

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09170

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた抗癌剤耐性肺癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for lung cancer using genetically modified transgenic mice

研究代表者

Gabazza Esteban (Gabazza, Esteban)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00293770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：世界における肺癌死亡患者は今なお、増加傾向が続いている。化学療法が治療の中心となっているが、非小細胞肺癌では細胞膜貫通受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)が使用可能となつて以来、分子標的治療薬の有効性について多くのエビデンスが創出されてきた。EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌に対してEGFR-TKIは高い奏効率を有するが、殆どの症例が約1年で耐性を獲得するため、EGFR-TKI耐性例の治療薬の開発が求められている。本研究では我々はEGFR遺伝子のL858R変異に加えT790M耐性変異を組み込んだ新たな肺癌モデルマウスを作製し、新規治療薬に使用できるバイオマーカーを開発した。

研究成果の概要(英文)：The number of patients dying for lung cancer remains increasing worldwide. The main therapy for lung cancer is chemotherapy but since demonstration of the therapeutic efficacy of epithelial growth factor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor several clinical trials have shown the effectiveness of molecular targeted therapy. EGFR tyrosine kinase inhibitor is very effective against non-small cells lung cancer but within one year, most tumors acquire resistance. In the present study, we developed a new model of non-small cell lung cancer caused by EGFR gene mutations (L858R + T790M) and showed the usefulness of measuring several parameters as biomarkers to monitor response to therapy. We are currently using this mouse model and biomarkers to evaluate novel therapies using siRNA against various transcription factors.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞膜貫通受容体 チロシンキナーゼ阻害剤 非小細胞肺癌 遺伝子変異 分子標的治療 転写因子
核酸薬品 治療耐性

1. 研究開始当初の背景

世界における肺癌死亡患者は今なお、増加傾向が続いており、全悪性腫瘍中の臓器別死亡数で依然として第1位となっている。今のところ化学療法が治療の中心となっているが、非小細胞肺癌では2002年に細胞膜貫通受容体チロシンキナーゼ (epithelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor=EGFR-TKI) であるゲフィチニブが一般臨床で使用可能となって以来、分子標的治療薬の有効性についてこれまで多くのエビデンスが創出されてきた。ゲフィチニブおよびエルロチニブはEGFRチロシンキナーゼを特異的にATP競合的に阻害し、恒常的に活性化したEGFR下流シグナルを抑制することで抗腫瘍効果を発揮する。EGFRをコードする遺伝子のうち、エクソン19にコードされるDNAの欠失変異、エクソン21にコードされる858番目のロイシンアルギニンへの点突然変異(L858R)などが明らかとなっている。これらのEGFR遺伝子変異を有する肺癌症例ではEGFR-TKIによる高い奏効率が報告されているが、二次変異獲得、MET遺伝子増幅などによりEGFR-TKIに耐性となる。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR-TKI耐性を示す肺特異的ヒト「L858R」EGFR過剰発現する肺癌マウスモデルを作製し、肺癌のEGFR-TKI耐性を克服できるか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1)ヒト[L858R]EGFR recombinant bacterial artificial chromosome (BAC) 遺伝子誘導発現トランスジェニックマウスを用いてEGFR-TKI耐性肺癌モデルマウスの作製法: Politiらの方法(Cold Spring Harb Protoc 178-81, 2014; Dis Model Mech 3:111-9, 2013)に従い、肺特異的h[L858R]EGFR BAC遺伝子誘導発現トランスジェニックマウスを用いてエルロチニブ耐性肺癌モデルマウスを作製した。Politiらの方法により、エルロチニブ(25 mg/kg/day)は間欠的に投与することにより、EGFR-TKI耐性の肺癌モデルマウスの作製が可能であることが報告された。本研究でもEGFR-TKI耐性の肺癌モデルマウスの作製を同方法で確認した。

