

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860654

研究課題名(和文) 肺癌における耐性克服・新規治療標的としての新規癌関連遺伝子の同定

研究課題名(英文) Investigation of new target of tolerance of molecular target drug for non small cell lung cancer

研究代表者

石川 里奈子 (Ishikawa, Rinako)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10633844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は部位別癌死亡者数においても第一位をしめ、日本において毎年70000人の死亡数を認め、新たな治療戦略の開発が求められている。本研究の目的はEGFR阻害剤、EML4-ALK阻害剤が、各変異遺伝子保有細胞を根絶できず、結果として耐性細胞を生じてしまう分子機構を探ることにある。阻害剤投与数日後の遺伝子発現変化より包括的に検索し、非小細胞肺癌治療に直接繋がる分子標的の同定を目的とした。EGFR 遺伝子変異細胞、EML4-ALK 保有細胞で、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤投与後に共通して上昇し、K-ras遺伝子変異細胞では上昇しない遺伝子を発見した。現在その機能確認のための実験を施行中である

研究成果の概要(英文)：Patients of Non-small cell lung cancer(NSCLC) are increasing. NSCLC is one of major cause of death. New strategy for NSCLC is needed. Our purpose of this study is finding new target of tolerance of molecular target drug. In our study, we find one candidate gene.

研究分野：肺癌

キーワード：非小細胞肺癌 分子標的治療 耐性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

肺がんは部位別癌死亡者数においても第一位をしめ、日本において毎年 70000 人の死亡数を認め、新たな治療戦略の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は EGFR 阻害剤、EML4-ALK 阻害剤が、各変異遺伝子保有細胞を根絶できず、結果として耐性細胞を生じてしまう分子機構を探ることにある。阻害剤投与数日後の遺伝子発現変化より包括的に検索し、非小細胞肺癌治療に直接繋がる分子標的の同定を目的とする。

3. 研究の方法

EGFR 遺伝子変異、EML4-ALK 融合遺伝子、K-ras 遺伝子変異は、非小細胞肺癌で認められる主要な遺伝子変異である。しかしながら、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤はそれぞれの遺伝子変異を有する肺癌に著効するにもかかわらず、K-ras 阻害剤は無効であることが知られている。非小細胞肺癌の遺伝子変異の理解は単純ではない。EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤は全ての癌細胞を殺し切らず、一部の肺癌細胞は残存する。

この現象は、同一性の強いと思われる細胞株において観察され、さらに臨床で分子治療薬の効果が不十分な大きな理由と考えられる。細胞死に陥る細胞と生存する細胞の違いは何なのか。EGFR、ALK 融合遺伝子、K-ras は、全て細胞増殖・生存シグナル伝達経路中の分子だが、既知のシグナル伝達経路図を見ても上記の疑問に対する答えは明確でない。

さらに短時間のシグナル伝達はリン酸化など既存の蛋白の修飾によって行なわれるが、細胞生存・増殖などの長期間の変化は遺

伝子発現を通じて実現されるため、遺伝子発現の面からの検討が必要である。EGFR 遺伝子変異細胞、EML4-ALK 保有細胞で、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤投与後に共通して上昇し、K-ras 遺伝子変異細胞では上昇しない遺伝子（遺伝子 A）とする。遺伝子 A は分子標的治療時に残存癌細胞の生存に関与している可能性があると考えられる。（図 1）

2013・2014 年度科研費にて、EGFR 阻害剤、EML4-ALK 阻害剤、K-ras 阻害薬にて各変異遺伝子保有細胞をノックダウンし、各遺伝子阻害前、各遺伝子阻害 96 時間目で包括的にマイクロアレイ（各 n=3）にて比較検討した。96 時間としたのは、阻害剤投与後速やかにアポトーシスに陥る細胞の影響を除外し、阻害剤投与にも関わらず生存する細胞の遺伝子発現パターンを観察するためである。各細胞 n=3 とした実験により、EGFR 遺伝子変異細胞、EML4-ALK 保有細胞で、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤投与後に共通して上昇し、K-ras 遺伝子変異細胞では上昇しない遺伝子を解析した。（図 2）

図 1 :
癌遺伝子のシグナル遮断で発現が増加する遺伝子は :

