

平成30年6月13日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15458

研究課題名（和文）特発性間質性肺炎におけるdruggableリン酸化酵素の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of druggable tyrosine kinase in idiopathic interstitial pneumonia

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） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：特発性間質性肺炎に対する個別化医療を確立するため肺線維症に対する肺移植治療や肺癌治療における摘出肺を包括的にキナーゼ発現解析を行った。5患者合計13サンプルの遺伝子発現解析の結果、そのプロファイルは非常に多様性に富み不均一であった。同一患者の複数部位の比較においても、その遺伝子発現は不均一で、肺線維症が非常に多様な疾患であることが示唆された。ERBB4やSFK発現亢進している症例があり、治療標的の候補と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We performed comprehensive analysis in pulmonary fibrosis to develop precision medicine. We obtained 13 samples from 5 patients. 6 samples were from bilateral pneumotectomy. The gene expression profile was heterogeneous even in same patient. ERBB4 or PIM2 was overexpressed in some of our cases. These genes might be possible druggable target for pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺線維症

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌領域では、発がんの直接的な原因遺伝子であるドライバー遺伝子が明らかになり、それらを標的とした新規分子標的薬が開発され、治療戦略が大きく変化した。一方、特発性肺線維症診療では肺癌のような個別化治療はなされていない。近年、抗線維化薬であるピルフェニドンやニンテダニブなどの特発性肺線維症に対する有効性がある程度示されているが、特発性肺線維症を遺伝子プロファイリングにより個別化し、特異的な分子標的薬を使用する治療戦略は開発されていない。申請者らは特発性肺線維症に肺癌は高頻度に合併し、広義には同じ増殖性疾患であることから、肺癌と同様の治療戦略を特発性肺線維症診療に応用すること着想した。

2. 研究の目的

特発性肺線維症肺において、キナーゼを網羅的に解析し、患者毎に治療対象となる遺伝子候補を探索する。

3. 研究の方法

特発性肺線維症患者の肺移植摘出肺および肺癌摘出肺の非癌部からサンプルを採取し研究に用いた。特発性肺線維症肺は同一肺内においても線維化の程度のばらつきが非常に大きい為、可能な限りにおいて同一肺から複数サンプルの採取を行った。比較対象として特発性肺線維症を有さない肺癌患者の手術摘出肺非癌部から採取した肺サンプルを用いた。

各サンプルから RNA を抽出し、キナーゼを網羅的に解析できる SureSelect Human Kinome RNA Kit® (Agilent Technologies) を用いてライブラリを作成した。このライブラリを次世代シーケンサー (MiSeq) を用いてシーケンスし、キナーゼの網羅的な遺伝子発現解析を行った。特に使用可能なキナーゼ阻害剤が存在する遺伝子に注目して解析を行った。正常肺と比較して発現の亢進している遺伝子に関しては、免疫染色にて確認を行うとともに、同遺伝子の発現細胞の同定を行った。

4. 研究成果

特発性肺線維症患者5名から採取した計13サンプル、および正常肺8サンプルを解析した。全サンプルの解析では、DCLK1 (Doublecortin Like Kinase 1) や STK33 (Serine/Threonine Kinase 33) といったキナーゼ遺伝子が特発性肺線維症肺において高発現であった。これらの遺伝子はこれまでの研究データにおいても特発性肺線維症肺で発現の亢進が示されており、既報と矛盾のない結果であった。すべての患者を統合して抽出されたこれらの遺伝子は大部分の特発性肺線維症で発現が亢進している遺伝子と考えられた。

