

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670399

研究課題名(和文) 進行活性化EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対する集学的治療に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Basic study on combined modality therapy for advanced lung cancer harboring activated EGFR gene mutation

研究代表者

木浦 勝行 (Kiura, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：10243502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異の発現がPD-L1を誘導し，EGFR遺伝子変異陽性肺癌でEGFR阻害薬によりPD-L1発現が減少することが示唆されているが，我々の樹立したExon19欠失Egfr遺伝子改変マウスで肺腺癌組織にPD-L1の発現は免疫染色では認められなかったが，フローサトメトリーでは弱陽性であった。岡山大学病院で2004年～2008年に切除された25症例の肺腺癌組織によるヒト検体の検討では，EGFR遺伝子変異陽性症例中9/12(75%)，EGFR遺伝子変異陰性症例中4/13(31%)でPD-L1陽性であった。EGFR遺伝子変異陽性とPD-L1発現に有意な関連が示唆された(P=0.047)。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation induces PD-L1 on the tumor cells, and that PD-L1 expression can be reduced by EGFR inhibitors in EGFR gene positive lung cancer; however, adenocarcinoma of the lungs in del exon19 Egfr transgenic mouse we established in our lab did not express PD-L1 by the immunostaining, but did express 1.2-fold when compared to controls by flow cytometry. In the study of human tissue specimen from 2004 to 2008 in resected 25 cases of adenocarcinoma of the lung in Okayama University Hospital, EGFR gene mutation-positive cases in 9/12 (75%), EGFR gene mutations in negative cases 4/13 (31%) were PD-L1 positive. Significant association has been suggested to EGFR gene mutation positive and PD-L1 expression (P = 0.047).

研究分野：呼吸器内科学(胸部腫瘍学)

キーワード：上皮成長因子受容体 PD-L1 EGFR遺伝子変異 Egfr遺伝子改変マウス 免疫染色 EGFR阻害薬 手術検体 相関

1 . 研究開始当初の背景

近年、肺癌の治療成績は分子生物学的の進歩に伴い大幅に改善しているが、依然肺癌は癌死亡の第1位であり、約7万人の患者が死亡している。これは4位の脳血管疾患に次いで5位に相当し、日本国民の18人に1人が肺癌のために亡くなっている(平成23年人口動態統計)。上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌患者は肺腺癌の40-50%を占め、非喫煙者、女性、東アジアに多く、ゲフィチニブのようなEGFRチロシンリン酸化酵素阻害薬(tyrosine kinase inhibitor: TKI)が劇的な効果を示す。担癌状態ではあるが長期生存患者は確実に増加しているが、通常の化学療法とEGFR-TKIのみで治療する症例は例外的である。EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者の治療を目指すためには新規治療法の開発、導入が必須である。

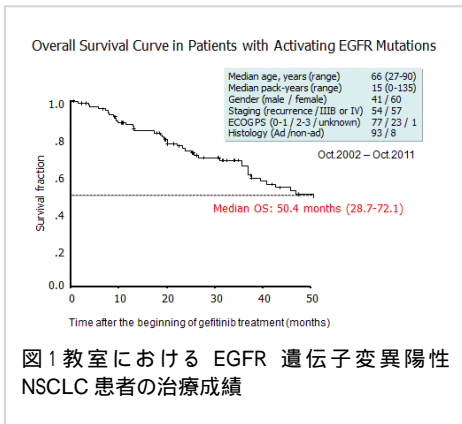


図1 教室におけるEGFR遺伝子変異陽性NSCLC患者の治療成績

2 . 研究の目的

EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者の生存期間は、EGFR-TKIにより大きく改善したが、治療症例は例外的である。申請者らの樹立したEGFR遺伝子変異陽性肺癌の自然経過とEGFR-TKI使用時の臨床経過を短期間にかつ的確に反映しており、この系を利用し、理想的な分子標的薬の選択、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)受容体に対する抗体の有用性を明らかにする。更にこれら治療の最大効果時にCD4陽性T細胞によるTh1型免疫応答やCD8陽性T細胞による細胞傷害の抑制に重要な役割を果たし、癌細胞が免疫攻撃を回避機構としても使われているPD-1(Programmed cell death 1)/PD-L1(Programmed cell death ligand 1)抗体経路を遮断する抗PD-1抗体あるいは抗PD-L1による免疫療法を追加する“治療を目指す新規治療法の開発”を目指した。

3 . 研究の方法

方法1: 検体は8週齢のエクソン19欠失Egfr遺伝子変異マウスでの肺腺癌組織を用いた。ポジティブコントロールとしてPD-L1が高発現しているGVHDマウスモデルの皮膚を使用した。