(2) 新たなEGFR-TKI耐性肺癌を発症するヒト[L858R+T790M]EGFR-BACトランスジェニックマウスの作製法: ヒト[L858R+T790M]EGFR RecBACトランスジェニックマウスを作出するため、Red/ET戦略を利用して[T790M]フラグメントを組み込むためのレシピエントとなる組換えBACクローンを構築した。先に構築したtetO-h[L858R]EGFR RecBACのEGFR遺伝子のエクソン20にセレクションマーカーを挿入し、ヒトBACクローンのEGFR遺伝子産物をコードするゲノム領域のうちエクソン20のゲノムDNA配列を削除して、tetO-h[L858R+T790M]EGFR RecBACの中間体を

調製した。さらにRed/ET戦略を利用してヒトEGFR遺伝子のエクソン20に挿入したセレクションマーカーを[T790M]フラグメントと置換して、組換えBAC型tetO-h[L858R+T790M]EGFR RecBAC発現コンストラクトを構築した。

(3) 免疫チェックポイント分子(programmed cell death 1=PD-1; PD-1 ligand=PD-L1)、クララ細胞分泌蛋白(clara cell secretory protein: CCSP)、肺表面活性タンパク質C(SP-C)の発現の検討: PD-1、PD-L1、CCSP、SP-Cの染色はバイオ病理研究所で行われてきた。PD-L1、PD-1の発現を免疫染色で評価し、画像処理ソフトウェアのWinROOFを使用して定量化した。さらに、肺癌組織中のPD-L1とPD-1の発現程度はreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)法で加えて検討した。ペントバルビタールナトリウムの麻酔下マウスから採血を行い、血漿中のSP-C、SP-D、可溶性EGFRをELISA法で測定した。

(4) EGFR-TKIの対する肺腫瘍の感受性の検討: TKIであるエルロチニブを投与して肺腫瘍の効率を検討した。

4. 研究成果

本研究で作製したヒト[L858R]EGFRトランスジェニックマウスではTet-on systemを応用しており、ドキシサイクリン入りの餌をマウスに与えたら肺癌が発症することを胸部CT(図1)と肺組織のH&E染色(図2)で確認した。肺癌の組織型は腺癌であるが、肺泡置換性パターン、充実性パターン、乳頭状パターン、粘液性肺腺癌などの多彩なパターンを示している(図2)。肺腺癌はII型肺胞上皮やクララ細胞から由来すると知られ、ヒト[L858R]EGFRトランスジェニックマウスの肺癌組織中のクララ細胞のマーカーであるCCSPと肺胞上皮細胞のマーカーであるSP-Cの免疫染色を行った。本TGマウスの肺癌細胞上にCCSPとSP-Cの発現が陽性であった(図3)。肺癌細胞由来ヒト[L858R]EGFR肺癌と同じようにTKIに対する感受性があるかを確認するため、TKIのエルロチニブをTGマウスに投与してその効果を検討した。その結果、図4の如く、TKI非投与群に比べ、TKIを投与した群では腫瘍が認められなかった。EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌に対してEGFR-TKIは高い奏効率を有するが、ほとんどの症例が約1年で耐性を獲得するため、EGFR-TKI耐性例における治療薬の開発ならびに耐性機序の解明が求められている。本研究では使用したヒト[L858R]EGFRトランスジェニックマウスの肺癌組織を用いて治療耐性に関わるEGFR遺伝子変異(T790M)を検討したところ、T790Mの発現はRT-PCRで確認できた(図5)。

癌の治療標的でもある免疫チェックポイント分子の発現も検討した。癌ない部位に比べ、PD-L1(図6)とPD-1(図7)の発現は有意に高値を示した。血漿中のSP-A、SP-C、可溶性

