

平成23年3月31日現在

期間番号：37116  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791339  
 研究課題名（和文） 肺癌に発現するエストロゲン受容体のEGFRとの機能的関連と分子標的の可能性  
 研究課題名（英文） Analysis of functional association between estrogen receptor and EGFR in lung cancer and possibility of therapeutic target  
 研究代表者  
 能勢 直弘（NOSE NAOHIRO）  
 産業医科大学・医学部・非常勤医師  
 研究者番号：50461554

研究成果の概要（和文）：本研究において ER beta 強発現症例では EGFR 遺伝子変異症例が多く、EGFR-TKI が奏功する症例が多く、また EGFR 遺伝子変異を有する群において ER beta 強発現は弱発現群に比べ無増悪生存が有意に長かった。このことは ER beta 強発現が EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌において EGFR-TKI の奏功を予測するバイオマーカーのひとつになり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A strong expression of ER beta predicts a good clinical outcome for patients with adenocarcinoma of the lung after treatment with EGFR-TKI. This suggests that the expression status of ER beta can be a candidate surrogate marker for EGFR-TKI treatment of patients with adenocarcinoma of the lung.

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：EGFR、肺癌、肺腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌は、1998年以降悪性腫瘍の死亡原因の第1位を占め、切除不能肺癌に至っては従来の白金製剤に加えタキサンなどの新規抗癌剤の登場で治療成績は若干向上したものの、平均生存期間は診断後10～14ヶ月程度である。したがって肺癌細胞の増殖進展に普遍的に深く関わる分子を同定し、その分子を target とする分子標的薬の開

発が急務である。

EGFRは膜貫通型受容体で肺癌細胞表面に多く発現し細胞分裂、増殖、遊走、浸潤に深く関与する。野生型EGFRでは上皮成長因子などをリガンドとして、リガンド依存性に細胞増殖シグナルが亢進するが、チロシンキナーゼ領域をコードする遺伝子に活性型変異を持つものでは細胞増殖シグナルがリガンド非依存性に常に亢進しており、肺

癌細胞の生存と増殖を維持している。そのため同部位を標的とした分子標的薬チロシンキナーゼ阻害剤は変異型 EGFR 肺癌細胞の増殖進展を劇的に抑制する。しかし EGFR 遺伝子変異がある症例が一部の集団に限られること、長期間の投与で獲得耐性がほぼ必発であること、急性肺障害を中心とした重篤な有害事象が 3～6% の投与症例に生じるなどの問題がある。したがって肺癌の増殖に深く関与する、より普遍的な標的分子の発見とその分子を標的とした分子標的治療薬の確立は現在の EGFR-TKI を中心とした肺癌の分子標的治療の治療成績を向上させると考えられている。また一方では、疫学的に喫煙が関与しない肺腺癌が女性に多く発生することから、肺腺癌の増殖進展には女性特有の因子が関与することが予想されている。そこで我々は乳癌細胞に発現し、その増殖進展に重要な役割を果たす ER が肺癌細胞株にも発現している (Stable et al. Cancer Res 2002) ことに着目し、臨床検体 447 例を用いて肺癌における ER の発現状況を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子と ER の発現状況との関連を解析した。その結果、①ER の 2 つのサブタイプ、ER alpha、ER beta 両者ともに肺癌臨床検体にも発現し、50% の症例で ER alpha が、47% の症例で ER beta が強発現していること、②ER beta の強発現例は野生型 EGFR 症例に比べて変異型 EGFR 症例に有意に多いこと、③EGFR 変異型肺腺癌では ER beta の強発現は予後良好の因子であるが、野生型 EGFR 肺腺癌ではその傾向は認められないことを解明した。(Nose N, et al. Association between estrogen receptor beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of patients with

adenocarcinoma of the lung. Journal of Clinical Oncology, in press.) これらの結果は ER が肺腺癌における EGFR の活性型変異と機能に何らかの機序で関連し、変異型 EGFR を介して間接的に、あるいは直接的に肺癌の増殖発展に関与していることを予想させる。つまり、ER beta が EGFR とともに新たな肺癌の分子標的になる可能性を示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、野生型 EGFR 肺癌、変異型 EGFR 肺癌それぞれにおける ER の機能とその相違を解明し、肺癌における ER と EGFR の機能的関連、および EGFR 変異が ER に及ぼす機能的影響を明らかにして、肺癌治療における分子標的としての ER の意義を確立することである。

## 3. 研究の方法 研究計画

(1) EGFR-TKI 投与歴を有する臨床検体を用いた解析:

当科において EGFR-TKI による治療が行われた肺腺癌のうち、パラフィン検体の入手が可能であった 43 症例を対象とした。ER  $\beta$  の発現はパラフィン検体の免疫組織学的染色を行い Allred score を用いて 8 段階で評価。score 5 以上を強発現、4 以下を弱発現症例とした。EGFR 遺伝子変異は PCR 法により評価した。

