

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460691

研究課題名(和文) 未固定肺癌検体を用いた抗癌剤耐性・感受性因子の測定による肺癌個別化治療の確立

研究課題名(英文) Analysis of mRNA level of the treatment resistance related proteins in unfixed lung cancer biopsy specimens obtained by core-biopsy.

研究代表者

中村 洋一 (NAKAMURA, Yoichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：20432974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コア・バイオブシーによって得られた肺癌検体から未固定のままtotal RNAを抽出しmRNA発現解析を行った。CT値で比較した結果、ABCトランスポーターに関しては、MDR1、MRP1、BCRPに発現亢進が認められた。細胞骨格タンパク質に関しては、TUBB3に発現亢進、Gelsolinに発現抑制が認められた。血管内皮増殖因子に関しては、VEGF-AとVEGF-Bには軽度の、VEGF-Cには高度の発現亢進があった。がん幹細胞関連抗原に関しては、CD20、POU5F1、PROM1、Nanog、KLF4、Notch1に発現亢進を認めたがCD24とCD44には変化を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Total mRNAs were extracted from unfixed lung cancer biopsy specimens, and each RNA level was analyzed. They are compared as CT. ABC transporters; Overexpression was shown in MDR1, MRP1, BCRP. Cytoskeleton proteins; Overexpression was shown in TUBB3, and mild down regulation was shown in Gelsolin. Vascular endothelial growth factors: mild overexpression was shown in VEGF-A and VEGF-B, and overexpression was shown in VEGF-C. Cancer stem cell related antigens: Overexpression was shown in CD20, POU5F1, PROM1, Nanog, KLF4, Notch1, but CD24 and CD44 were no change.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：非小細胞肺癌 個別化治療

1. 研究開始当初の背景

進行非小細胞肺癌患者における治療方針決定において、遺伝子解析は必要不可欠になっている。そのため、肺癌症例から正確且つ安全に腫瘍組織を採取する必要性も大きくなった。一方で、進行非小細胞肺癌での腫瘍組織の採取は、乳癌や、胃癌や大腸癌といった消化器癌などと比較して困難な場合が多い。これは、進行非小細胞肺癌の発生部位が主に肺野末梢であり、乳癌のように腫瘍を直接さわって生検したり、胃癌や大腸癌のように内視鏡で病巣を直視して生検することが不可能なためである。つまり、進行非小細胞肺癌患者では生検検体を固定して腫瘍組織の存在を確認しないと標本内に腫瘍組織が含まれているとの確証がない、ということになる。そのため、固定検体を対象とした DNA 解析 (EGFR 遺伝子変異における PCR) や染色体解析 (ALK 染色体転座における FISH 法) は行われているが、mRNA 解析は、それを固定検体で行う場合には mRNA 分解が進んだ状態から組織内の残存 RNA を集めて解析を行わざるを得ない。また、mRNA 回収の精度を上げるために未固定検体を対象とする場合は CT ガイド下肺針生検といった侵襲の大きな検査を行わねば適切な検体を得ることができない、ということもある。これら 2 点が問題となって、多数の進行非肺癌患者を対象とし、未固定検体を用いて抗癌剤の排泄・代謝因子の腫瘍細胞における活性化を mRNA 解析で評価することは、実現が困難であると考えられてきた。近年、ガイドシース併用エコーガイド下気管支鏡検査 (EBUS-GS) が肺生検に用いられるようになった。この技術を用いれば、生検鉗子が肺腫瘍内に到達していることが確認できるため、生検検体中に腫瘍細胞が確実に含まれることが保証できるようになった。申請者は、EBUS-GS を用いる事で、腫瘍径が 4cm 以上の進行癌であれば 100% の確率で診断が可能なることを報告している (中村ら。第 34 回呼吸器内視鏡学会総会)。この EBUS-GS を用いれば、腫瘍細胞を含有する検体が確実に安全に得られるので、多数の切除不能進行非小細胞肺癌症例を対象とした網羅的な mRNA 発現解析が可能となる。そこで、申請者は、EBUS-GS で得られた非小細胞肺癌組織を対象に、RT-PCR を用いて抗癌剤の排泄・代謝に関わる因子の mRNA 発現を評価し、それらと抗癌剤治療効果との相関を調べ、この解析手法が肺癌化学療法の個別医療への応用が可能であることの証明を試みる。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、EBUS-TBNA で得られた肺癌の生検検体は肺癌組織を確実に含んでいるため、その未固定生検を用いれば肺癌の RNA 発現解析が正確且つ容易に行えること、また、同解析により抗癌剤 (分子標的薬を含む) の感受性および耐性化因子を同定しその情報を元に抗癌剤選択を行えば治療の有効