EGFR、可溶性 PD-L1、可溶性 PD-1 の濃度は治療効果のバイオマーカーとしての有用性を明らかにするため ELISA 法を用いて測定した。TG マウスでは野生型マウスに比べ、SP-A、SP-C、可溶性 EGFR と可溶性 PD-L1 の血中濃度は有意に高かった(図 8、図 9)。可溶性 PD-1 の血漿中濃度は野生型マウスと TG マウスの間に有意な差が見られなかった(図 9)。この結果よりこのマウスのバイオマーカー、癌化マーカーとして SP-A、SP-D、可溶性 EGFR、可溶性 PD-L1 が有用である可能性が考えられる。TKI 耐性肺癌に対する新規治療の開発の目的で、L858R 変異に加え T790M 耐性変異を組み込んだ肺癌モデルマウスも作製した。先ず、tetO-h[L858R+T790M]EGFR RecBAC 組換え BAC クローンと CCSP_rtTA 組換え BAC クローンを精製、直鎖化し、パルスフィールド電気泳動を行い、高純度 BAC DNA フラグメントの精製を行った。分析用アガロースゲル電気泳動により精製した発現コンストラクトの純度と濃度を調べたところ、純粋な長鎖の発現コンストラクトが回収できた。そして、C57BL/6J マウスから受精卵を採取し、マイクロインジェクション法により tetO-h[L858R+T790M]EGFR RecBAC 発現コンストラクトを導入した。発現コンストラクトをマイクロインジェクションした受精卵を、偽妊娠処置を受けたマウスの卵管に移植した。その結果、合計 355 個の受精卵に発現コンストラクトを注入し、合計 300 個の注入胚を偽妊娠マウスに移植して自然分娩させたところ、これらの遺伝子を注入した受精卵から合計 56 頭のマウス産子を得ることができた。ヒト[L858R]EGFR トランスジェニックマウスと同様に本ヒト[L858R+T790M]EGFR トランスジェニックマウスでは Tet-on system を応用しており、ドキシサイクリン入りの餌をマウスに与えたら肺癌が発症することを胸部 CT と肺組織の H&E 染色で確認した(図 10)。