結果: 今後の方針: EGFR遺伝子変異マウスでの肺癌組織ではPD-L1は陰性であった(図2,

3)。免疫染色ではPD-L1は陰性であった。

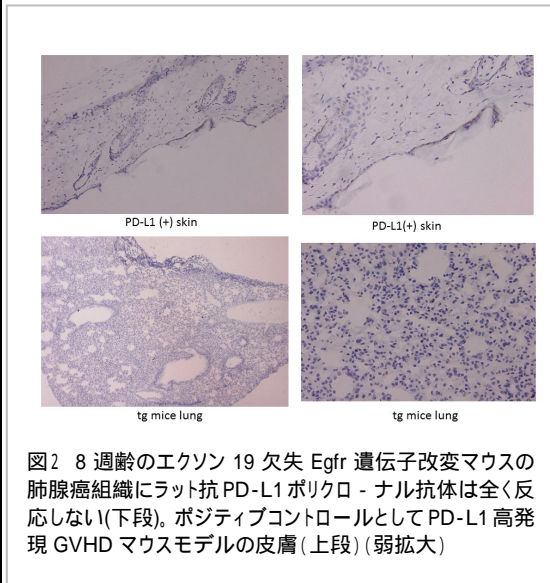


図2 8週齢のエクソン19欠失Egfr遺伝子変異マウスの肺腺癌組織にラット抗PD-L1ポリクローナル抗体は全く反応しない(下段)。ポジティブコントロールとしてPD-L1高発現GVHDマウスモデルの皮膚(上段)(弱拡大)

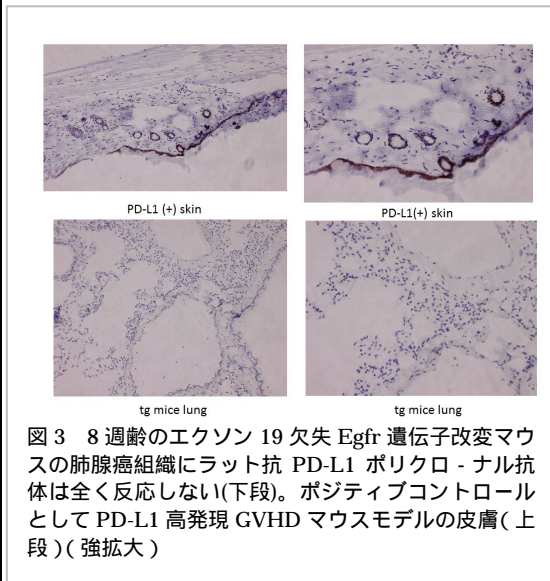


図3 8週齢のエクソン19欠失Egfr遺伝子変異マウスの肺腺癌組織にラット抗PD-L1ポリクローナル抗体は全く反応しない(下段)。ポジティブコントロールとしてPD-L1高発現GVHDマウスモデルの皮膚(上段)(強拡大)

方法2: 岡山大学病院で2004年~2008年に切除された肺腺癌組織を使用して、PD-L1発現を免疫染色で調べた。EGFR遺伝子変異はPNA LNA PCR-Clamp法で測定した

4 . 研究成果

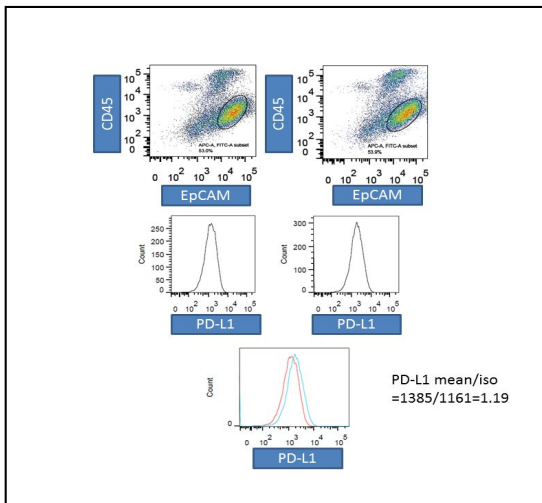
結果1:

申請者らの樹立したEgfr遺伝子変異マウス(欠失型)の8週齢の肺の腫瘍組織で、免疫染色でPD-L1の発現を確認できなかった。Akbayらは、彼らの作製した遺伝子変異マウスでは我々の遺伝子変異マウスとは異なり腫瘍にPD-L1高発現していることを報告している。

彼らの遺伝子変異マウスは、EGFR経路の活性化により、宿主の抗腫瘍免疫応答の回避のために、PD-L1発現誘導を実証した。EGFR-TKIを使用して、in vitroでのPD-1経路の薬理的遮断は、PD-L1発現を減少させた。EGFR遺伝子変異マウスモデルにおけるPD-1 pathwayをブロックすると、腫瘍の減少

