様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：１５１０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９０８１１
研究課題名（和文）肺癌に対する抗ＥＧＦＲ抗体の感受性因子の探索と新しい併用療法の開発

研究課題名（英文）Detection of biomarker and development for new combination therapy for anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab in lung cancer

研究代表者
高田　美也子（TAKATA, Miyako）

鳥取大学・医学部・研究員

研究者番号：５０５２３６４３

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）：本研究は、分子標的治療薬である抗EGFRモノクローナル抗体セツキシマブの肺癌領域におけるバイオマーカーの検出及び耐性克服についての基礎的研究である。本研究でセツキシマブ耐性肺癌細胞株において、KREMEN1遺伝子が発現低下していることと、Wntシグナル経路が活性化していることを見出した。従ってWnt経路の活性化抑制が耐性化克服に有効であり、感受性を示さない細胞においても適応範囲を拡大できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study is basic research that explore the biomarker and factors overcoming drug resistance to anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab in lung cancer. We found that KREMEN1 gene was overexpressed and Wnt signaling pathway was highly activated in cetuximab resistant cells. Therefore the inhibition of Wnt signaling pathway can possibility overcome the acquired resistance for cetuximab. Moreover this results can be applicable for lung cancer that is inherently resistance for cetuximab.

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：非閉塞性肺疾患癌

１．研究開始当初の背景

肺癌による死因の高さは世界中において幅広く認められており、その中で、分子標的治療薬の開発が数多く進められている。特に非小細胞肺癌において、上皮成長因子受容体（EGFR）の過剰発現が見られ、その発現レベルが予後不良と相関している。この EGFR に対する分子標的薬として、EGFR の遺伝子変異陽性例において効果を示す、チロシンキナーゼ阻害剤については開発が進んでいるが、EGFR 遺伝子変異陰性症例やチロシンキナーゼ阻害剤耐性を獲得した症例に対しては対応方法がないのが現状である。一方、その他の EGFR 経路阻害方法としてセツキシマブなどの抗 EGFR 抗体が開発され大腸癌、頭頸部癌領域で広く用いられている。非小細胞肺癌に対しても最近抗癌剤との併用により、分子標的治療薬としてはじめて全生存期間延長がみられたことが報告された（FLEX 試験）。しかしながら、セツキシマブの肺癌領域における感受性因子の検討は本邦においても欧米においてもほとんど行われていない。この一因は基礎的研究を行うにあたり、セツキシマブ感受性肺癌細胞株がほとんどないためである。本研究では、以前の研究より発見したセツキシマブ感受性細胞を使用し、セツキシマブの効果的に使用するための基礎的研究を行うことにある。

２．研究の目的

抗 EGFR 抗体セツキシマブは、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤無効、耐性症例に対して期待がもたれ、大規模臨床試験で肺癌患者ににおける生存期間延長が示されたが、その差はわずかであり、同剤の感受性因子の探索とより効果の高い投与方法の開発が急務となっている。本研究ではセツキシマブ感受性肺癌細胞と、低濃度暴露によって得られたセツキシマブ耐性細胞を利用して、セツキシマブ感受性因子の探索と、新しいセツキシマブ併用療法の開発を目的としている。

３．研究の方法

本研究では、(1)セツキシマブ耐性クローンの樹立を行う。これは、以前の研究より見出したセツキシマブに対し感受性を示す細胞を図 1 に示すように、段階的に濃度を上げ、高濃度に暴露したのち、限界希釈法によって

