

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19436

研究課題名(和文) EGFR変異肺癌におけるTOPKの役割の解明

研究課題名(英文) Association of T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase expression with epidermal growth factor receptor mutations in surgically resected non-small-cell lung cancer

研究代表者

石井 秀宣 (Ishii, Hidenobu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60441648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK) は、免疫系細胞などの増殖や分化に関与する蛋白キナーゼである。正常組織には殆ど存在せず、がんの増殖に関わっていることが報告されている。久留米大学で手術を受けた非小細胞肺癌210症例について、肺癌組織におけるTOPKの発現を解析した。TOPKの発現は152例で認められ、陽性率は全体の72.4%であった。女性、非扁平上皮癌患者、EGFR遺伝子変異陽性の患者でTOPKの発現が多かった。TOPKが発現している患者群では、発現していない患者群と比較して、統計学的には有意ではないものの、生存期間が短い傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase (TOPK) is a serine-threonine kinase and is highly expressed in various type of human malignancies. We examined whether the expression of TOPK is related to clinicopathologic or prognostic factors in patients with surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC). The expression of TOPK was evaluated by immunohistochemical analysis in 210 specimens of surgically resected NSCLC. Expression of TOPK in tumor cells was observed in 72.4% (152 of 210) of NSCLC patients, and was significantly correlated with female, adenocarcinoma, and epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations. There was a tendency towards poor overall survival in patients with positive TOPK expression compared with those with negative. We found no relevance between TOPK expression and disease-free survival for surgical resection in NSCLC patients.

研究分野：肺がん

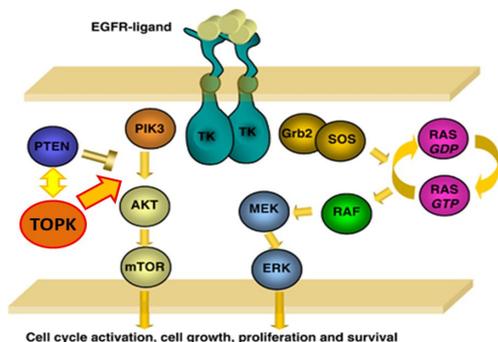
キーワード：TOPK EGFR 非小細胞肺がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近の分子生物学の進歩により、腫瘍発生の原因となる遺伝子変化が解析可能となり、癌遺伝子の機能を制御する分子標的治療薬を用いた個別化治療が一般化されつつある。非小細胞肺癌における上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異や未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 遺伝子転座などの癌細胞の増殖を drive する driver oncogene が発見され、それらに対する分子標的治療により肺癌患者の予後を改善し分子標的治療薬の発展に大きく寄与している (Oxnard et al, J Clin Oncol 2013)。しかし、分子標的治療が奏効した場合でもいずれは耐性を獲得し、治療抵抗性となる。EGFR 阻害薬への耐性としては、T790M 二次変異や MET の発現、EGFR 下流のシグナル活性化などが報告されているが (Holohan et al, Nat review Cancer 2013)、耐性獲得後の治療戦略は未だ確立されていない。

(2) T-LAK cell-originated protein kinase (TOPK) は、ヒトの PBK 遺伝子にコードされており、細胞のアポトーシスや増殖活性などを司る p38 をリン酸化して T 細胞やエフェクター細胞などの免疫系細胞などの増殖や分化に関与する蛋白キナーゼである。ヒトの正常組織にはほとんど存在せず、肺癌や乳癌を含む様々ながん腫で高発現し、腫瘍増殖に関与していることが報告されている。また TOPK 発現が多くのがん腫において予後不良因子であることが示されている (Shats I et al, Cancer Res 2011)。最近になって、TOPK 阻害薬が肺癌マウスモデルにおいて高い抗腫瘍効果を示すことが報告され (Matsuo Yo et al, Sci Transl Med 2014)、臨床応用が期待されている。TOPK はまた、EGFR が制御する伝達経路の下流のシグナルである PI3K/PTEN/AKT 経路の調節を介して細胞移動を促進していることが明らかとなっている (Shih MC et al, Oncogene 2012)。このことは、TOPK の発現が特に EGFR 変異陽性肺癌におけるシグナル活性化に関与している可能性があることを示唆している

図 1. 上皮成長因子受容体(EGFR)が制御する細胞内シグナル伝達経路 (The Pharmacogenomics Journal 2012;12:277-286 より改編)