をもたらし、大幅に全体的な生存率を増加させた。Cancer Discov. 2013;3(12):1355-63. doi: 10.1158/2159-8290

彼らと全く同様な方法 flow cytometry で CD45 陰性, EpCAM 陽性で細胞を展開し、腫瘍細胞を PD-L1 染色し、検討すると、下記に示す様に我々の遺伝子改変マウスの腫瘍組織での PD-L1 は低いレベルで発現していることが証明された。



結果 2: 検体数は 25 例で全て肺腺癌症例であった。年齢中央値は 64 歳(範囲 47 ~ 83 歳), 男性 4 例, 女性 21 例であった。術後病期は 期 22 例, 期 2 例, 期 1 例であった。PD-L1 陽性症例が全体で 13/25 (52%) であり, EGFR 遺伝子変異陽性例は 12/25 (48%) であった。EGFR 遺伝子変異陽性症例中 9/12 (75%) が PD-L1 陽性であり, EGFR 遺伝子変異陰性症例中 4/13 (31%) で PD-L1 陽性であった。

結論: 肺腺癌切除症例において EGFR 遺伝子変異陽性と PD-L1 発現に相関関連が示唆された (P=0.047, Fisher's exact test)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Hotta K, Kato Y, Leigh N, Takigawa N, Gaafar RM, Kayatani H, Hirata T, Ohashi K, Kubo T, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Magnitude of the benefit of progression-free survival as a potential surrogate marker in phase 3 trials assessing targeted agents in molecularly selected patients with advanced non-small cell lung cancer: systematic review. PLoS One. 査読あり, 2015;10(3):e0121211.

doi: 10.1371/journal.pone.0121211.

Ichihara E, Hotta K, Nogami N, Kuyama S, Kishino D, Fujii M, Kozuki T, Tabata M, Harada D, Chikamori K, Aoe K, Ueoka H, Hosokawa S, Bessho A, Hisamoto-Sato A, Kubo T, Oze I, Takigawa N, Tanimoto

M, Kiura K. Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. J Thorac Oncol. 査読あり, 2015;10(3):486-91.

doi: 10.1097/JTO.0000000000000434.

Hotta K, Kiura K, Tabata M, Takigawa N, Tanimoto M, Ueoka H. A survey of Japanese thoracic oncologists' perception of diagnostic and treatment strategies for EGFR mutant or EML4-ALK fusion non-small cell lung cancer. Chest. 査読あり, 2014;146(6):e222-5.

doi: 10.1378/chest.14-2055.

Yasugi M, Takigawa N, Ochi N, Ohashi K, Harada D, Ninomiya T, Murakami T, Honda Y, Ichihara E, Tanimoto M, Kiura K. Everolimus prolonged survival in transgenic mice with EGFR-driven lung tumors. Exp Cell Res. 査読あり, 2014 Aug 15;326(2):201-9.

doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.012.

Harada D, Takigawa N, Kiura K. The Role of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers (Basel). 査読あり, 2014;6(2):708-22.

doi: 10.3390/cancers6020708.

Kato Y, Hotta K, Takigawa N, Nogami N, Kozuki T, Sato A, Ichihara E, Kudo K, Oze I, Tabata M, Shinkai T, Tanimoto M, Kiura K. Factor associated with failure to administer subsequent treatment after progression in the first-line chemotherapy in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: Okayama Lung Cancer Study Group experience. Cancer Chemother Pharmacol. 査読あり, 2014;73(5):943-50.

doi: 10.1007/s00280-014-2425-9.

Ochi N, Takigawa N, Harada D, Yasugi M, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Src mediates ERK reactivation in gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. Exp Cell Res. 査読あり, 2014;322(1):168-77.

doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.007.

Murakami T, Takigawa N, Ninomiya T, Ochi N, Yasugi M, Honda Y, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tanimoto M, Kiura K. Effect of AZD1480 in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. Lung Cancer. 査読あり, 2014;83(1):30-6.

doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.011.

Hayakawa H, Ichihara E, Ohashi K, Ninomiya T, Yasugi M, Takata S, Sakai K, Matsumoto K, Takigawa N, Tanimoto M, Kiura K. Lower gefitinib dose led to earlier resistance acquisition before emergence of T790M mutation in epidermal growth factor receptor-mutated lung cancer model. *Cancer Sci*. 査読あり, 2013 Nov;104(11):1440-6. doi: 10.1111/cas.12284. Epub 2013 Oct 25. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Koboyashi K, Takeda K, Kiura K, Nishio K, Seki Y, Ebisawa R, Shahidi M, Yamamoto N. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol*. 査読あり, 2013;31(27):3335-41. doi: 10.1200/JCO.2012.45.0981 Ichihara E, Hotta K, Takigawa N, Kudo K, Kato Y, Honda Y, Hayakawa H, Minami D, Sato A, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Impact of physical size on gefitinib efficacy in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Lung Cancer*. 査読あり, 2013;81(3):435-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.05.021. Saito K, Takigawa N, Ohtani N, Iioka H, Tomita Y, Ueda R, Fukuoka J, Kuwahara K, Ichihara E, Kiura K, Kondo E. Antitumor impact of p14ARF on gefitinib-resistant non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther*. 査読あり, 2013;12(8):1616-28. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1239. Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, Hashida S, Maki Y, Ichihara E, Asano H, Tsukuda K, Takigawa N, Kiura K, Gazdar AF, Lam WL, Miyoshi S. Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res*. 査読あり, 2013;73(10):3051-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4136. Okamoto I, Aoe K, Kato T, Hosomi Y, Yokoyama A, Imamura F, Kiura K, Hirashima T, Nishio M, Nogami N, Okamoto H, Saka H, Yamamoto N, Yoshizuka N, Sekiguchi R, Kiyosawa K, Nakagawa K, Tamura T. Pemetrexed and carboplatin followed by pemetrexed maintenance therapy in chemo-naive patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Invest New*