図1

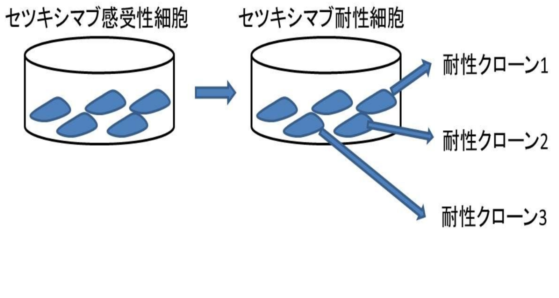
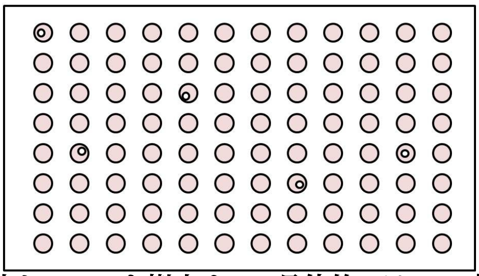
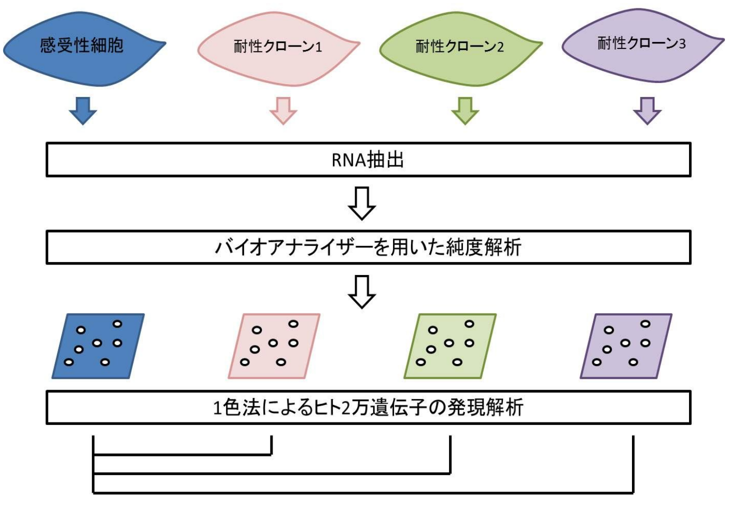


図2



耐性クローンを樹立する。具体的には、96 穴培養皿にコロニー数が１個以下になるような濃度で細胞をまき（図 2）、単一クローンを分離する。これを 24 穴培養皿から徐々に大きいサイズの培養皿に継代し、耐性クローンとして樹立する。耐性化の確認は、細胞増殖抑制試験により行う。(2)元のセツキシマブ感受性細胞と樹立した耐性クローンについて、マイクロアレイ解析により網羅的遺伝子発現解析を行う。パスウエイ解析機能及びパターン抽出機能を用いて、耐性クローンにおいて発現が変化（増強、あるいは減弱している）細胞内シグナル伝達系を特定する。①マイクロアレイによる遺伝子発現解析：感受性細胞株と耐性クローンについて RNA 抽出を行う。RNA 純度を Agilent2100 バイオアナライザーで検定後、Agilent 社 Whole human genome オリゴ DNA マイクロアレイを用いて１色法で網羅的遺伝子発現解析を行う。得られた遺伝子発現情報を Genespring GX ソフトウエアを用いて比較する。②結果の解釈：BRB アレイツールを用いて、耐性クローンで発現が変化（増強あるいは減弱）している細胞内シグナル伝達系を特定する。③マイクロアレイ解析による結果の検証として、②で特定したシグナル伝達経路が実際に耐性クローンで変化しているかどうかを調べるため定量的 PCR 法を行う。

図3

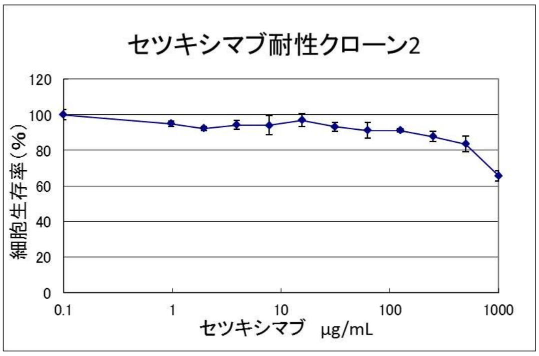


４．研究成果

(1)セツキシマブ耐性化クローンの樹立

セツキシマブに高感受性を示した細胞株について、低濃度からの刺激を半年以上、徐々に濃度をあげ 1000μg/ml の濃度で耐性化させた耐性細胞株を限界希釈法により、耐性化した単一クローンを作成した。細胞増殖抑制試験により耐性化の確認を行った。下図は一例として、クローン No.2 についての耐性化を示す。最終濃度の 1000μg/ml においても、全く薬剤に感受性を示さない耐性クローンが樹立できた（図 4）。