次に各症例毎の解析を行った。症例1においては、上記DCLK1に加えてPDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4) の発現亢進がみられ、免疫染色で確認したところ、蜂巢肺を被覆する上皮細胞や線維化部に増殖している平滑筋細胞が染色された。キナーゼ阻害剤の標的候補として、特にERBB4 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4) が高発現であり、免疫染色でも確認された(図1)。ERBB4高発現の特発性肺線維症においては治療標的となる可能性が示唆された。症例2については、STK33の他PIM2 (Pim-2 Proto-Oncogene) の発現亢進がみられた。キナーゼ阻害剤の標的候補として特に、SYK (Spleen Associated Tyrosine Kinase) の発現亢進を認めた。免疫染色では主に肺泡マクロファージが染色され(図2)、肺線維症におけるSYK高発現のマクロファージが治療標的となる可能性が示唆された。症例3ではDCLK1の他PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1) の発現亢進がみられたが、キナーゼ阻害剤のよい標的候補となる遺伝子について、有意に亢進しているものがみられなかった。症例4、5についても、キナーゼ阻害剤のよい標的となる遺伝子で有意に発現の亢進したものはみられなかった。

最期に、肺線維症に対して肺移植治療のため肺全摘出を行った患者から、線維化の程度が様々な複数のサンプルを採取して解析を行った。クラスタリング解析の結果から(図3)、特発性肺線維症肺は遺伝子発現が非常に不均一であることが判明した。すなわち、特発性肺線維症肺は同一肺内においても採取部位によって遺伝子発現パターンが大きく異なるため、遺伝子発現解析を行う際はそれをふまえて検討する必要があると考えられた。

図1 症例1におけるERBB4発現

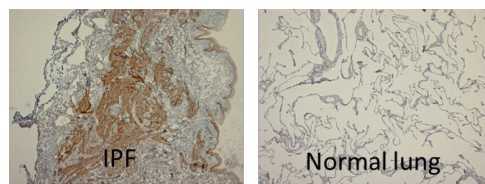


図2 症例2におけるSYK発現

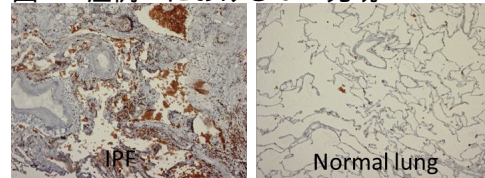
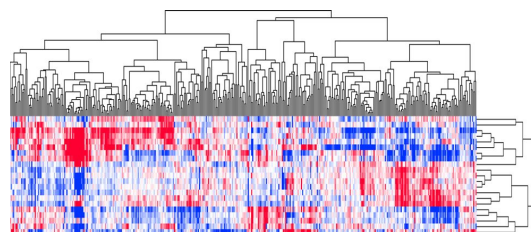


図3 肺全摘症例 部位ごとの遺伝子発現の比較



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 14 件)

Tamura Tomohide, Kiura Katsuyuki, Seto Takashi, Nakagawa Kazuhiko, Maemondo Makoto, Inoue Akira, Hida Toyoaki, Yoshioka Hiroshige, Harada Masao, Ohe Yuichiro, Nogami Naoyuki, Murakami Haruyasu, Kuriki Hiroshi, Shimada Tadashi, Tanaka Tomohiro, Takeuchi Kengo, Nishio Makoto, Three-Year Follow-Up of an Alectinib Phase I/II Study in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: AF-001JP, *Journal of Clinical Oncology*, 査読有, 35 巻, 2017 年, 1515-1521
DOI:10.1200/JCO.2016.70.5749

Hida Toyoaki, Satouchi Miyako, Nakagawa Kazuhiko, Seto Takashi, Matsumoto Shingo, Kiura Katsuyuki, Nokihara Hiroshi, Murakami Haruyasu, Tokushige Kota, Hatano Ben, Nishio Makoto, Ceritinib in patients with advanced, crizotinib-treated, anaplastic lymphoma kinase-rearranged NSCLC: Japanese subset, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 査読有, 47 巻, 2017 年, 618-624
DOI:10.1093/jjco/hyx045

Kudo Kenichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Higo Hisao, Kato Yuka, Kayatani Hiroe, Kurata Yasuko, Takami Yoichiro, Minami Daisuke, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Yoshino Tadashi, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Triplet therapy with afatinib, cetuximab, and bevacizumab induces deep remission in lung cancer cells harboring EGFR T790M in vivo, *Molecular Oncology*, 査読有, 11 巻, 2017 年, 670-681
DOI:10.1002/1878-0261.12063