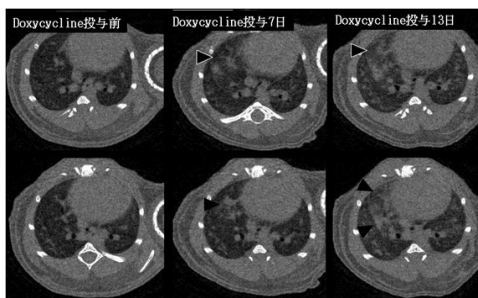


図1. ヒト[L858R]EGFR-TGマウスの胸部CT所見

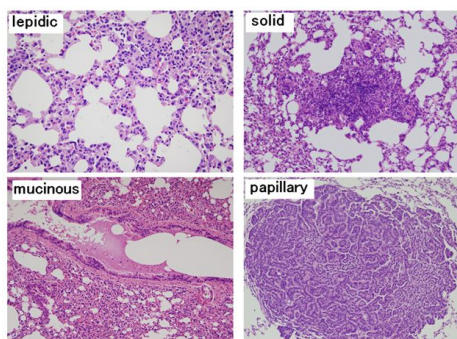


図2. ヒト[L858R]EGFR-TGマウスの肺癌組織所見

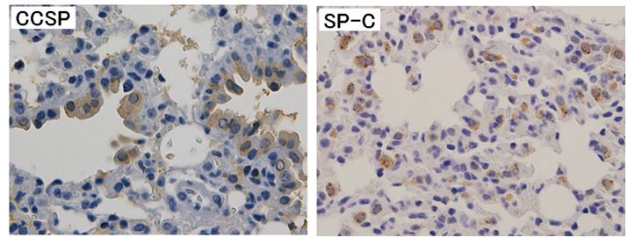


図3. ヒト[L858R]EGFR-TGマウスの肺癌組織のCCSPとSP-Cの発現

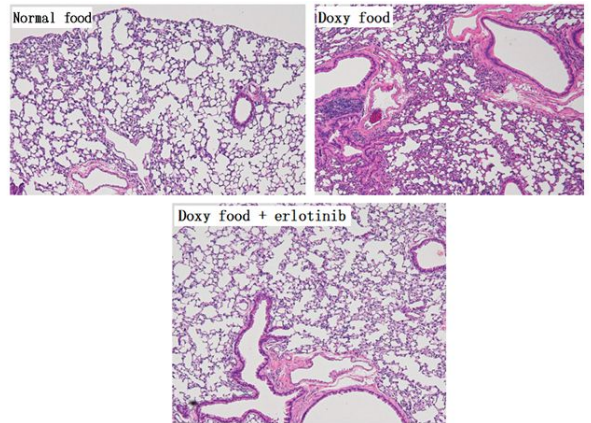


図4. ヒト[L858R]EGFR-TGマウスにおけるerlotinib投与前後の組織像

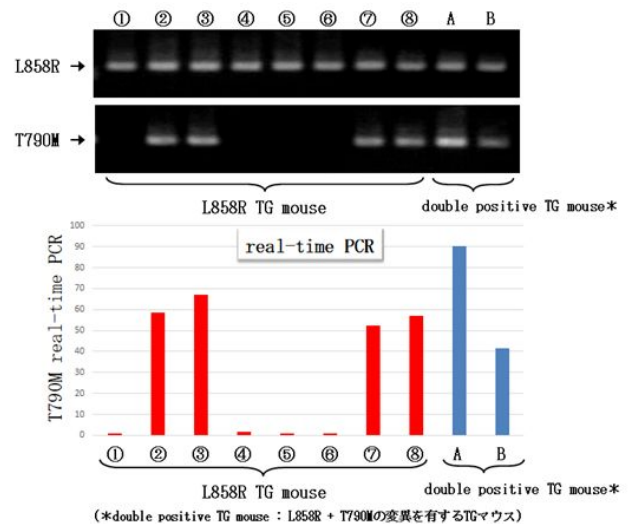


図5. ヒト[L858R]EGFR-TGマウスにおけるEGFR 遺伝子の二次変異 (T790M)

