

平成21年6月8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590895
 研究課題名（和文）
 上皮成長因子受容体遺伝子改変マウスを利用した肺癌化学予防に関する基礎的研究
 研究課題名（英文）
 Chemoprevention of Lung Cancer using Epidermal Growth Factor Receptor Transgenic Mice
 研究代表者
 木浦 勝行（KIURA KATSUYUKI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：10243502

研究成果の概要：

肺癌の粗死亡数は増加しているが、喫煙率低下に伴い年齢調整死亡率は低下傾向にある。肺癌患者の男性30%、女性70%は非喫煙者である。非喫煙者肺癌の病因探求およびその予防の研究目的で、上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子改変マウスを作製し、非喫煙関連肺癌マウスモデルを樹立した。ヒトEGFR遺伝子改変マウスは5-6週で多発性の異型腺腫様過形成、肺腺癌が出現し、30週前後で腫瘍死する。これらの肺発癌を gefitinib が効果的に予防することを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌，腺癌，非喫煙者，化学予防，遺伝子改変マウス，上皮成長因子受容体，ゲフィチニブ，バンデタニブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性癌の代表ー肺癌ー

肺癌は日本を含む先進国で癌死亡の第一位であり、罹患率と死亡率が極めて近接した難治性癌の代表である。申請者らは20年以上に渡り、一貫としてその基礎的な研究とともに早

期発見、診断、治療に携わってきた。胸部CT検診による早期発見、局所進行癌に対する放射線化学療法、分子標的薬の出現などにより、難治性肺癌の根治へ向けて一縷の光が差しつつある状況にあるが、肺癌の約50%を占める放射線照射不能進行癌・遠隔転移を有する肺

癌では未だに“治癒”を望むことはほぼ絶望的な状況にある。

2) 診断・治療から予防へ

この難治性の肺癌に対して、費用・利益比から考えても今後の研究は診断・治療からその力点を予防へとシフトさせていくことは理にかなっている。申請者らは、呼吸器内科医としてアプローチのしやすい肺癌治療後の二次発癌の研究に重点を置いた研究を進めてきた（既に申請者らは放射線化学療法後の長期生存者の中に多数の二次癌の発生を報告している [Takigawa et al. *Br J Cancer* 95(9):1142-4, 2006]）。

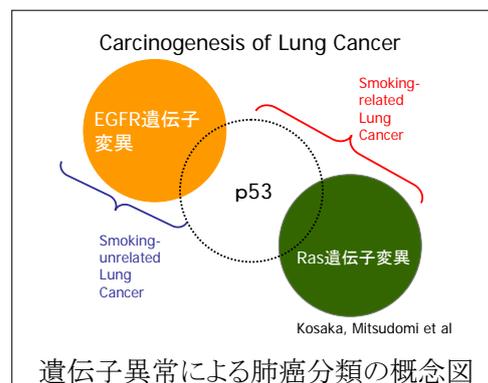
A/J マウスを使用し肺癌治療薬である Cisplatin で肺に発癌させる二次発癌の系を樹立し、緑茶成分に含まれる (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG), 米国では臨床試験の行われている Cyclooxygenase (Cox)-2 阻害薬などが部分的な化学予防効果があることを明らかにし、更に irinotecan, 放射線などによる二次発癌の系も樹立している（未発表データ）。二次発癌に対する化学予防の研究は国内・国外を通じてない。

同時に肺の発癌化学予防実験としてタバコの煙に含まれるタバコ特異的ニトサミン (NNK) による A/J マウスでの肺における発癌（確立された一次発癌モデル）を申請者らも確認している。この系を利用し分子標的薬（上皮成長因子受容体 [EGFR] チロシンキナーゼ阻害薬 [TKI]: ゲフィチニブ [米国癌学会 2003, #LB25], 血管内皮増殖因子受容体 [VEGFR] チロシンキナーゼ阻害薬: ZD6474 [日本癌学会 2005, #0-307], プロテインキナーゼ C 阻害薬など [未発表データ]) を利用して多くの化学予防の実験を行ってきた。ただ、NNK による A/J マウスの肺における発癌は ras p21 の codon12 における A to T transition による点

突然変異によって ras の活性化が惹起され発癌が誘導されると考えられ、上記の分子標的薬ではある程度の化学予防効果は認めても十分な化学予防効果を得ることができなかった。また、申請者らは RAS のシグナルが入ったとき、たとえ変異 EGFR からの強いシグナルが EGFR-TKI によって完全に遮断されても、細胞の増殖が抑制されないことを明らかにしている (Uchida et al. *Cancer Science* 98(3):357-363, 2007)。

(3) 喫煙の関与しない肺癌に対する化学予防の研究

右図に示すごとく、Kosaka らにより肺癌の分類に喫煙が強く関与した肺癌 (RAS, p 53), 喫煙があまり関与しない肺癌 (EGFR 変異, p 53) の概念が提唱された。白血病の WHO 分類では既に遺伝子異常による分類が行われているように、肺癌でも遺伝子異常による分類が



行われるものと推定される。

NNK による A/J マウスの肺における発癌は前者と考えられ、申請者らを含めて多数の報告がある。しかしながら、臨床で肺癌の約 30% を占める喫煙の関与しない肺癌に対する化学予防の研究はこれまで全く報告されていない。また、国立がんセンターの北橋らは A/J マウスでは NNK やウレタンなどの変異原性物質は ras の遺伝子変異を起こすが EGFR の遺伝子変異は起さないことを証明している (日本癌学会 2006, P-36)。従って、現時点では NNK やウレタンなどの変異原性物質を用いて A/J マウ

スにEGFRの遺伝子変異を起こし発癌させることは不可能と考えられる。上記の経過から、申請者らは広島大学の高田穰教授らとの共同研究でEGFR遺伝子改変マウスを作製し、変異EGFR遺伝子による発癌、すなわち喫煙が関与しない発癌に対する化学予防の研究を着想した。

(4) EGFR 遺伝子改変マウス樹立

変異EGFR遺伝子として、活性化遺伝子として明らかなヒトの exon 19 の in-frame deletion と exon 21 の点突然変異（マウスは相当する部位）を選択した。変異EGFR遺伝子を肺組織（II型肺胞上皮）にだけ発現させるために、発現ベクター3.7SPC/SV40 (Dr. Whitsett: Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH から供与) を使用した。マウスEgfr遺伝子変異 (mouse Egfr delE748-A752, mouse EGFR L860R), ヒトEGFR遺伝子変異 (human delE746-A750, human L858R) が導入されたが, mouse Egfr L860R は早期に腫瘍死し安定した系は得られなかったが, mouse Egfr delE748-A752, human L858R を導入したマウスは安定な系を樹立しつつある。これらの遺伝子改変マウスを使用し, 化学発癌予防物質 (EGCG, Cox-2 阻害薬), 分子標的薬 (ゲフィチニブ, ZD6474) などを利用した肺発癌の化学予防の研究は国内・国外を通じてない。

EGFR 遺伝子改変マウス自体は米国の二つのグループ (ハーバード大学, メモリアルスローンケタリング癌研究所) により, RAS 遺伝子改変マウス, p53 ノックアウトマウスと異なりEGFR 遺伝子改変単独で肺に発癌することが2006年3月と6月に相次いで報告された。これらは「どうして喫煙の関与しない肺癌が起こるか?」という本質的な命題に対するアプローチであり, 米国のトップラボも精力的に研究を推し進めている。以前に発表された ras

遺伝子改変マウス, p53 ノックアウトマウスは単独では肺に腫瘍を形成しないし, 腫瘍死も少ない。これらの遺伝子改変マウスに腫瘍を形成させるために NNK などの変異原性物質の投与が必要である。しかしながら, EGFR 遺伝子改変マウスでは単独の遺伝子変異だけで, 肺に発癌を起こす。これは非常に注目すべき結果と考えられる。申請者らも異なるプロモーターを使用し, 異なる変異EGFR 遺伝子の導入により同様の結果を確認していた。

彼らの研究との相違点は, 両グループともにマウス肺に変異EGFR 遺伝子を発現させるためのプロモーターとして Clara cell secretory protein (CCSP) を使用しており, 申請者らの SPC プロモーターと異なる。米国のグループはヒト変異EGFR 遺伝子のみを導入しているが, 申請者らはヒト変異EGFR 遺伝子のみならず対応するマウス変異EGFR 遺伝子を導入したマウスを保有している。これはマウスのEGFR 遺伝子でありマウス内でのより生理的なシグナル解析を可能とする。また最も重要な研究の相違点は彼らが発癌阻止については触れていないことである。従って, 本研究は喫煙の関与しない発癌に対する初めての化学予防の研究であり, 高い priority が保持されている。

2. 研究の目的

- (1) EGFR 遺伝子改変マウスの樹立と解析を行う。遺伝子改変マウスが肺の腺癌で腫瘍死すること確認し, 発癌に至る過程の免疫組織学および分子生物学的検討を行う。
- (2) EGFR 遺伝子改変マウスで分子標的薬EGFR-TKI であるゲフィチニブ, VEGFR, EGFR, RET の multi-targeted TKI 阻害作用を持つ ZD6474 の化学予防効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)EGFR 遺伝子改変マウスの作製

変異 EGFR 遺伝子をマウスの肺組織に特異的に発現させるためにマウス肺組織発現ベクター-3.7SPC/SV40 (Dr. Whitsett: Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH から供与) を用いた。マウスおよびヒト mRNA から逆転写により, cDNA を作製した後, PCR 法により mouse EGFR, human EGFR を得た。Site-direct mutagenesis 法によりマウス変異 EGFR 遺伝子 (mouse Egfr de1E748-A752), ヒト変異 EGFR 遺伝子 (human L858R) を作製した。

(2) 作製されたEGFR遺伝子改変マウスを使用し、gefitinib, vandetanibの化学予防の実験を行う。

4. 研究成果

1) SP-C プロモーターにより Exon19 の欠失 de1E748-A752 を肺のみに過剰発現させたマウス Egfr 遺伝子改変マウスを樹立した (国内特許, 2007 年米国癌学会で発表, Cancer Science 論文①)。この遺伝子改変マウスは 5-6 週で多発性の異型腺腫様過形成 Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)、肺腺癌が出現し、14 週前後で腫瘍死する。肺のみで欠失 EGFR の過剰発現が認められた。肺の腺癌組織では pEGFR、PCNA、TTF-1 の過剰発現が認められた。先行研究が米国ダナファーバー癌研究所、メモリアルスロンケタリング癌研究所から発表されている。二つの遺伝子改変マウスはともにテトラサイクリンのスイッチモデルを使用しており、腫瘍を惹起するためにはテトラサイクリンを投与し続けなければならないため、テトラサイクリン自体の抗腫瘍効果、テトラサイクリンと化学予防薬との相互反応の問題があり本研究には不向きである。

2) 更に SP-C プロモーターによりヒト L858R

点突然変異遺伝子改変マウスを作製した。この遺伝子改変マウスも 5-6 週で多発性の異型腺腫様過形成、肺腺癌が出現し (図 2 D 参照)、30 週前後で腫瘍死する。EGFR 遺伝子改変マウスの 6 週令からゲフィチニブ (5 mg/kg/5 日/週) を経口投与すると 30 週以上にわたり腫瘍の発生を完全に抑制した (次頁図 3 A B 参照 2008 年米国癌学会ミニシンポジウムで発表、同時に若手奨励賞を受賞しており、現在 Cancer Res で Revise 中)。また gefitinib は体重にも影響を与えなかった。

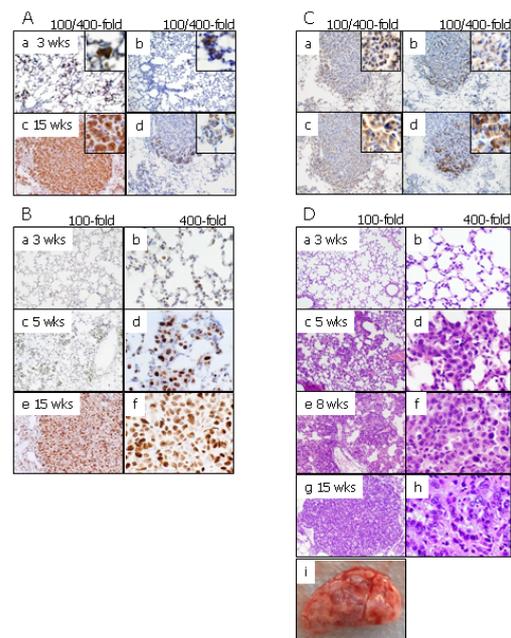


Figure 2 Ohashi et al.

Figure 2 (Cancer Res Revise 中, 未発表データ) A) EGFR staining of lung tissue from 3-week-old transgenic (a x100/x400) and 15-week-old transgenic mice (c x100/x400). Phosphorylated EGFR staining of lung tissue from 3-week-old transgenic (b x100/x400) and 15-week-old transgenic mice (d x100/x400). The increase in EGFR expression and activation of EGFR in the transgenic versus wild-type mice was confirmed before and after carcinogenesis. B) PCNA staining of lung tissue taken at 3 (a, x100; b, x400), 5 (c, x100; d, x400),

and 15 weeks of age (e, x100; f, x400) from the transgenic mice. Pneumocyte proliferation was accelerated at approximately 5 weeks of age. C) Immunohistochemical staining was used to detect Akt(a), pAkt(b) MAPK(c), and pMAPK(d) in lung tumors. Akt and MAPK signaling were activated in lung tumor of the transgenic mice at 15 weeks of age. D) Lung cancer in the transgenic mice. A) Histological examination of lung tissue from the transgenic mice with hematoxylin and eosin (HE) staining revealed: a normal respiratory unit at 2 weeks of age (a, x100; b, x400); atypical cuboidal cells replacing the lining of alveoli, with rare mitotic figures, at 5 weeks of age (c, x100; d, x400); small tumor foci in the lungs that developed into multifocal tumors lacking stromal, vascular, or pleural invasion (e, x100); an increase in the number of atypical cells with scattered, mitotic figures and alveolar collapse without fibrotic foci at 8 weeks of age (f, x400); and multicentric and multiple invasive foci in the lung (g, x100) with dense proliferation of cancer cells and fibrotic foci due to alveolar collapse at 15 weeks of age (g, x100; h, x400). Macroscopically, multiple tumors were seen on the surface of both lungs at 15 weeks of age (i).

3) ヒト L858R 遺伝子改変マウスは早期に VEGFR のリン酸化認められることを発見した。ZD6474 は EGFR のチロシンキナーゼと VEGFR のチロシンキナーゼを二つの分子を同時に阻害する低分子化合物である。ZD6474 (5 mg/kg/5日/週) を遺伝子改変マウスに 6 週

令から経口投与すると同様に腫瘍の発生を完全に抑制した (2009 年 4 月米国癌学会ミニシンポジウムで発表)。

上記、EGFR の関与した発癌に予想通り、ゲフィチニブ、ZD6474 は腫瘍の発生を完全に抑制し、肺腺癌の分子生物学的発生機序に従いその分子標的化学予防を行うという新しい概念を提唱し、関連する特許も申請した。

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)

① Ichihara E, Ohashi K, Takigawa N, Osawa M, Ogino A, Tanimoto M, Kiura K: Effects of vandetanib on lung adenocarcinoma cells emerging an acquired EGFR T790M mutation *in vivo* Cancer Res 2009 (in press) 査読有

② Kishino D, Kiura K, Takigawa N, Katayama H, Kuyama S, Sato K, Okada T, Ohashi K, Tanimoto M: Effect of gefitinib on N-nitrosamine-4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced lung tumorigenesis in A/J mice. Lung Cancer. 2009 (in press) 査読有

③ Hosokawa S, Toyooka S, Fujiwara Y, Tokumo M, Soh J, Takigawa N, Hotta K, Yoshino T, Date H, Tanimoto M, Kiura K: Comprehensive analysis of EGFR signaling pathways in Japanese patients with non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2009 (in press) 査読有

④ Ohashi K, Rai K, Fujiwara Y, Osawa M, Hirano S, Takata K, Kondo E, Yoshino T, Takata M, Tanimoto M, Kiura K. Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated EGFR driven by the SP-C promoter. Cancer Sci 99:1747-1753, 2008 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Kubo T, Ohashi K, Osawa M, Takeda H, Ichihara E, Fujii M, Kashihara H, Takigawa N, Tanimoto, Kiura K. Chemopreventive effect of vandetanib on tumorigenesis in a mouse model of non-smoking related lung cancer AACR Annual Meeting 2009 (April 18-22, 2009, Colorado Convention Center, Denver, CO) Abstract#4783 Minisymposium
“Biological Mechanisms and Molecular Markers of Prevention” (米国癌学会総会, ミニシンポジウム)
- ② Ohashi K, Kiura K, Osawa M, Takeda H, Kubo T, Ichihara E, Takigawa N, Hirano S, Tanimoto M, Takata M: Chemopreventive effect of gefitinib on tumorigenesis in smoking unrelated lung cancer mouse model AACR Annual Meeting 2008 (April 12-16, 2008, San Diego, CA) Abstract # 4186 Minisymposium (米国癌学会総会, ミニシンポジウム)

[図書] (計1件)

- ① Kiura K, Takigawa N, Segawa Y: Advanced Non-Small Cell Lung Carcinoma Acquired Resistance to Gefitinib (Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis : General Methods and Overviews, Lung Carcinoma and Prostate Carcinoma (Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis) (Vol. 2), Hayat, M. A. (EDT), 307-317, Springer, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木浦 勝行 (KIURA KATSUYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准

教授

研究者番号 : 10243502

(2) 研究分担者

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 60325107

(3) 連携研究者

高田 穰 (TAKATA MINORU)

京都大学・教授

研究者番号 : 30281728

吉野 正 (YOSHINO TADASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 70183704

(4) 研究協力者

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生12名 (大橋圭明, 頼冠明, 市原英基, 高田三郎, 大澤昌宏, 武田洋昌, 藤井昌学, 久保寿夫, 柏原宏美, 原田大二郎, 越智宣昭, 八杉昌幸)