性を高める可能性があることを明らかにすることにある。研究期間内にて以下の手順にて証明を試みる。

1. EBUS-GS で生検を複数回行い、そのうちの 1~2 個を未固定検体のまま RNA 解析用に別途処理を行う。
2. ABC トランスポーター、細胞骨格タンパク質、血管内皮増殖因子、がん幹細胞関連抗原といった、現在肺癌化学療法で使用されている抗癌剤の排泄・代謝に影響を与える因子の発現状況を、1 より得られた検体の RT-PCR で評価する。
3. 外科切除を受けた症例において、2 の生検未固定検体の解析結果と切除標本の未固定での解析結果が相関することを証明する。
4. 化学療法適応症例において、抗癌剤に対する反応と抗癌剤の排泄・代謝に影響を与える因子の発現との相関を評価する。

化学療法後再発の症例において、同意が得られれば再度 EBUS-GS を行って検体を採取し、解析因子の発現変化を評価する。

3. 研究の方法

申請者らは、EBUS-GS を用いれば、経気管支肺生検によって安全且つ確実に腫瘍組織を含んだ検体を得ることができると報告した。その未固定検体における抗癌剤 (分子標的薬を含む) の排泄・代謝に関与する因子の RNA 発現解析が、抗癌剤の選択において有用な情報となりうる事を証明し、将来の肺癌化学療法の個別化治療化確立の際の有用な手段であることを証明する。

平成 26 年度以降

倫理委員会などの事務的手続きと測定計の立ち上げ後、以下の手順で研究を進めていく。

【研究の対象】

- 1) 肺癌が強く疑われ気管支鏡にて精査を受ける予定の症例。
- 2) 検査時の年齢が 20 歳以上 75 歳以下で、全身状態良好で抗癌剤による化学療法を受けることが可能な症例。
- 3) 本研究についての説明を十分に理解し、文書によって参加の同意が得られる症例。

【検査手技、症例数および研究期間】

EBUS-GS については、3 分野の解析を行うため、1 分野につき 1 個で計 3 個の研究用生検を行う予定とする。1 つの病巣から 4 個以上の生検を行う事については、EBUS-GS では容易かつ安全に行える。症例登録は気管支鏡検査前に行い、生検および検体の解析を行う。その後、固定標本にて非小細胞肺癌と診断のついた症例のデータを解析に用いる。診断がついた症例を対象に外科切除例 10 例および化学療法例 50 例 (分子標的薬による治療も含む) を解析対象とする。研究期間は 3 年とする。

【排泄・代謝因子発現解析】

解析対象は、ABC トランスポーター (MDR1、MRP1、BCRP)、細胞骨格タンパク質 (TUBB3、Cofilin1、Gelsolin)、血管内皮増殖因子 (VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C)、がん幹細胞関連抗原 (ALDH1A1、CD20、CD24、CD44、POU5F1、PROM1、Nanog、KLF4、Notch1)、その他 (TS、HGF、MET) とする。発現解析は同因子の RNA 発現を RT-PCR を用いて定量化する。得られた未固定検体より RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出、同 100ng より、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて cDNA の合成を行う。10ng RNA 相当の cDNA より、Platinum qPCR Super Mix を用いて TaqMan 法により上記項目と ACTB の RT-PCR を行う。

【化学療法症例との相関解析】

未固定生検検体の解析結果と、化学療法の奏効率および生存期間との関係を解析する。この場合、化学療法はとくに指定せず (介入無し) 任意に選択使用された抗癌剤 (分子標的薬を含む) の効果と RNA 解析項目との相関を解析する。抗癌剤の効果との相関が肯定された項目に関しては、将来の前向き臨床試験 (介入有り) へとつなげていく。

【患者の臨床情報の収集】

基本情報 (性、年齢、喫煙歴、PS など)、臨床病期、化学療法の内容、化学療法の有害事象、奏効率、生存期間等の臨床情報を収集する。

4. 研究成果

肺癌組織については、追加解析分を合わせ、進行肺癌症例 100 名近くの収集が行えた。最終的に超音波気管支鏡検査における重篤な合併症の報告はなく、有害事象の観点からも検体収集は安全と判断している。