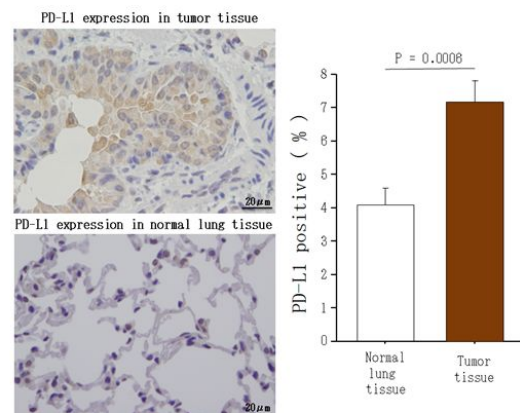


図6. ヒト[L858R]EGFR-TGマウスの肺癌組織のPD-L1発現

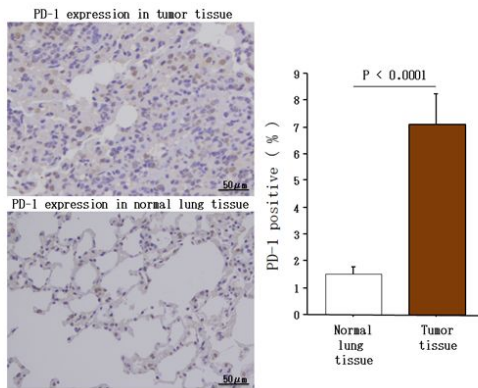


図7. ヒト [L858R]EGFR-TGマウスの肺癌組織のPD-1発現

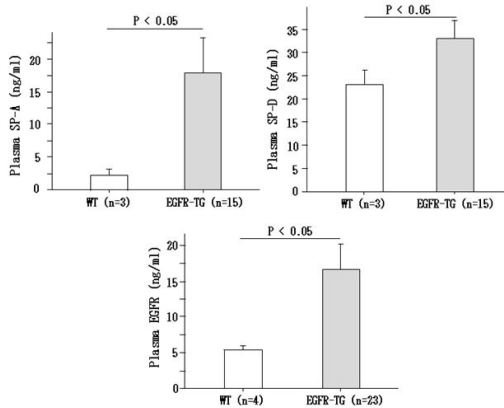


図8. ヒト [L858R]EGFR-TGマウスにおける血漿中のSP-A、SP-D、可溶性EGFR

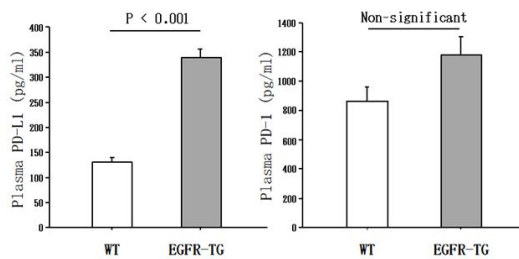


図9. ヒト [L858R]EGFR-TGマウスにおける血漿中のPD-L1とPD-1

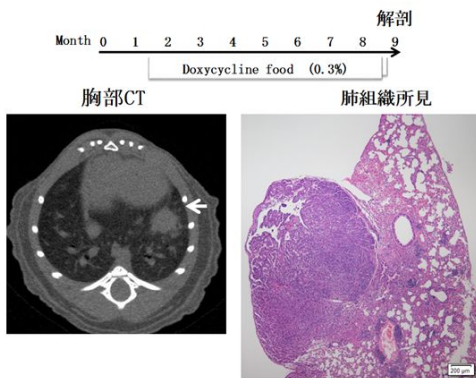


図10. ヒト [L858R+T790M]EGFR TGマウスで発症した肺癌のCTと組織所見

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 16 件)

1. Onishi M, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujimoto H, Chelakkot-Govindalayathil AL, Takahashi Y,

Yasuma T, Nishihama K, Toda M, Takei Y, Taguchi O, Gabazza EC. Mice overexpressing latent matrix metalloproteinase-2 develop lung emphysema after short-term exposure to cigarette smoke extract. *Biochem Biophys Res Commun.* 497:332-338, 2018 査読有

2. Totoki T, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Tonto PB, Takeshita A, Yasuma T, Nishihama K, Iwasa M, Horiki N, Takei Y, Gabazza EC. Protein S Exacerbates Chronic Liver Injury and Fibrosis. *Am J Pathol.* 188: 1195-1203, 2018 査読有

3. Harada E, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Morizono T, Totoki T, Yasuma T, Nishihama K, Kobayashi T, Sumiya T, Kawagishi H, Gabazza EC. The Medicinal Mushroom, *Grifola gargal*, Ameliorates Allergic Bronchial Asthma. *J Med Food.* 21:136-145, 2018 査読有

4. Nishii Y, Hataji O, Ito K, Watanabe F, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Toda M, Taguchi O, Yamamoto N, Gabazza EC. Efficacy of osimertinib in a patient with non-small cell lung cancer harboring epithelial growth factor receptor exon 19 deletion/T790M mutation, with poor performance status. *Mol Clin Oncol.* 8:246-249, 2018 査読有

5. Nishihama K, Yasuma T, Yano Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Hinneh JA, Tonto PB, Takeshita A, Totoki T, Mifuji-Moroka R, Kobayashi T, Iwasa M, Takei Y, Morser J, Cann I, Gabazza EC. Anti-apoptotic activity of human matrix Metalloproteinase-2 attenuates diabetes mellitus. *Metabolism.* 82: 88-99, 2018 査読有

6. Fujiwara A, Yoshida M, Fujimoto H, Nakahara H, Ito K, Nishihama K, Yasuma T, Hataji O, Taguchi O, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Kobayashi T. A Retrospective Comparison of the Clinical Efficacy of Gefitinib, Erlotinib and Afatinib in Japanese Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Oncol Res.* 2018. doi: 10.3727/096504018X15151523767752. 査読有

7. Hataji O, Nishii Y, Ito K, Sakaguchi T, Saiki H, Suzuki Y, D'Alessandro-Gabazza C, Fujimoto H, Kobayashi T, Gabazza EC, Taguchi O. Smart watch-based coaching with tiotropium and olodaterol ameliorates physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Ther Med.* 14:4061-4064, 2017 査読有