2. 研究の目的

TOPK が、がん細胞の増殖に関わっていることは以前より研究が行われてきたが、その臨床的な重要度は不明であった。今回、TOPK 阻害薬が肺癌モデルマウスにて著明な腫瘍縮小効果を示したことで、がんの増殖・進展に大きな役割を果たしていることが示唆される。今後、TOPK を標的とした治療が臨床応用されていく可能性がある中で、肺癌、特に TOPK が EGFR シグナル伝達に関与していることから、EGFR 変異陽性肺癌における TOPK 発現の意義が重要になってくる可能性が考えられる。

本研究は、EGFR 陽性肺癌における TOPK との関連を肺癌細胞株および肺癌患者組織検体を用いて解析し、その役割を明らかにすることで今後の EGFR 阻害薬に対する耐性克服を含めた新しい肺癌の治療戦略構築に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

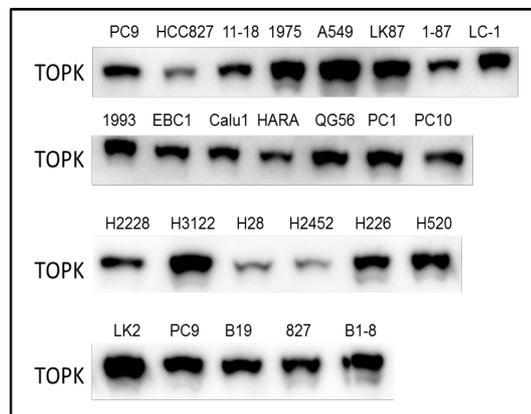
(1) 非小細胞肺癌細胞株 (EGFR 陽性肺癌細胞株および EGFR 野生型肺癌細胞株) に対して、TOPK の発現をウェスタンブロット法で解析する。

(2) 久留米大学病院で肺癌手術を行われた患者の手術摘出保存腫瘍検体に対して、TOPK の発現を抗 TOPK mouse monoclonal 抗体を用いて免疫染色を行って確認をおこなう。その上で、EGFR 遺伝子変異と、TOPK の発現の関連、および年齢や性別、喫煙歴といった臨床背景と、組織型などの病理学的特徴と TOPK 発現の関連についても解析を行う。また、TOPK 発現の違いによる予後の違いについても検討を行う。

4. 研究成果

(1) 肺癌細胞株において、TOPK の発現をウェスタンブロットを用いて解析した。EGFR 陽性肺癌細胞株、EGFR 陰性肺癌細胞株を含めて、解析を行ったすべての細胞株において TOPK の発現が確認された。

図 2. 肺癌細胞株における TOPK の発現



(2)2006年4月から2013年3月までの間に久留米大学病院で手術を受けた非小細胞肺癌患者のうち、手術検体が適切に保存され、臨床経過が入手可能であった210症例について患者背景と、肺癌の進行度や病理学的特徴などの情報を収集し、保存組織検体よりTOPKの発現を免疫染色で確認した。患者の年齢中央値は67歳で、男性が117例、女性が93例であった。組織型では扁平上皮癌が43例、非扁平上皮癌が167例、117例が喫煙歴を有していた。進行度は、IA期が104例、IB期が51例、IIA期が17例、IIB期が13例、そしてIIIA期が25例であった。EGFR陽性肺癌は、全210例中、68例であった。

TOPKの発現は、免疫染色を用いて評価を行い、腫瘍細胞の1%以上が染色されるものをTOPK陽性と判断した。TOPKの発現は152例で認められ、陽性率は全体の72.4%であった。TOPKの発現と、患者背景および腫瘍の組織学的特徴との関連を、統計学的に検討を行った。男性よりも女性、扁平上皮癌患者よりも非扁平上皮癌患者、そしてEGFR遺伝子変異陰性よりも遺伝子変異陽性の患者で統計学的有意にTOPKの発現が多いという結果であった。年齢、喫煙歴の有無、肺癌の進行度は、TOPKの発現と関連のある因子ではなかった。

表1. TOPKと患者背景との関連

因子	患者数	TOPK		p値
		陽性	陰性	
年齢				
70歳未満	111	83	28	0.41
70歳以上	99	69	30	
性別				
男性	117	77	40	0.02
女性	93	75	18	
喫煙歴				
非喫煙者	93	73	20	0.08
喫煙者	117	79	38	
組織型				
非扁平上皮癌	167	127	40	0.02
扁平上皮癌	43	25	18	
進行度				
I期	154	113	41	0.59
II-III期	56	39	17	
EGFR変異				
陽性	68	57	11	0.01
陰性	142	95	47	