Drugs. 査読あり, 2013;31(5):1275-82. doi: 10.1007/s10637-013-9941-z. Ninomiya T, Takigawa N, Ichihara E, Ochi N, Murakami T, Honda Y, Kubo T, Minami D, Kudo K, Tanimoto M, Kiura K. Afatinib prolongs survival compared with gefitinib in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. *Mol Cancer Ther*. 査読あり, 2013;12(5):589-97. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0885. 木浦勝行, 谷本光音 【分子標的治療】肺癌と分子標的薬 岡山医学会雑誌 (ISSN0030-1558), 査読なし, 125 巻 1 号 Page57-66(2013.04) 木浦勝行 臨床病期 III 期肺非小細胞癌に対する治療戦略 岡山医学会雑誌 (ISSN0030-1558), 査読なし, 125 巻 2 号 Page119-127(2013.08) 近藤英生, 木浦勝行 抗 PD-1 抗体 呼吸 (ISSN0286-9314), 査読なし, 32 巻 12 号 Page1141-1147(2013.12)

〔学会発表〕(計 5 件)

Yamane H, Isozaki H, Ochi N, Kudo K, Honda Y, Yamagishi T, Kubo T, Kiura K, Takigawa N. Both programmed cell death protein 1 and programmed death-ligand 1 molecules can be expressed on the cell surface of small-cell lung cancer (Abstract #1323), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA, AACR Annual Meeting 2015 April 18-22, 2015
Kudo K, Ohashi K, Ichihara E, Minami D, Kubo T, Sato A, Kato Y, Isozaki, Kayatani H, Tamura T, Kiura K. The impact of bevacizumab on combination low-dose afatinib and cetuximab therapy in lung cancer cells harboring activated EGFR mutations (Abstract #1368), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA, AACR Annual Meeting 2015 April 18-22, 2015
Hashida S, Ohashi K, Matsubara T, Ohtsuka T, Watanabe M, Suzawa K, Maki Y, Yamamoto H, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Miyoshi S, Kiura K, Toyooka S. Non-invasive EGFR T790M detection using droplet digital PCR system (Abstract #5248), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA, Pennsylvania, AACR Annual Meeting 2015 April 18-22, 2015
Isozaki H, Ichihara E, Yasugi M, Ochi N, Hotta K, Takigawa N, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. ALK inactivation induced acquired resistance to

alectinib in lung cancer harboring EML4-ALK fusion gene. (Abstract #3721) San Diego Convention Center, San Diego, California, USA, AACR Annual Meeting 2014, April 5-9, 2014
Yamamoto H, Higasa K, Sakaguchi M, Shien K, Sohda J, Takigawa N, Matsuo K, Kiura K, Miyoshi S, Fumihiko Matsuda F, Shinichi Toyooka S. Novel germline G660D mutation in HER2 gene detected by whole-exome sequencing can predispose a patient to developing familial lung adenocarcinoma (Abstract#LB-291) San Diego Convention Center, San Diego, California, USA, AACR Annual Meeting 2014, April 5-9, 2014

〔図書〕(計2件)

木浦勝行 治療の進歩 EGFR-TKIs 耐性肺癌に対する新しい分子標的治療 Annual Review 呼吸器 2014 中外医学社 Page196-206(2014.01)273
木浦勝行【最新肺癌学-基礎と臨床の最新研究動向-】肺癌の治療戦略 集学的治療 手術不能 III 期非小細胞肺癌 日本臨床(0047-1852)71 巻増刊6 最新肺癌学 Page604-610(2013.11)759

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)なし

取得状況(計0件)なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木浦 勝行 (KIURA Katsuyuki)
岡山大学・大学病院・教授
研究者番号：10243502

(2)研究分担者

近藤 英生 (KONDO, Eisei)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師
研究者番号：30379747

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

工藤 健一郎 (KUDO, Kenichiro)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・大学院生