解析結果

数値は CT 値にて表されている。

	最小値	最大値	平均値 ± 2SD
ABC トランスポーター			
MDR1	2.3	14.1	8.0 ± 4.3
MRP1	-0.1	9.6	3.4 ± 2.5
BCRP	1.0	14.1	7.9 ± 4.3
細胞骨格			
TUBB3	0.2	12.5	4.9 ± 4.0
Cofilin1	-1.5	4.4	0.4 ± 2.0
Gelsolin	-5.0	4.3	-1.5 ± 3.1
血管内皮増殖因子			
VEGF-A	-1.5	6.9	1.8 ± 2.9
VEGF-B	-1.8	6.3	1.7 ± 2.7
VEGF-C	2.5	18.4	7.7 ± 4.0
がん幹細胞関連タンパク質			
ALDH1A	-3.7	7.8	1.6 ± 5.2
CD20	1.1	10.2	5.4 ± 3.8
CD24	-3.1	6.1	1.1 ± 3.6
CD44	-3.2	5.9	-0.3 ± 2.7
POU5F1	-0.4	13.3	8.4 ± 4.3
PROM1	-0.5	14.7	5.8 ± 6.7
Nanog	-0.9	16.6	9.2 ± 5.2

KLF4	-0.7	8.8	4.5 ± 4.0
Notch1	1.4	10.0	5.0 ± 3.5
その他			
TS	6.8	0.9	3.8 ± 2.2
HGF	3.2	14.5	8.2 ± 4.4
MET	0.0	13.6	3.1 ± 3.9

CT 値の平均値を検討した結果、ABC トランスポーターに関しては、MDR1、MRP1、BCRP に発現亢進傾向が認められた。特に、MDR1 と BCRP に強い発現亢進が認められた。細胞骨格タンパク質に関しては、TUBB3 に発現亢進、Gelsolin に発現抑制が認められたが Cofilin1 の変動は少なかった。血管内皮増殖因子に関しては、VEGF-A と VEGF-B には軽度の、VEGF-C には高度の発現亢進があった。がん幹細胞関連抗原に関しては、CD20、POU5F1、PROM1、Nanog、KLF4、Notch1 に発現亢進を認められたが CD24 と CD44 には大きな変化を認めなかった。その他、HGF には高度の、TS と MET には中程度の発現亢進が認められた。

現在、個々の症例の生存期間のデータを収集している。まだ解析に必要な生存期間のデータが得られていないが、今後、各症例の経過観察を行い、生存期間に関して十分なイベントが確認できた段階で各項目と予後との相関解析を行う予定である。

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)

Mizoguchi K, Nakamura Y, et al. Heterogeneity of EGFR mutation in a patient treated with gefitinib as neo-adjuvant chemotherapy. Cancer Treat Commun. 4;117-120, 2015. (査読有)

Kasai T, Nakamura Y, et al. A Phase II Study of S-1 for Previously Untreated Elderly Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Chemotherapy. 61;93-98, 2015. (査読有)

Ikeda T, Nakamura Y, et al. A phase II study of amrubicin and carboplatin for previously untreated patients with extensive-disease small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 74;497-502, 2014. (査読有)

Nakamura Y, et al. Secondary EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma in a patient previously treated for acute lymphoblastic leukemia in childhood: a case report. Jpn J Clin Oncol. 44;593-596, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Takemoto S, Nakamura Y, et al. Detection of EML4-ALK Fusion Gene by Using Nested Long-Ranged Polymerase Chain Reaction. World Conference on Lung Cancer 2015. Denver, USA. September 8, 2015.

Nakamura Y, et al. Phase II trial of Paclitaxel, Irinotecan, and Bevacizumab for patients with Untreated NSCLC Overexpressed ERCC1 mRNA. World Conference on Lung Cancer 2015. Denver, USA. September 8, 2015.

中村洋一 その他。ゲフィチニブの薬物動態と抗腫瘍活性および有害事象との相関についての解析。第73回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年10月25日。

Nakamura Y, et al. Phase I/II Study of Amurubicin and Nedaplatin in Patients with Untreated, Advanced Non Small-Cell Lung Cancer. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), November 11, 2013.

〔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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 洋一 (NAKAMURA, Yoichi)
長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)
・講師
研究者番号：20432974

(2)研究分担者

長島 聖二 (NAGASHIMA, Seiji)
長崎大学・病院(医学系)・助教
研究者番号：00646672

福田 実 (FUKUDA, Minoru)
長崎大学・病院(医学系)・准教授
研究者番号：50388930