さらに、TOPKの発現と、肺癌手術後の無再発生存期間および、全生存期間についての解析を行った。TOPKが発現している患者群では、発現していない患者群と比較して、統計学的には有意ではないものの、生存期間が短い傾向が認められた(HR, 0.58; 95% CI, 0.275-1.113; p=0.105)。肺癌手術からの無再発生存期間については、TOPKが発現している患者群と発現していない患者群のあいだで、明らかな差は認められなかった。

図3. TOPK発現群と非発現群における全生存期間の比較

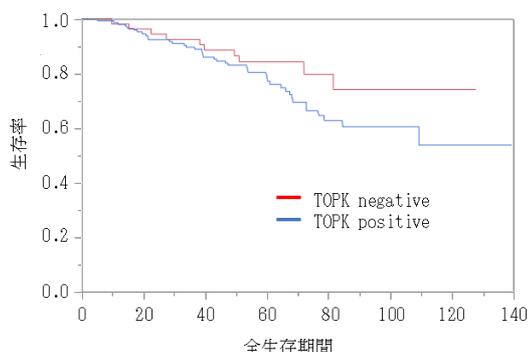
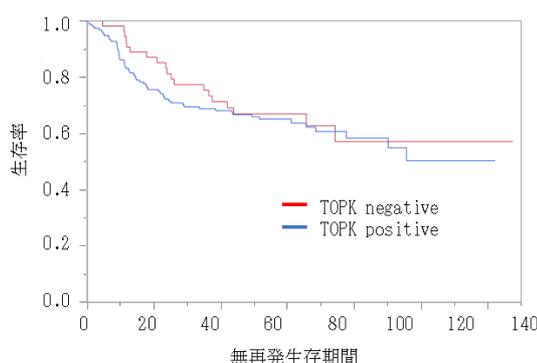


図4. TOPK発現群と非発現群における手術後の無再発生存期間の比較



これらの結果に加え、現在TOPK、EGFRの働きをそれぞれノックダウンした際に、肺癌細胞株の細胞増殖シグナルがどう変化するかを実験中であり、その実験結果を合わせて、最終的な結果を公表する予定である。

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〕(3件)

1. Ishii H, Azuma K, Yamada K, Matsuo N, Nakamura M, Tokito T, Kinoshita T, Hoshino T. Accuracy of transbronchial biopsy as a rebiopsy method for patients with relapse of advanced

- non-small-cell lung cancer after systemic chemotherapy. BMJ Open Respir Res. 2017;4:e000163. (査読有)
2. Matsuo N, Azuma K, Sakai K, Hattori S, Kawahara A, Ishii H, Tokito T, Kinoshita T, Yamada K, Nishio K, Hoshino T. Association of EGFR Exon 19 Deletion and EGFR-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in EGFR-Mutant Lung Cancer Patients. Sci Rep. 2016;6:36458. (査読有)
 3. Yamada K, Ichiki M, Takahashi K, Hisamatsu Y, Takeoka H, Azuma K, Shukuya T, Nishikawa K, Tokito T, Ishii H, Hoshino T. A multicenter phase II trial of S-1 combined with bevacizumab after platinum-based chemotherapy in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2016;78:501-7. (査読有)
 4. Tokito T, Azuma K, Kawahara A, Ishii H, Yamada K, Matsuo N, Kinoshita T, Mizukami N, Ono H, Kage M, Hoshino T. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. Eur J Cancer. 2016;55:7-14. (査読有)
 5. Ishii H, Azuma K, Sakai K, Kawahara A, Yamada K, Tokito T, Okamoto I, Nishio K, Hoshino T. Digital PCR analysis of plasma cell-free DNA for non-invasive detection of drug resistance mechanisms in EGFR mutant NSCLC: Correlation with paired tumor samples. Oncotarget. 2015;6:30850-8. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：発明者：
権利者：
種類
番号：
出年月日：
内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：発明者：
権利：
種類
番号

取得年月日
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 石井 秀宣
(HIDENOBU ISHII)

久留米大学医学部・内科学講座 呼吸器神
経膠原病内科部門・助教

研究者番号：60441648