

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 8月23日現在

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23791565
 研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫における受容体型チロシンキナーゼの活性化と治療標的の可能性
 研究課題名（英文） Activation of Receptor Tyrosine Kinase and the Possibility of the Target Therapy on Malignant Pleural Mesothelioma
 研究代表者
 川口 晃司 (KAWAGUCHI KOJI)
 名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
 研究者番号：10402611

研究成果の概要（和文）：悪性胸膜中皮腫（MPM）は治療抵抗性で予後不良な疾患であり、患者数の増加が予測されている。我々は悪性胸膜中皮腫の細胞株を用いて、*in vitro*でのEGFR/MET阻害剤の効果を検討した。さらに分子標的治療の可能性を追究するため、同所移植モデルを確立し、*in vivo*におけるEGFR/MET阻害剤の効果を検討した。悪性中皮腫に対して、MET+EGFR阻害剤の併用が相乗的效果を示す可能性があることが、*in vivo*でも示唆された。

研究成果の概要（英文）：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a devastating disease with resistance to conventional therapies. We analyzed the effect of combined inhibition of MET and EGFR on malignant mesothelioma cell lines *in vitro*. And to test the effect of this combination *in vivo*, we established orthotopic xenograft models of human MPM cells and performed a preliminary experiment to administer inhibitors of MET and EGFR. We showed that combined inhibition of MET and EGFR exerted a stronger inhibitory effect on MPM cell proliferation *in vivo*.

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	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、受容体チロシンキナーゼ、細胞株樹立、MET、分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露に関連した予後不良の疾患であり、今後患者数の増加が予測されている。現在は化学療法、外科治療および放射線療法を含めた集学的治療が行われているが、生存期間中央値は約1年と極めて厳しい予後しか得られていない。近年、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) が細胞の癌化に密接に関わっていることが明らかにされ、さまざまな悪性腫瘍において、RTK阻害剤が分子標的治療のひとつとして注目されている。特に肺癌においては、EGFR阻害

剤が遺伝子変異のある癌に対して劇的な効果を示しており、これまでの抗癌剤治療よりも注目されている。悪性胸膜中皮腫に対しても、EGFR阻害剤の臨床試験が海外で行われたことがあるが、ほとんど効果を認めなかったと報告されている。

我々は以前より、中皮腫の細胞学的特性を明らかにするために患者検体より細胞株の樹立を行っていた。これらの細胞株を用いて発現プロファイリングを行い、正常中皮細胞株と比較して多くの中皮腫細胞株において発現の上昇している遺伝子の一つとして RTK

をコードする **MET 遺伝子** を見出しており、中皮腫における **MET** の発現および活性化についての検討を行った。

これまでに我々は、多くの悪性中皮腫細胞株において **MET** の発現および活性化が上昇していることを確認した。さらに臨床検体を用いた免疫組織学的検討でも約 80% の症例において発現の上昇が確認された。**MET** の特異的な阻害剤処理による細胞の増殖、運動能に及ぼす影響について検討したが、これまでの報告と同様に多くの細胞株においては目立った効果は観察されなかった。

2. 研究の目的

我々は受容体型チロシンキナーゼ (RTK) に注目し、悪性胸膜中皮腫における RTK の発現・活性化を解明するとともに、RTK 阻害剤の有効性について解析し、最終的には悪性胸膜中皮腫に対する分子標的治療の可能性について検討していきたいと考えている。

3. 研究の方法

我々は、**MET** 阻害剤の効果が限定的である理由として、他の複数の RTK が活性化に参与しているためと仮定した。そこでまず、悪性胸膜中皮腫における 42 個の RTK の活性化状態を調べた。すると平均約 6 個の RTK が同時に活性化していることが明らかとなった。

Stommel, J. M らの glioma の報告から、複数の RTK を同時に阻害すると腫瘍の増殖抑制効果が得られる可能性があると考えた。そこで多くの細胞株で高発現している **MET** と **EGFR** の阻害剤を併用して実験を行うと、相乗的な増殖抑制効果を認めた。

そこでまずどのような阻害剤の組み合わせが最も効果的なのかを検討した。**VEGFR** や **PDGFR**、**FGFR** など多くの悪性中皮腫細胞株において活性化していることを確認している。3 剤併用が最も効果的かもしれないとも考え同様に研究をおこなった。

その次には、*in vivo* での効果についても検討した。以前にパイロット的に悪性胸膜中皮腫細胞株のマウス皮下移植実験を行っており、それを継承するとともに同所移植モデルも作成し、分子標的治療の可能性を追求した。