Shaw Alice T, Kim Tae Min, Crino Lucio, Gridelli Cesare, Kiura Katsuyuki, Liu Geoffrey, Novello Silvia, Bearz Alessandra, Gautschi Oliver, Mok Tony, Nishio Makoto, Scagliotti Giorgio, Spigel David R, Deudon Stephanie, Zheng Cheng, Pantano Serafino, Urban Patrick, Massacesi Cristian, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK -rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised,

controlled, open-label, phase 3 trial , *The Lancet Oncology*, 査読有, 18 巻, 2017 年, 874-886
DOI:10.1016/S1470-2045(17)30339-X

Higo Hisao, Kurosaki Takeshi, Ichihara Eiki, Kubo Toshio, Miyoshi Kentaroh, Otani Shinji, Sugimoto Seiichiro, Yamane Masaomi, Miyahara Nobuaki, Kiura Katsuyuki, Miyoshi Shinichiro, Oto Takahiro, Clinical characteristics of Japanese candidates for lung transplant for interstitial lung disease and risk factors for early death while on the waiting list, *Respiratory Investigation*, 査読有, 55 巻, 2017 年, 264-269
DOI:10.1016/j.resinv.2017.03.002

Tamura Tomoki, Kato Yuka, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro, Makimoto Go, Gotoda Hiroko, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Tanaka Takehiro, Ichimura Koichi, Maeda Yoshinobu, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki, Potential influence of interleukin-6 on the therapeutic effect of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 495 巻, 2018 年, 360-367
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.10.175

Kuyama Shoichi, Ochi Nobuaki, Bessho Akihiro, Hotta Katsuyuki, Ikeda Genyo, Kishino Daizo, Kubo Toshio, Harada Daijiro, Fujimoto Nobukazu, Nakanishi Masamoto, Umeno Takahiro, Okada Toshiaki, Chikamori Kenichi, Yamagishi Tomoko, Ohashi Kadoaki, Ichihara Eiki, Takigawa Nagio, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, A phase II trial of carboplatin plus S-1 for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer with wild-type epidermal growth factor receptor: The Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1202, *Lung Cancer*, 査読有, 112 巻, 2017 年, 188-194
DOI:10.1016/j.lungcan.2017.08.010

Ninomiya Takashi, Nogami Naoyuki, Kozuki Toshiyuki, Harada Daijiro, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Kuyama Shoichi, Kudo Kenichiro, Bessho Akihiro, Fukamatsu Nobuaki, Fujimoto Nobukazu, Aoe Keisuke, Shibayama Takuo, Sugimoto Keisuke, Takigawa Nagio, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki, A phase I trial of afatinib and bevacizumab in chemo-naive patients with advanced

non-smallcell lung cancer harboring EGFR mutations: Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1404, Lung Cancer, 査読有, 115 巻, 2018 年, 103-108
DOI:10.1016/j.lungcan.2017.11.025

Hotta Katsuyuki, Aoe Keisuke, Kozuki Toshiyuki, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro, Ichihara Eiki, Kubo Toshio, Ninomiya Takashi, Chikamori Kenichi, Harada Daijiro, Nogami Naoyuki, Hirata Taizo, Hinotsu Shiro, Toyooka Shinichi, Kiura Katsuyuki, A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Non-Small Cell Lung Cancer, Journal of Thoracic Oncology, 査読有, 13 巻, 2018 年, 273-279
DOI:10.1016/j.jtho.2017.10.032

Reck Martin, Garon Edward B., Paz-Ares Luis, Ponce Santiago, Jaime Jesus Corral, Juan Oscar, Nadal Ernest, Kiura Katsuyuki, Widau Ryan C., He Shuang, Dalal Rita, Lee Pablo, Nakagawa Kazuhiko, Randomized, Double-Blind Phase Ib/III Study of Erlotinib With Ramucirumab or Placebo in Previously Untreated EGFR -Mutant Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (RELAY): Phase Ib Results, Clinical Lung Cancer, 査読有, 19 巻, 2018 年, 213-220
DOI:10.1016/j.clc.2017.11.003