8. Tomaru A, Kobayashi T, Hinneh JA, Baffour Tonto P, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujimoto H, Fujiwara K, Takahashi Y, Ohnishi M, Yasuma T, Nishihama K, Yoshino M, Takao K, Toda M, Totoki T, Takei Y, Yoshikawa K, Taguchi O, Gabazza EC. Oligonucleotide-targeting periostin ameliorates pulmonary fibrosis. *Gene Ther.* 24:706-716, 2017 査読有

9. Fujiwara K, Kobayashi T, Fujimoto H, Nakahara H, D'Alessandro-Gabazza CN, Hinneh JA, Takahashi Y, Yasuma T, Nishihama K, Toda M, Kajiki M, Takei Y, Taguchi O, Gabazza EC. Inhibition of Cell Apoptosis and Amelioration of Pulmonary Fibrosis by Thrombomodulin. *Am J Pathol.* 187:2312-2322, 2017 査読有

10. Toda M, Totoki T, Nakamura C, Yasuma T, D'Alessandro-Gabazza CN, Mifuji-Moroka R, Nishihama K, Iwasa M, Horiki N, Gabazza EC, Takei Y. Low dose of alcohol attenuates pro-atherosclerotic activity of thrombin. *Atherosclerosis.* 265:215-224, 2017 査読有

11. Kobayashi T, Fujimoto H, D'Alessandro-Gabazza C, Gabazza EC, Hataji O. Recent studies move closer to answering questions about sequential therapy for anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 9:2847-2851, 2017 査読有

12. Uemura M, Yano Y, Suzuki T, Yasuma T, Sato T, Morimoto A, Hosoya S, Suminaka C, Nakajima H, Gabazza EC, Takei Y. Comparison of Glucose Area Under the Curve Measured Using Minimally Invasive Interstitial Fluid Extraction Technology with Continuous Glucose Monitoring System in Diabetic Patients. *Diabetes Metab J*. 41:265-274, 2017 査読有
13. Kainuma K, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Yasuma T, Nishihama K, Fujimoto H, Kuwabara Y, Hosoki K, Nagao M, Fujisawa T, Gabazza EC. β_2 adrenergic agonist suppresses eosinophil-induced epithelial-to-mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. *Respir Res*. 18:79, 2017 査読有
14. Ishinaga H, Kitano M, Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC, Shah SA, Takeuchi K. Interleukin-33 induces mucin gene expression and goblet cell hyperplasia in human nasal epithelial cells. *Cytokine*. 90:60-65, 2017 査読有
15. Yamanaka K, Nakanishi T, Isono K, Hasegawa C, Inada H, Mizutani K, Matsushima Y, Okada K, Mabuchi T, Kondo M, Yamagiwa A, Kakeda M, Habe K, Nosaka T, Gabazza EC, Yamazaki H, Mizutani H, Kawano M. Restrictive IL-10 induction by an innocuous parainfluenza virus vector ameliorates nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 139:682-686, 2017 査読有
16. Ito K, Hataji O, Kobayashi H, Fujiwara A, Yoshida M, D'Alessandro-Gabazza CN, Itani H, Tanigawa M, Ikeda T, Fujiwara K, Fujimoto H, Kobayashi T, Gabazza EC, Taguchi O, Yamamoto N. Sequential Therapy with Crizotinib and Alectinib in ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer-A Multicenter Retrospective Study. *J Thorac Oncol*. 12:390-396, 2017 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 小林 哲, Esteban C. Gabazza, 浦田 健太郎, 高橋 佳紀, 都丸 敦史, 藤原 研太郎, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, Corina N. D' Alessandro-Gabazza, 戸田 雅昭, 田口 修. 気道の線維化の先には発癌があるのか? 第 36 回気道分泌研究会. (東京グランドホテル) 2017 年 4 月 8 日
2. 高橋 佳紀, 小林 哲, 浅山 健太郎, 都丸 敦史, 藤原 研太郎, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, ガバザ エステバン, 田口 修. 肺癌モデルマウスにおけるバイオマーカーの検討 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会. (東京国際フォーラム) 2017 年 4 月 21 - 23 日
3. 藤原 研太郎, 小林 哲, 浅山 健太郎, 都丸 敦史, 高橋 佳紀, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, 安間 太郎, ガバザ エステバン, 田口 修. 変異 EGFR 導入マウスにおける肺腺癌の組織パターンの検討 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会. (東京国際フォーラム) 2017 年 4 月 21 - 23 日
4. 中原 博紀, 小林 哲, 浅山 健太郎, 都丸 敦史, 高橋 佳紀, 藤原 研太郎, 大西 真裕, 藤本 源, ガバザ コリナ, ガバザ エステバン, 田口 修. プレオマイシン誘発肺線維症におけるプロテイン S のアポトーシス抑制効果についての検討