4. 研究成果

我々が樹立したものを含む 15 の悪性胸膜中皮腫の cell line における 42 個の RTK の活性化状態を調べた。すると平均約 6 個の RTK が同時に活性化していることが明らかとなった。

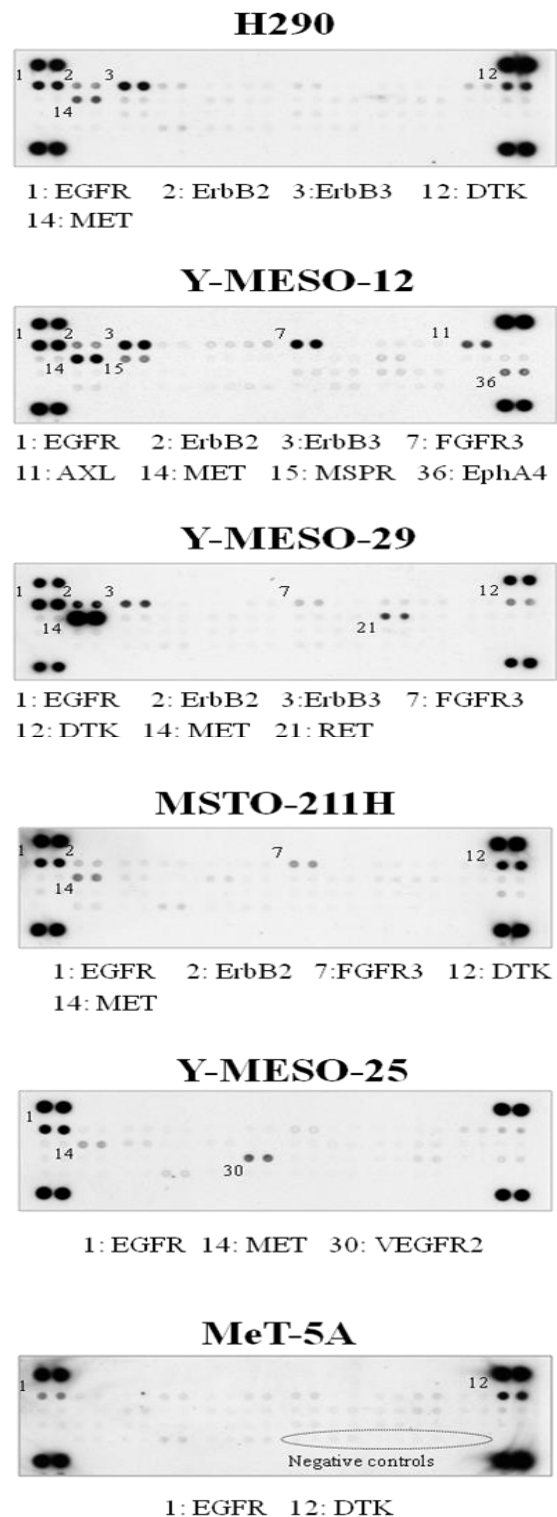


図1 各胸膜中皮腫細胞株における受容体型チロシンキナーゼの活性化状態

その中でもっとも多く cell line において活性化していたのは、**EGFR**、**MET**、**FGFR** であった。そこでこれらのうち 2 つの抗体を同時に投与して阻害してみた。