EGFR シグナル EML4-ALK シグナル

< 阻害 > < 阻害 >

遺伝子 A の上昇

未知癌遺伝子シグナル

- (1) 細胞生存に関与している可能性がある
- (2) 未知癌遺伝子の同定に使用できる可能性がある

図2：実験の手順

【実験手順 1】

EGFR 変異細胞株

< EGFR シグナル抑制 >

96 時間後に発現が増加している遺伝子

【実験手順 2】

EML4-ALK 変異細胞株

< EML4-ALK シグナル抑制 >

96 時間後に発現が増加している遺伝子

【実験手順 3】

K-RAS 変異細胞株

< EML4-ALK シグナル抑制 >

96 時間後に発現が増加している遺伝子

【実験手順 4】

手順 1・2 で EGFR 遺伝子変異細胞株・EML4-ALK 変異細胞株にて発現が増加し、手順 3 で K-RAS 変異細胞株にて発現が増加している遺伝子を除外し、遺伝子 A を選択。

4 . 研究成果

EGFR 遺伝子変異細胞、EML4-ALK 保有細胞で、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤投与後に共通して上昇し、K-ras 遺伝子変異細胞では上昇しない遺伝子（遺伝子 A1 とする）を発見した。またこの実験において、EML4-ALK 保有細胞単独にて、ALK 阻害剤投与後に上昇する遺伝子（遺伝子 A2 とする）を発見した。

遺伝子 A1 は各分子標的治療に共通して、遺伝子 A2 は EML4-ALK 阻害剤耐性時に残存癌細胞の生存に関与している可能性があると考えられる。遺伝子 A1・2 は、その細胞で主として働いているチロシンキナーゼの阻害に応答する遺伝子であると考えられるが、遺伝子 A1・2 とシグナル伝達経路においてチロシンキナーゼとの関連においては未知の遺伝子であった。

このため、遺伝子 A1 に対して、遺伝子 A1 を阻害する siRNA を作成し、遺伝子 A1 を阻害した細胞と阻害していない細胞において、すべてのチロシンキナーゼを real time PCR にて検出し、発現に変化を認めるチロシンキナーゼを同定する実験などを施行中である。

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 3 件)

論文名：Case Report: Successful treatment of carcinomatous meningitis with erlotinib and whole brain radiotherapy

著者：Rinako Ishikawa, Tetsuya Okano, Nobuyuki Koyama, Akiko Kaga, Harue Utsugi, Tomohiko Mio, Hisayoshi Daito, Yuri Maeno, Yuka Uchida, Yoshiaki Nagai, Yoshitake Murayama, Futoshi Kotajima, Hirozou Sakaguchi, Kunihiko Kobayashi

掲載誌名:Annals of Cancer Research and Therapy

巻,頁：20(2), 58-62 発表年：2012 年

論文名：Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer.

著者：Huqun , Rinako Ishikawa(
Identical co-author),Jialing Zhang,
Hitoshi Miyazawa, Yoshiya
Goto , Yoshihiko Shimizu, Koichi
Hagiwara,and Nobuyuki Koyama
掲載誌名：Cancer
巻,頁：118(6):1599-606 発表年：2011年

論文名：アファチニブの下痢に対する半
夏瀉心湯の使用

著者：山口 央、川島 彬子、塩野 文
子、前野 有理、石川 里奈子、増本
愛、宇津木 春枝、大東 久佳、岡野 哲
也、村山 芳武、小林 国彦
掲載誌名：癌と化学療法
巻,頁：42 巻5号 Page581-583
発表年：2015年

〔学会発表〕(計 2件)

第18回アジア太平洋呼吸器学会学術集
会
2013年11月13日 石川里奈子,岡野哲也,
三尾友彦,川島彬子,増本 愛,前野有理,
山崎 進,山口 央,大東久佳,村山芳武,
萩原弘一,小林国彦
Carcinomatous Meningitis And EGFR
Mutation 口演発表

第54回日本呼吸器学会学術集会
石川里奈子,岡野哲也,三尾友彦,川島彬子,
増本 愛,前野有理,山崎 進,山口 央,
大東久佳,村山芳武,萩原弘一,小林国彦
Carcinomatous Meningitis And EGFR
Mutation ポスター発表

〔図書〕(計 1件)

図書名：クリニックマガジン
貴方も名医_サイトメガロウィル
ス肺炎についての記事

著者：石川里奈子、小林国彦
出版元：クリニックマガジン

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 里奈子 (Rinako Ishikawa)
埼玉医科大学 医学部 助教
研究者番号：10633844