Kiura Katsuyuki, Yoh Kiyotaka, Katakami Nobuyuki, Nogami Naoyuki, Kasahara Kazuo, Takahashi Toshiaki, Okamoto Isamu, Cantarini Mireille, Hodge Rachel, Uchida Hirohiko, Osimertinib in patients with epidermal growth factor receptor T790M advanced non-small cell lung cancer selected using cytology samples, Cancer Scienc, 109 巻, 査読有, 2018 年, 1177-1184
DOI:10.1111/cas.13511

Kiura Katsuyuki, Imamura Fumio, Kagamu Hiroshi, Matsumoto Shingo, Hida Toyooka, Nakagawa Kazuhiko, Satouchi Miyako, Okamoto Isamu, Takenoyama Mitsuhiro, Fujisaka Yasuhito, Kurata Takayasu, Ito Masayuki, Tokushige Kota, Hatano Ben, Nishio Makoto, Phase 3 study of ceritinib vs chemotherapy in ALK-rearranged NSCLC patients previously treated with chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): Japanese subset, Japanese Journal of Clinical Oncology, 査読有, 48 巻, 2018 年, 367-375
DOI:10.1093/jjco/hyy016

Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Tomida Shuta, Higo Hisao, Kayatani Hiroe, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki, MET or NRAS amplification is an acquired resistance mechanism to the third-generation EGFR inhibitor naquotinib, Scientific Reports, 査読有, 8 巻, 2018, on line
DOI:10.1038/s41598-018-20326-z

Makimoto Go, Kubo Toshio, Oze Isao, Ohashi Kadoaki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Soh Junichi, Toyooka Shinichi, Katsui Kuniaki, Takigawa Nagio, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Second primary cancer in survivors of locally advanced non-small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiation followed by surgery, Japanese Journal of Clinical Oncology, 査読有, 48 巻, 2018, 287-290
DOI:10.1093/jjco/hyy003

〔学会発表〕(計3件)

Kiichiro Ninomiya, Kadoaki Ohashi, Shuta Tomida, Hiroe Kayatani, Tomoki Tamura, Hisao Higo, Go Makimoto, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Eiki Ichihara, Akiko Sato, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. Acquired resistance to the third-generation EGFR inhibitor ASP8273 is associated with MET or NRAS gene amplifications in preclinical models, AACR Annual Meeting, 2017 April 1-5, Washington, DC

Go Makimoto, Kadoaki Ohashi, Kazuya Nishii, Shuta Tomida, Hiroe Kayatani, Tomoki Tamura, Hisao Higo, Kiichiro Ninomiya, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Eiki Ichihara, Akiko Sato, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. A comprehensive analysis of autopsied specimens and patient-derived cell lines in ALK-positive lung cancers with rapid acquired resistance to alectinib, AACR Annual Meeting, 2017 April 1-5, Washington, DC

Hisao Higo, Eiki Ichihara, Takeshi Kurosaki, Kentaroh Miyoshi, Toshio Kubo, Shinji Otani, Seiichiro Sugimoto, Masaomi Yamane, Nobuaki Miyahara, Katsuyuki Kiura, Takahiro Oto. Clinical Characteristics of Japanese Candidates for Lung Transplant Due to Interstitial Lung

Disease and Risk Factors for Early Death While on the Waiting List, American Thoracic Society 2017 International Conference, 2017 May 19-24, Washington, DC

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木浦 勝行 (KIURA, Katsuyuki)

岡山大学病院・呼吸器・アレルギー内科・教授

研究者番号： 1 0 2 4 3 5 0 2

(2)研究分担者

大橋 圭明 (OHASHI, Kadoaki)

岡山大学病院・呼吸器・アレルギー内科・講師

研究者番号： 6 0 7 2 9 1 9 3

久保 寿夫 (KUBO, Toshio)

岡山大学病院・腫瘍センター・助教

研究者番号： 9 0 7 2 6 9 2 8

(4)研究協力者

肥後 寿夫 (HIGO, Hisao)

岡山大学大学院医師薬学総合研究科・大学院生