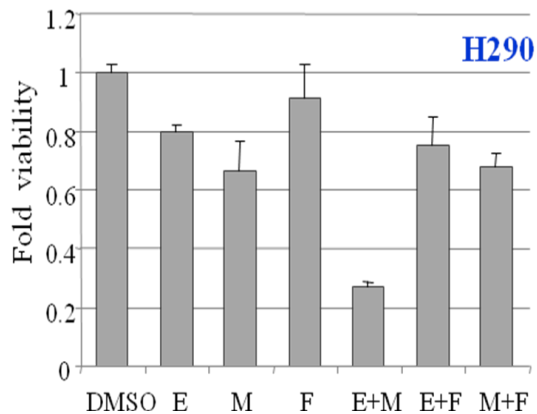


図2 H290細胞株におけるRTK阻害剤併用による増殖抑制効果

するとEGFRとMETの組み合わせが相乗的な効果が得られることが分かった。

次に悪性中皮腫細胞株を用い、ヌードマウスの皮下または胸腔内へ 5×10^6 個ずつ移植し、生着するか確認した。

皮下に関しては、20 cell line中6つが生着した。また同所移植モデルに関しては、14 cell line中10つで成功した。

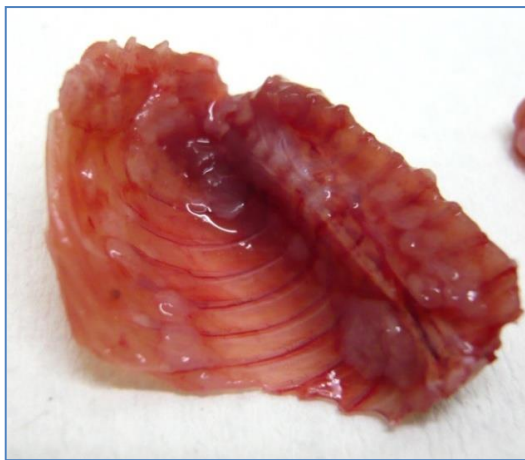


図3 胸膜中皮腫の胸腔内移植モデル

皮下移植の腫瘍に対しては、腫瘍容積が100mm³程度となった時点で、腫瘍周囲にEGFR/MET阻害剤を5日間皮下注射し、腫瘍径の変化を解析した。

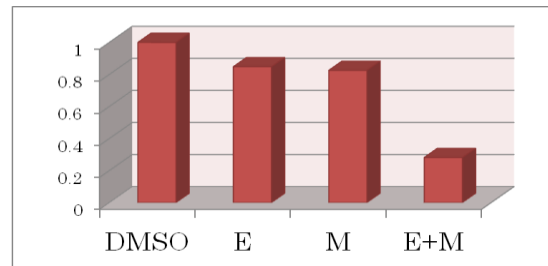


図4 胸膜中皮腫の皮下移植モデルに対する各RTK阻害剤の腫瘍縮小効果

胸腔内移植したマウスに対しては、4日目よりEGFR/MET阻害剤を6日間経口投与し、体重の変化及び生存日数を検討した。

移植後生存日数は20-30日と短く、MET群・EGFR群・MET+EGFR群の間で生存における有意な差は認められなかった。

しかしながら体重減少に転じる日数がMET阻害剤投与群とEGFR+MET阻害剤併用群で延長した。

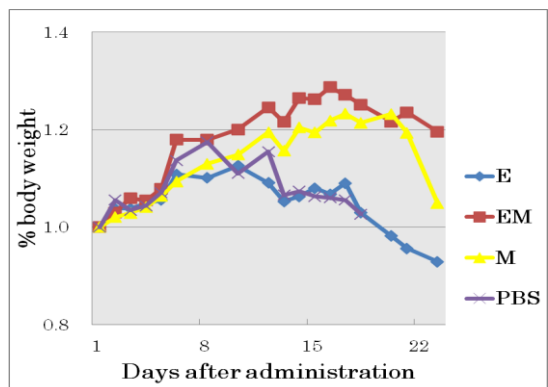


図5 同所移植モデルに対する各RTK阻害剤投与による体重の変化

課題として、
マウスを用いて悪性胸膜中皮腫の同所移植モデルを確立できたが、生存日数で比較するのは困難と考えられる
皮下移植は簡便だが、腫瘍の増殖が遅く、1つの実験に数ヶ月を要してしまう
投与方法（経口・皮下・経静脈・胸腔内など）も検討する必要がある

悪性中皮腫に対して、MET+EGFR 阻害剤の併用が相乗的効果を示す可能性があることが、in vivo でも示唆された。

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 9 件）

1. Mizuno T, Taniguchi T, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Fukui T, Ishiguro F, Nakamura S, Yokoi K. Pulmonary metastasectomy for osteogenic and soft tissue sarcoma: who really benefits from surgical treatment? **Eur J Cardiothorac Surg.** 2013 Apr;43(4):795-9. 査読あり
2. Sakakura N, Tateyama H, Nakamura S, Taniguchi T, Usami N, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Yokoi K. Diagnostic reproducibility of thymic epithelial tumors using the World Health Organization classification: note for thoracic clinicians. **Gen Thorac Cardiovasc Surg.** 2013 Feb;61(2):89-95. 査読あり
3. Kawaguchi K, Miyaoka E, Asamura H, Nomori H, Okumura M, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Yokoi K; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Modern surgical results of lung cancer involving neighboring structures: A retrospective analysis of 531 pT3 cases in a Japanese Lung Cancer Registry Study. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2012 Aug;144(2):431-7. 査読あり
4. Nakamura S, Tateyama H, Taniguchi T, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Fukui T, Mizuno T, Ishiguro F, Yokoi K.