- 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会. (東京国際フォーラム) 2017 年 4 月 21 - 23 日
5. 浅山 健太郎, 小林 哲, 高橋 佳紀, 都丸 敦史, 藤原 研太郎, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, Corina Gabazza, Esteban Gabazza, 田口 修. マウス肺線維症モデルにおいて thrombomodulin は防御的に働く 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会. (東京国際フォーラム) 2017 年 4 月 21 - 23 日
- 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会. (名古屋国際会議場) 2017 年 5 月 18 - 20 日
6. 藤原 研太郎, 小林 哲, 浅山 健太郎, 都丸 敦史, 高橋 佳紀, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, 西濱 康太, 安間 太郎, ガバザ コリナ, 戸田 雅昭, ガバザ エステバン, 田口 修. マトリックスメタロプロテアーゼ 2 遺伝子導入喘息マウスにおける気道病変の解析 第 66 回日本アレルギー学会学術大会. (東京国際フォーラム) 2017 年 6 月 16 日 18 日
7. 藤本 源, 藤原 拓海, 浅山 健太郎, 高橋 佳紀, 都丸 敦史, 藤原 研太郎, 大西 真裕, 中原 博紀, 小林 哲, ガバザ エステバン, 田口 修. 多発脳転移に対してオンメルチニブが著功した T790M 陽性肺腺癌の 1 例 第 111 回日本肺癌学会中部支部学術集会. (名古屋市立大学病院 病棟・中央診療棟 3F 大ホール) 2017 年 9 月 23 日
8. 藤原 研太郎, 小林 哲, 浅山 健太郎, 都丸 敦史, 高橋 佳紀, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, 安間 太郎, ガバザ コリナ, ガバザ エステバン, 田口 修. L858R 変異 EGFR 導入マウスに発生した肺腺癌の組織パターンの特徴 第 58 回日本肺癌学会学術集会. (パシフィコ横浜 会議センター1 階 フォワイエ) 2017 年 10 月 14 日 15 日
9. 高橋 佳紀, 浅山 健太郎, 都丸 敦史, 藤原 研太郎, 大西 真裕, 中原 博紀, 藤本 源, 小林 哲, ガバザ エステバン, 田口 修. ヒト変異 EGFR 遺伝子全長を組み込んだ肺癌モデルマウスにおけるバイオマーカーの検討 第 58 回日本肺癌学会学術集会. (パシフィコ横浜 会議センター1 階 フォワイエ) 2017 年 10 月 14 日 15 日
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称: 肺特異的にヒト EGFR を発現する非ヒト哺乳類のトランスジェニック動物
発明者: ガバザ・エステバン; ガバザ・コリナ
権利者: 三重大学
種類: 特許
番号: WO/2017/026383

出願年月日：05.08.2016

国内外の別： 国外

取得状況（計 1 件）

名称：線維症予防又は治療剤

発明者：ガバザ・エステバン、小林哲、豊福
秀一、福田綾子、長谷川哲也

権利者：国立三重大学、大塚製薬株式会社

種類：特許

番号：特許第 6311148 号

出願年月日：2012/01/13

取得年月日：2018/03/30

国内外の別： 日本

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/immunology/>

6．研究組織

(1)研究代表者

Gabazza Esteban

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00293770

(2)研究分担者

戸田 雅昭 (TODA, Masaaki)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10202201

GABAZZA CORINA

三重大学・医学系研究科・特任助教

(研究担当)

研究者番号：10750656

(3)連携研究者

John Morser

三重大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号：40571625