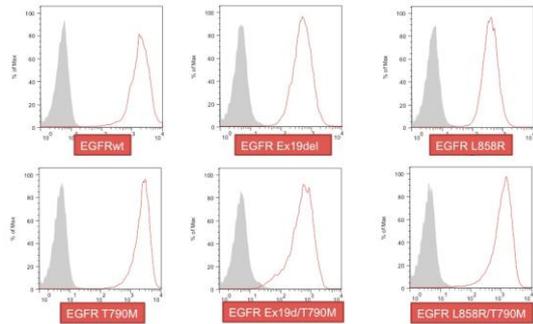
次に、変異EGFRにおける機能を評価するため、内因性EGFRの発現のない細胞による評価を行った。内因性EGFRを認めない白血病細胞株であるK562に変異EGFRを導入した。

変異EGFRを導入したK562細胞が樹立できた



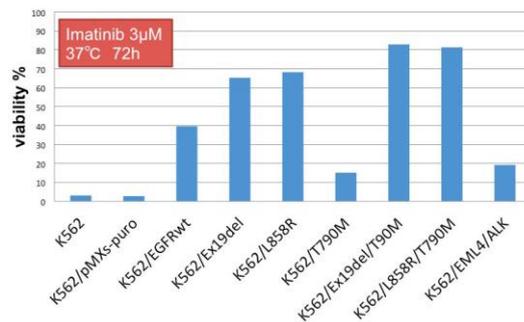
K562に関しては、EGFRの発現が明らかであり、この細胞を以後の実験で使用する方針とした。Cell sorter (FACS AriaII)により単一細胞に分け、各変異遺伝子型についてクローンを作成した。

EGFRを高発現するK562のクローンを作成した



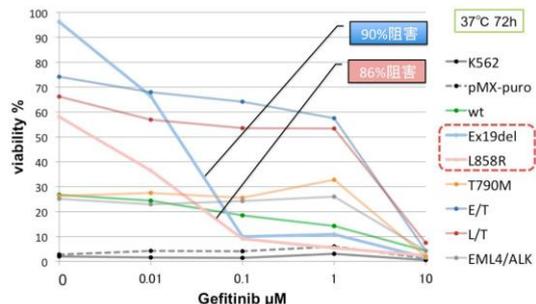
白血病細胞K562は本来融合癌遺伝子Bcr-Ablが陽性であり、Bcr-Abl阻害剤であるイマチニブ投与によりアポトーシスが誘導されるという特徴がある。

変異型EGFR導入K562細胞 Imatinib存在下の生存率



変異型EGFR導入K562細胞では、EGFRの存在によりイマチニブによるアポトーシスが阻害されることが明らかとなった。さらにEGFRの変異のタイプによりイマチニブに対する生存率が変化することが明らかとなった。

K562/EGFR Ex19del, K562/EGFR L858RとGefitinib



実際、変異型EGFR導入K562細胞は、ゲフィ

チニブ感受性を示した。また、T790M 変異陽性細胞は、ゲフィチニブ耐性を示した。

これらの実験の結果からは、EGFR を本来有しない細胞においても、EGFR シグナル伝達経路は存在し、外来の EGFR はそれを利用することができ、EGFR シグナル依存性を生むという興味深い結果が得られた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Imatinib treatment for gefitinib resistant epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer
Tatsuro Fukuhara, Cezary Jan Treda, Tomohiro Sakakibara, Akira Inoue, Masahito Ebina, Toshihiro Nukiwa
American Association for Cancer Reserch, Annual Meeting 2012, Chicago.
- ② 高濃度イマチニブはゲフィチニブ耐性化した EGFR 変異陽性肺癌細胞の増殖を阻害する 福原達朗、トレダセザリー、井上彰、海老名雅仁、貫和敏博
第 5 2 回日本呼吸器学会学術講演会 2012, 神戸

[その他]

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原達朗 (FUKUHARA TATSURO)

地方独立行政法人宮城県立がんセンター (研究所) ・ がん先進治療開発研究部 ・

特任研究員

研究者番号：80400365

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

該当せず