Multilocular Thymic Cyst Associated With Thymoma: A Clinicopathologic Study of 20 Cases With an Emphasis on the Pathogenesis of Cyst Formation. **Am J Surg Pathol.** 2012 Dec;36(12):1857-64. 査読あり

5. Fukumoto K, Taniguchi T, Ishikawa Y, Kawaguchi K, Fukui T, Kato K, Matsuo K, Yokoi K. The utility of [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography in thymic epithelial tumours. **Eur J Cardiothorac Surg.** 2012 Dec;42(6):e152-6. 査読あり
6. Fukumoto K, Usami N, Okasaka T, Kawaguchi K, Okagawa T, Suzuki H, Yokoi K. Late breast metastasis from resected lung cancer diagnosed by epidermal growth factor receptor gene mutation. **Lung Cancer.** 2011 Nov;74(2):352-3. 査読あり
7. Ohata N, Usami N, Kawaguchi K, Tateyama H, Yokoi K. Type AB thymoma with brain metastasis: Report of a case. **Surg Today.** 2011 Oct;41(10):1436-8. 査読あり
8. Mizuno T, Usami N, Okasaka T, Kawaguchi K, Okagawa T, Yokoi K. Complete spontaneous regression of non-small cell lung cancer followed by adrenal relapse. **Chest.** 2011 Aug;140(2):527-8. 査読あり
9. Kawaguchi K, Usami N, Okasaka T, Yokoi K. Multiple thymic carcinoids. **Ann Thorac Surg.** 2011 Jun;91(6):1973-5. 査読あり

〔学会発表〕（計 14 件）

- ① 川口 晃司 重症筋無力症に対する胸腔鏡下拡大胸腺摘除術での当院の工夫 第29回 内視鏡外科学会総会 2012年12月06日～8日 横浜
- ② 川口 晃司 隣接臓器浸潤 T3 肺癌の最新の外科治療成績：肺癌登録合同委員会の2010年の全国集計における531例の解析から 第53回 日本肺癌学会総会 2012年11月08日～9日 岡山
- ③ 川口 晃司 左肺上葉切除・気管支肺

動脈形成術中に発生した大量の空気塞栓に対し、心臓外科および麻酔科との協同で救命し得た一例 第65回日本胸部外科学会定期学術集会 2012年10月18日～20日 博多

- ④ Koji Kawaguchi Clinical Staging of Malignant Pleural Mesothelioma with PET/CT, Which May Be a Useful Tool for Detecting Tumor Infiltration into the Biopsy Sites 11th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group 2012年09月11日～14日 Boston, USA
- ⑤ 川口 晃司 大腸癌肺転移に対して化学療法施行後に肺切除術を施行した症例の検討 第29回 日本呼吸器外科学会総会 2012年05月17日～18日 秋田
- ⑥ 川口 晃司 胸腺腫完全切除後の胸腔内播種再発例についての検討 第112回 日本外科学会定期学術集会 2012年04月12日～14日 千葉
- ⑦ 川口 晃司 自己免疫性胃腸炎を合併した浸潤性胸腺腫に対して集学的治療を施行した1例 第31回 日本胸腺研究会 2012年2月4日 埼玉
- ⑧ 川口 晃司 悪性胸膜中皮腫の術前病期診断におけるPETの有用性と限界について 第2回 Japan Mesothelioma Interest Group 研究会 2012年1月28日 大阪
- ⑨ 川口 晃司 右 aberrant V2 を合併した肺癌に対する胸腔鏡下右肺上葉切除術 第28回 内視鏡外科学会総会 2011年12月7日～9日 大阪
- ⑩ 川口 晃司 悪性胸膜中皮腫の術前病期診断と胸膜肺全摘術の適応についての検討 第64回日本胸部外科学会定期学術集会 2011年10月9日～12日 名古屋
- ⑪ Koji Kawaguchi The Role of Elastic Stains for Peripheral Lung Cancer: Is it Mandatory? 14th World Conference on Lung Cancer 2011/7/3-7 Amsterdam, Netherland
- ⑫ 川口 晃司 左上葉ダブルスリーブ切除の術中に発生した空気塞栓の1例～重篤合併症からの警鐘 第54回 関西胸

部外科学会 2011年6月30日～1日 高松

- ⑬ 川口 晃司 重症筋無力症合併胸腺腫に対する治療戦略 第111回 日本外科学会総会 2011年5月25日 紙上発表
- ⑭ 川口 晃司 IVa期胸腺腫に対して根治を目的としたEn-bloc胸腺全摘および胸膜肺全摘術 第28回 日本呼吸器外科学会学術総会 2011年5月12日～13日 別府

〔図書〕(計 1件)

からだの科学「肺がんのすべて」

外科療法 拡大手術

川口晃司, 横井香平

日本評論社: 2011. 261-4.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 晃司 (KAWAGUCHI KOJI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 10402611

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし