

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591654

研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫における分子標的としての腫瘍関連遺伝子の解析

研究課題名（英文） Analysis of cancer related gene as molecular target in malignant pleural mesothelioma.

研究代表者

浦本 秀隆（URAMOTO HIDETAKA）

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：90389445

研究成果の概要：

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露をその主な原因とする職業性・環境性疾患であり、今後、罹患数、死亡者数ともに増加が予想されが、極めて予後不良である。本研究において接着因子、増殖因子変異を解析として検討をしたうえで、手術症例から、2例の細胞株の樹立に成功した。また、腫瘍局所の液性免疫応答を解析し、4種類の抗原遺伝子を同定し、現時点で解析可能な2抗原に対する血清抗体価の腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、分子標的、主学的治療

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト曝露をその主な誘因とする職業性疾患であり、近年、罹患数、死亡者数ともに急激に増加し、2004年には、1995年に比較し約2倍の死亡数となっている。アスベスト曝露は、職業的 direct 曝露のみでなく、その家族内曝露や工場近隣住民への曝露でも発症しており、大きな社会問題となってきた。悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露から30～40年経て発症することから今後さらに増加することが予想されているが、早期診断が困難であり、予後も極めて

不良である。根治療法として胸膜肺全摘除術が挙げられるが手術のみで根治できる症例は稀で再発率が高く、化学療法、放射線療法いずれも単独では局所制御効果、延命効果ともに、ほとんど効果はなく現在のところ確立した標準治療はない。近年、種々の悪性腫瘍の治療を考える上で、その分子標的を明らかにして、それに対する分子標的薬を創成することは、治療成績向上に極めて重要である。しかしながら、悪性胸膜中皮腫の発生に関する分子機構は全くと言っていいほど解明されていない。その増殖の特徴は、びまん性の発

症と進展であり、多くの固形癌とは異なる発育形態である。このような発育に関係すると考えられる成長因子および受容体遺伝子 (EGFR, c-kit, HER2/neu, PDGFR, FGFR)、細胞接着因子 (cadherin, catenin, ICAM, VCAM, 糖鎖関連分子) や、また細胞周期関連遺伝子を総合的に解析し、増殖のシグナル伝達機構への役割を解明することは極めて重要であり、治療の標的を考える上で、臨床的にも重要な要素と考える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性胸膜中皮腫について、細胞接着や増殖に関わる因子を総合的に解析し、さらにシグナル経路の解明に焦点を当て、悪性胸膜中皮腫における分子標的の診断及び治療の臨床応用に向けての基礎とする。

国外において in vitro の data ではチロシンキナーゼ阻害剤が悪性胸膜中皮腫の細胞株の浸潤能を抑制することや、セリン/チロシンキナーゼ阻害剤と doxorubicin との併用の第 I 相試験が終了し、安全性が確認されている。しかしながら、gefitinib (チロシンキナーゼ阻害剤) を選別されていない集団を対象に用いた場合、その効果は低い。一方、肺癌において、EGFR 遺伝子のチロシンキナーゼ領域の変異は、分子標的薬 Gefitinib などのチロシンキナーゼ阻害剤の薬剤感受性と耐性に密接に関与するものとして注目されている。つまり、特定の領域の遺伝子変異を有する症例の Gefitinib 奏効率は 90% 以上に達する。したがって肺癌において個別化治療を行なう上で、EGFR 遺伝子変異はチロシンキナーゼ阻害剤の投与対象の選択基準となり、肺癌の個別化治療が確立しつつあることを我々の施設でも報告してきた (Uramoto, et al. Epidermal growth factor receptor mutations are associated with gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer in Japanese. Lung Cancer, 51: 71-77, 2006, Sugio, et al. Mutations within the tyrosine kinase domain of EGFR gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking. Br J Cancer, 94: 896-903, 2006)。しかしながら臨床検体を用いた悪性胸膜中皮腫の効果予測因子に関する研究は未だ国内外において報告はない。また、国内外において悪性胸膜中皮腫は社会問題化しているにも関わらず、腫瘍増殖や進展に関与する細胞接着因子や細胞周期関連因子の研究は乏しく、細胞増殖因子関連の遺伝子シグナル経路とした標的の診断及び治療に関する研究を目的とした。

## 3. 研究の方法

研究計画

### (1) 細胞接着因子の解析:

- ① E-cadherin,  $\alpha$  -,  $\beta$  -,  $\gamma$  -catenin, ICAM, VCAM, 糖鎖関連分子の蛋白の発現を、各々の特異的抗体を用いて免疫

組織化学的に検討する

- ② 細胞周期関連遺伝子発現異常の解析: 細胞周期遺伝子 CDK インヒビターである INK4 ファミリー (p15, p16, p18, p19)、CIP/KIP ファミリー (p21, p27, p57) の mRNA 発現異常の有無を、RT-PCR およびリアルタイム DNA 増幅システムを用いて定量的に測定する。それらを誘導する p53 の発現の解析を同様に行ない、細胞周期関連遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子発現の総合的な評価を行なう。
- ③ 蛋白発現異常の解析: 上記遺伝子の蛋白発現を、各々の特異的抗体を用いて免疫組織化学的に解析する。

### (2) 成長因子および受容体関連遺伝子の構造異常、発現異常の解析

悪性中皮腫の切除検体や細胞株から DNA および mRNA を抽出し、遺伝子異常の有無を PCR, RT-PCR を基本にして解析し、シグナル伝達系の遺伝子発現を解析する。EGFR 遺伝子解析: チロシンキナーゼ領域の遺伝子異常の有無あるいは遺伝子増幅の有無を解析し、さらにシグナル伝達系の Ras-ERK 系, PI-3K-Akt, STAT 系の遺伝子発現を解析する。また、免疫組織化学的にシグナル伝達経路の各遺伝子の蛋白発現を検討する。

(3) 細胞株樹立: 手術症例 8 検体から DNase, collagenase, hyaluronidase 処理の後、培養腫瘍細胞株の樹立を試みる。

### (4) 悪性胸膜中皮腫内浸潤 B 細胞由来抗体が認識する抗原の同定と診断の応用

#### ① 悪性胸膜中皮腫に浸潤する B 細胞の産生する抗体の採取

悪性胸膜中皮腫における B 細胞の存在を確認するために、AntiCD20 抗体にて組織の免疫染色を行った。また手術で切除した新鮮な腫瘍組織を免疫不全 (SCID) マウスの側腹部に移植し、2 週毎に眼窩後静脈より血清を採取した。マウス血清中のヒト型 IgG を ELISA 法にて測定し、ヒト型 IgG 濃度の推移を確認した。

#### ② 悪性胸膜中皮腫の cDNA ライブラリーの作成

当科で樹立した悪性胸膜中皮腫の細胞株より mRNA を抽出し、cDNA に変換した。この cDNA を  $\lambda$ ZAP phage vector に組み込み、cDNA ライブラリーを作成した。

#### ③ 腫瘍内浸潤 B 細胞の産生する抗体の認識する抗原の同定

腫瘍内浸潤 B 細胞由来のヒト型 IgG は、これまでの肺癌組織内浸潤 B 細胞の解析結果から癌特異性が高いと考えられる。悪性中皮腫に浸潤する B 細胞由来のヒト型 IgG 抗体を含む SCID マウスの血清 (400 倍希釈) をプローブとして、SEREX 法 (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning) にて、スクリーニングを行い、悪性胸膜中皮腫に関連する抗原の同定を

行った。

④ 悪性胸膜中皮腫の血清学的診断の有用性の検討

同定した抗原に対する抗体が、他の悪性胸膜中皮腫症例においても検出できるか、phage plaque assay で解析した。また、この抗原に対する抗体価をELISA法にて定量的に検出した。抗体価の術前、術後の推移を評価し、腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。

4. 研究成果

- (1) 接着因子解析：胸膜中皮腫 10 症例（男性 9 例、女性 1 例、平均年齢 65.2 才、Epithelioid 6 例、Sarcomatoid 3 例、Biphasic 1 例）において細胞接着因子（E-Cadherin、 $\alpha$ -Catenin、 $\beta$ -Catenin、 $\gamma$ -Catenin）と p53 の蛋白発現を解析し、発現低下を E-Cadherin、 $\alpha$ -Catenin、 $\beta$ -Catenin、 $\gamma$ -Catenin それぞれ 40%、100%、30%、90%の症例に認めた。p53 発現異常は 1 例のみであった。
- (2) 増殖因子変異解析：上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor: EGFR）遺伝子変異、K-ras 遺伝子 codon12 変異の有無は、悪性胸膜中皮腫 10 症例において認められなかった。
- (3) 細胞株樹立：悪性胸膜中皮腫の手術症例から、2 例の細胞株の樹立に成功した。今後、樹立した細胞株を用いて、細胞接着因子の発現減弱の分子機構および細胞外気質の解析を in vitro, in vivo で行なう予定である。
- (4) 免疫学的解析：中皮腫における腫瘍局所の液性免疫応答を解析し、4 種類の抗原遺伝子を同定し、これらの遺伝子の発現解析および胸膜中皮腫症例での血清抗体価の解析を行った。腫瘍浸潤 B 細胞由来の抗体が認識する 4 種類の腫瘍抗原を同定した。4 つの抗原のうち、現時点で解析可能な 2 抗原に対する血清抗体価は、胸膜中皮腫患者において有意に高く、腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。
- (5) 悪性胸膜中皮腫の SEREX 法にて同定した二つの抗原に対する血清抗体価を Phage plaque assay にて測定したところ、健常者に比べ、中皮腫患者で高い抗体価を示した。より定量的に評価するために、この 2 つの遺伝子のコードする蛋白から 20mer の抗原性の高いペプチドを予測し、それぞれ 3 種類のペプチドを作製した。これらのペプチドをコーティングした ELISA での抗体価の測定を試みた。3 種類のペプチドのうち、1 つは Phage plaque assay とよく相関しており、このペプチドを用いた ELISA による解析で、中皮腫患者、健常者、肺癌患者（石綿暴露歴の有無）、乳癌患者にて抗体価の測定を行った。健常者の平均と標準偏差で、カットオフ値を決め解析したところ、二つの抗原に対する抗体価は中皮腫患者でそれぞれ 18 例中 10 例 (55.6%)、16 例 (88.9%) で陽性であり、肺癌、乳癌患者では陽性を示す症例は認めなかった。悪性

胸膜中皮腫完全切除後の抗体価の推移について 2 症例にて検討したところ、術後抗体価の低下と再発時の抗体価の再上昇を認めたことから、治療効果判定のマーカーと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 16 件）

全て査読有り

- ① Shigematsu, Y. Hanagiri, H. Kuroda, K. Baba, T. Mizukami, M. Ichiki, Y. Yasuda, M. Takenoyama, M. Sugio, K. Yasumoto, K.: Malignant mesothelioma-associated antigens recognized by tumor-infiltrating B cells and the clinical significance of the antibody titers. Cancer Science 2009 In press
- ② Nagata Y, Hanagiri T. Mizukami M, Kuroda K, Shigematsu Y, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Sugio K. Nagashima A, Yasumoto K.: Clinical significance of HLA class I alleles on postoperative prognosis of lung cancer patients in Japan. Lung Cancer. 2009 In press
- ③ Sugio K. Uramoto H. Onitsuka T, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Yasuda M, Takenoyama M, Oyama T, Hanagiri T. Yasumoto K: Prospective phase II study of gefitinib in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. Lung Cancer. 2009 In press
- ④ Nose, N. Sugio, K. Oyama, T. Nozoe, T. Uramoto, H. Iwata, T. Onitsuka, T. Yasumoto, K.: Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung. J Clin Oncol 27(3):411 - 417. 2009
- ⑤ 杉尾 賢二・浦本 秀隆・竹之山 光広・花桐 武志・安元 公正: 肺癌における分子標的治療成績と個別化治療への展開. 胸部外科 61(1):37 - 42. 2008
- ⑥ Hanagiri, T. Sugio, K. Uramoto, H. Sugaya, M. Ono, K. So, T. Ichiki, Y. Nakata, S. Nozoe, T. Osaki, T. Yasumoto, K.: Results of surgical treatment for lung cancer in young adults. Int Surg 93(1):50 - 54. 2008
- ⑦ Hanagiri, T. Sugio, K. Mizukami, M. Ichiki, Y. Sugaya, M. Yasuda, M. Takenoyama, M. Yasumoto, K.: Significance of Smoking as a Postoperative Prognostic Factor in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol 3(10):1127 - 1132. 2008
- ⑧ Uramoto, H. Sugio, K. Yasumoto, K.: Prediction of effectiveness of EGFR tyrosine kinase inhibitors for the

- patients with by EGFR mutations. Gan To Kagaku Ryoho 34(4):538 - 543. 2007
- ⑨ Oyama, T. · Sugio, K. · Uramoto, H. · Iwata, T. · Onitsuka, T. · Isse, T. · Nozoe, T. · Kagawa, N. · Yasumoto, K. · Kawamoto, T.: Increased cytochrom P450 and aryl hydrocarbon receptor in bronchial epithelium of heavy smokers with non-small cell lung carcinoma carries a poor prognosis. Font Biosci 12:4497 - 4503. 2007
- ⑩ Hanagiri, T. · Sugio, K. · Uramoto, H. · So, T. · Ichiki, Y. · Sugaya, M. · Ono, K. · Yasuda, M. · Nozoe, T. · Yasumoto, K.: Gender difference as a prognostic factor in patients undergoing resection of non-small cell lung cancer. Surg Today 37(7):546 - 551. 2007
- ⑪ 小野 憲司 · 杉尾 賢二 · 安田 学 · 菅谷 将一 · 浦本 秀隆 · 花桐 武志 · 安元 公正: 異時性肺癌に対する外科的治療成績. 肺癌 47(3):239 - 244. 2007
- ⑫ Igarashi, T. · Izumi, H. · Uchiumi, T. · Nishio, K. · Arao, T. · Tanabe, M. · Uramoto, H. · Sugio, K. · Yasumoto, K. · Sasaguri, Y. · Wang, KY. · Otsuji, Y. · Kohno, K.: Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. Oncogene 26(33):4749 - 4760. 2007
- ⑬ Uramoto, H. · Uchiumi, T. · Izumi, H. · Kohno, K. · Oyama, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K.: A new mechanism for primary resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma: the role of a novel G796A mutation in exon 20 of EGFR. Anticancer Res 27(4B):2297 - 2304. 2007
- ⑭ Nozoe, T. · Oyama, T. · Mori, E. · Uramoto, H. · Takenoyama, M. · Hanagiri, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K.: Clinicopathologic Significance of an Immunohistochemical Expression of p27 in Scirrhous Carcinoma of the Breast. Breast Cancer 14(3):277 - 280. 2007
- ⑮ Hanagiri, T. · Sugio, K. · Mizukami, M. · Ichiki, Y. · Sugaya, M. · Ono, K. · Yasuda, M. · Nozoe, T. · Takenoyama, M. · Yasumoto, K.: Postoperative prognosis in patients with non-small cell lung cancer according to the method of initial detection. J Thorac Oncol 2(10):907 - 911. 2007
- ⑯ Nozoe, T. · Hanagiri, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K.: Pancreatic endocrine carcinoma presenting with gastric varices derived by left-sided portal hypertension: a case report. Esophagus 4:181 - 183. 2007
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 浦本 秀隆 · 杉尾 賢二 · 馬場 哲郎 · 市来 嘉伸 · 大賀 丈史 · 竹之山 光広 · 花桐 武志 · 安元 公正: 原発性肺癌に

- おけるEGFR遺伝子変異を指標とした分子標的治療:個別化医療への道. 第1回 福岡県医学会総会 福岡. 2009. 1. 25
- ② 花桐 武志 · 重松 義紀 · 黒田 耕志 · 馬場 哲郎 · 市来 嘉伸 · 浦本 秀隆 · 大賀 丈史 · 竹之山 光広 · 杉尾 賢二 · 安元 公正: 腫瘍の免疫逃避機構の解明とその克服. 第21回 日本バイオセラピー学会学術集会総会 東京. 2008. 11. 18-19
- ③ 重松 義紀 · 塩田 広宣 · 黒田 耕志 · 馬場 哲郎 · 永田 好香 · 水上 真紀子 · 市来 嘉伸 · 安田 学 · 竹之山 光広 · 花桐 武志 · 杉尾 賢二 · 安元 公正: 悪性胸膜中皮腫におけるSEREX法による腫瘍抗原の同定と新規腫瘍マーカーとしての可能性. 第49回 日本肺癌学会総会 北九州. 2008. 11. 14-15
- ④ 花桐 武志 · 重松 義紀 · 塩田 広宣 · 黒田 耕志 · 馬場 哲郎 · 永田 好香 · 水上 真紀子 · 市来 嘉伸 · 安田 学 · 大賀 丈史 · 竹之山 光広 · 杉尾 賢二 · 安元 公正: 悪性胸膜中皮腫に関連する新規腫瘍抗原の同定と血清診断への応用. 第26回 産業医科大学学会総会 北九州. 2008. 10. 30
- ⑤ 重松 義紀 · 塩田 広宣 · 黒田 耕志 · 馬場 哲郎 · 永田 好香 · 水上 真紀子 · 市来 嘉伸 · 安田 学 · 竹之山 光広 · 花桐 武志 · 杉尾 賢二 · 安元 公正: 悪性胸膜中皮腫におけるSEREX法による腫瘍抗原の同定と新規腫瘍マーカーとしての可能性. 第61回 日本胸部外科学会定期学術集会 福岡. 2008. 10. 12-15
- ⑥ Yasumoto, K. · Hanagiri, T.: Treatment of Pleural Mesothelioma. アジア・アスベスト・イニシアチブ国際セミナー 北九州. 2008. 10. 1-3
- ⑦ Hanagiri, T. · Baba, T. · Shiota, H. · Kuroda, K. · Shigematsu, Y. · Mizukami, M. · Ichiki, Y. · Yasuda, M. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K.: Usefulness of immortalized T cell transduced T cell receptor gene in identification of a tumour-associated antigen. 2008 World Cancer Congress. Geneva, Switzerland. 2008. 8. 27-31
- ⑧ 塩田 広宣 · 安田 学 · 黒田 耕志 · 重松 義紀 · 馬場 哲郎 · 水上 真紀子 · 市来 嘉伸 · 竹之山 光広 · 花桐 武志 · 杉尾 賢二 · 安元 公正: 悪性胸膜中皮腫における接着分子を介する細胞外基質の意義. 第25回 日本呼吸器外科学会総会 宇都宮. 2008. 5-29-30
- ⑨ 塩田 広宣 · 安田 学 · 黒田 耕志 · 重松 義紀 · 馬場 哲郎 · 永田 好香 · 水上 真紀子 · 市来 嘉伸 · 野添 忠浩 · 竹之山 光広 · 花桐 武志 · 杉尾 賢二 · 安元 公正: 悪性胸膜中皮腫における細胞表面接着分子の解析. 第108回 日本外科学会定期学術集会 長崎. 2008. 5. 15-17
- ⑩ 竹之山 光広 · 黒田 耕志 · 塩田 広宣 · 馬場 哲郎 · 重松 義紀 · 永田 好香 · 水上 真紀子 · 市来 嘉伸 · 安田 学 · 野添

忠浩・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正：悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的細胞性免疫応答の証明. 第108回 日本外科学会定期学術集会 長崎. 2008. 5. 15-17

- ⑪ 竹之山 光広・黒田 耕志・塩田 広宣・馬場 哲郎・重松 義紀・永田 好香・水上 真紀子・市来 嘉伸・安田 学・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正：自己悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的CTLの樹立. 第25回 日本呼吸器外科学会総会 宇都宮. 2008. 5. 29-30
- ⑫ 浦本 秀隆：原発性肺癌における predictive markerとしてのEGFR遺伝子変異. 九州がんフォーラム 福岡. 2008. 2. 8
- ⑬ Uramoto, H.・Uchiumi, T.・Izumi, H.・Kohno, K.・Sugio, K.・Yasumoto, K.：Non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with mutations in exon20 of EGFR show acquired and primary resistance to gefitinib despite the existence of sensitive mutation. 第11回 がん分子標的治療研究会総会. 大阪. 2007. 7. 5-6
- ⑭ Uramoto, H.・Sugio, K.・Oyama, T.・Iwata, T.・Onitsuka, T.・Yasuda, M.・Sugaya, M.・Takenoyama, M.・Nozoe, T.・Hanagiri, T.・Yasumoto, K.：A secondary T790M mutation and a novel G796A mutation in exon20 of the EGFR gene in patients with non-small cell lung cancer who show resistance to gefitinib. 43rd ASCO. Chicago, USA 2007. 6. 1-5

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浦本 秀隆 (URAMOTO HIDETAKA)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：9 0 3 8 9 4 4 5

### (2) 研究分担者

杉尾 賢二 (SUGIO KENJI)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：7 0 2 3 5 9 2 7  
花桐 武志 (HANAGIRI TAKESHI)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号：3 0 2 9 9 6 1 4

### (3) 連携研究者

野添 忠浩 (NOZOE TADAHIRO)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：9 0 3 2 5 4 5 7  
岩田 輝男 (IWATA TERUO)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：0 0 4 3 5 1 2 4