(2) In vitro の解析:

感受性、耐性 EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞株と野生型の肺癌細胞株の ER beta のタンパク発現と mRNA 発現を調べる。次に ER beta を RNAi にて knock down し、細胞増殖能の変化を検証する。また knock down した状態で gefitinib による cell inhibition assay を行い、IC50 が上昇するか検討する。さらに ER

betaのknock downにて影響をうけた遺伝子群を調査し、どのpathwayに依存しているか検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ERβ強発現が21例、弱発現が22例、EGFR遺伝子変異は30(69.8%)例に認めた。ERβ強発現症例ではEGFR遺伝子変異を弱発現群に比べ有意に多く認め(85.7%、54.5%、 $p=0.045$ )、奏功例が多く(奏功率;強発現:66.7%、弱発現22.7%、 $p<0.01$ )、無増悪生存は有意に長かった( $p=0.001$ )。EGFR遺伝子変異を有する群においてERβ強発現は弱発現群に比べ奏功例が多い傾向を示し(奏功率;強発現:77.8%、弱発現41.7%、 $p=0.063$ )、無増悪生存も有意に長かった( $p=0.012$ )。ERβ強発現症例ではEGFR遺伝子変異症例が多く、EGFR-TKIが奏功する症例が多かった。さらにEGFR遺伝子変異を有する群においてERβ強発現は弱発現群に比べ無増悪生存が有意に長かった。このことはERβ強発現がEGFR遺伝子変異を有する肺腺癌においてEGFR-TKIの奏功を予測するバイオマーカーのひとつになり得ることを示唆する。

(2) まず我々は9つの肺癌細胞株をスクリーニングし、4種の感受性、耐性EGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞株と野生型の肺癌細胞株(The B901L: exon19 delE746-A750, L804L cell lines, wild type, G603L: exon 21 L858R, and H1975 cell: T790M mutation of EGFR)を選んだ。全ての細胞株はER betaの発現が陽性であった。これらの細胞株はE2添加にて増殖活性に相違はなく、ER betaのknockdownにて有意な差は認めなかった。ER betaのknockdownによるgefitinibによるcell inhibition assayにおいても同様の傾向であり、knockdownにてcell signalingやapoptosis pathway(cyclin D1, cyclin D3,

CDK4, CDK6, p15INK4B, p16INK4A, p21Waf1, p27 kipl, cleaved caspase 9, caspase 3, cleaved caspase 3, caspase 7, cleaved caspase 7, PARP, and cleaved PARP)の発現に差を認めなかった。このことは少なくともin vitroではEGFR遺伝子変異とER beta発現に直接的な関係は有さず、さらなる研究が必要と思われる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Nose N, Uramoto H, Iwata T, Hanagiri T, Yasumoto K: Expression of estrogen receptor beta predicts a clinical response and longer progression-free survival after treatment with EGFR-TKI for adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer in press* (査読有)
- ② 近石泰弘, 能勢直弘, 市来嘉伸, 永島 明, 安元公正: 部分肺静脈還流異常を合併した肺癌の一切除例. *日本呼吸器外科学会雑誌* 24(4):704-709. 2010 (査読有)
- ③ Onitsuka T, Uramoto H, Nose N. Takenoyama M, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K: Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status. *Lung Cancer* 68(2):198-203. 2010 (査読有)
- ④ So T, Inoue M, Chikaishi Y, Nose N, Sugio K, Yasumoto K: Gefitinib and a ventriculo-peritoneal shunt to manage carcinomatous meningitis from non-small-cell lung cancer: report of two cases. *Surg Today* 39: 598-602. 2009 (査読有)
- ⑤ 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 (査読有)

研究者番号：50461554

〔学会発表〕(計5件)

- ① 市来嘉伸, 近石泰弘, 能勢直弘, 永島明, 安元公正:肺尖部胸壁浸潤肺癌手術症例の検討. 第27回日本呼吸器外科学会総会 仙台. 2010年11月3-4日
- ② 関村 敦, 吉松 隆, 宗 哲哉, 能勢直弘, 小山倫浩, 安元公正:胸骨正中経路左肺全摘術における心臓脱転の工夫. 第51回日本肺癌学会総会 広島. 2010年5月13-14日
- ③ 能勢直弘, 近石泰弘, 市来嘉伸, 永島明:肺原発Epithelioid Hemangioendotheliomaの一例. 第63回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会 北九州. 2009年11月26-27日
- ④ 能勢直弘: Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung. 第27回産業医科大学学会総会 北九州. 2009年10月6日
- ⑤ 能勢直弘, 横山えりな, 小野憲司, 永島明:非小細胞肺癌術後脳転移に対する治療成績の検討. 第26回日本呼吸器外科学会総会 北九州. 2009年5月14-15日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

能勢直弘 (NOSE NAOHIRO)

産業医科大学・医学部・非常勤医師