図4



(2)マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

セツキシマブ感受性株１株と耐性クローンをランダムに抽出した 3 株を選択し、網羅的遺伝子発現解析を行った。
図 5 に示すように、BRB アレイツールを用いて、コントロールの感受性株に比べ薬剤耐性化群との比較を行ったところ、数多くの遺伝子発現の変動があった。続いてパスウェィ解析を行った結果、図 6 に示した。有意差のあるほうから、順に上位 15 の結果について示す。
Genespring GX のパスウエイ解析において、耐性化クローン群において、Wnt シグナルの発現増強がみられたことと、図 6 に示すように BTB アレイ解析においても Wnt シグナルの発現増強が一致していたことから、この系のシグナルが耐性化への相関性が示唆された。

図5

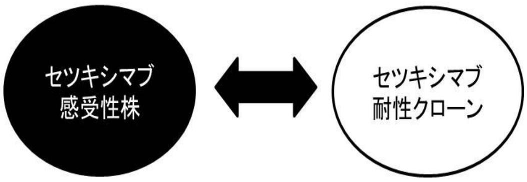


図6　Gene set class comparisonの結果
クラス1: コントロール, クラス2: 耐性クローン群

	Pathway description	Number of genes	LS permutaion p-value	KS permutaion p-value	Efron-Tibshirani's GSA test
1	Cell communication	86	0.00001	0.00063	<0.005(-)
2	Calcium signaling pathway	106	0.00001	0.06651	<0.005(-)
3	Neuroactive ligand-receptor interaction	63	0.00001	0.00644	<0.005(-)
4	Focal adhesion	257	0.00001	0.00001	<0.005(-)
5	ECM-receptor interaction	85	0.00001	0.00001	<0.005(-)
6	Hematopoietic cell lineage	66	0.00001	0.00001	0.555(-)
7	Complement and coagulation cascades	61	0.00002	0.00024	0.25(+)
8	Cytokine-cytokine receptor interaction	145	0.00012	0.01688	0.45(-)
9	Nitorogen metabolism	12	0.0005	0.00127	<0.005(+)
10	Wnt signaling pathway	140	0.00055	0.00117	<0.005(+)
11	Adherense junction	145	0.00173	0.05303	<0.005(-)
12	Limonen and pinene degradation	25	0.01023	0.14895	<0.005(+)
13	mTOR signaling pathway	56	0.01618	0.00692	<0.005(+)
14	Regulation of actin cytoskeleton	141	0.01621	0.00042	<0.005(-)
15	Ethylbenzene degradation	15	0.03372	0.16768	<0.005(+)

(3)PCR アレイによる Wnt シグナルの解析

セツキシマブ感受性株及び耐性クローン 3 種類について、10%牛胎児血清を含む培地あるいは、含まない培地にて 24 時間培養した細胞の RNA について Wnt シグナルの遺伝子発現の変動を調べたところ、Wnt2 は、どの耐性クローンについてもコントロールに比べ、血清存在、不存在にかかわらず遺伝子発現の増強が見られた。
BTRC、GSK３A は血清存在下で発現が上昇し、CSNK2A1 では、血清非存在下で発現が上昇していた。
FZD3 及び KREMEN１では、発現が低下していた。特に KREMEN1 では、血清の存在下でさらに発現の低下が顕著に見られた。

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　0　件）

〔学会発表〕（計　1　件）

Miyako Takata, Hiroki Chikumi, Kousuke Yamaguchi, Jun Kurai, Masaki Nakamoto, Naoto Burioka, Tadashi Igishi, Eiji Shimizu

Identification of a molecular marker for cetuximab sensitivity and development of a novel combination therapy for non-small cell lung cancers
2013.4.6 Washington, American association for cancer research

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　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　0　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
高田美也子（TAKATA Miyako）
鳥取大学・医学部・研究員
研究者番号：50523643

(2)研究分担者
(　　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：