

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590919  
 研究課題名（和文） 肺癌における化学療法感受性関連蛋白の単離とイメージングによる感受性予測法の開発  
 研究課題名（英文） Identification of chemosensitivity predictive factors in lung cancer cells and chemosensitivity prediction by image  
 研究代表者  
 弦間、昭彦（GENMA AKIHIKO）  
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号 20234651

## 研究成果の概要：

肺癌における化学療法を合理的に選択するシステムを確立するため、肺癌細胞株の網羅的発現解析と感受性解析を行い、バイオイメージング可能な感受性関連因子の選択を行った。その中で、EGFR と VEGFR の阻害剤に対して、標的そのものが妥当なイメージング対象と考えられ、培養株およびマウスモデルで、同様のイメージング結果が定量的に得られた。これらのイメージングの情報により、標的分子を有する腫瘍量をリアルタイムに定量的に把握できることから、分子標的薬の治療適応により直接的な情報が得られると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：内科学臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌 薬剤感受性 プロテオーム、イメージング、抗体アレイ、2D-DIGE、EGFR、VEGFR

## 1. 研究開始当初の背景

癌は、日本人の死亡原因の約3分の1を占め、肺癌は癌死亡原因の第一位となっている。これは、現在の治療限界を示すもので、新しい早期

診断技術や、抗癌剤治療、新標的治療等の全身療法の進歩が望まれている。近年、新しい分子標的治療の開発が行われ期待されているが、このような治療法の役割が高

まるにつれ、治療方法を合理的に選択するシステムの確立や標的分子のモニターリングが必要になる。ヒトゲノムの解読により、理論的には、細胞の性格を網羅的に捉え、その細胞の弱点となる治療標的を把握し、治療を選択する道筋が可能になってきた。しかし、肺癌におけるこの治療システム構築には、現在、2つの大きな問題点が存在していると考えている。一つは、血液腫瘍、消化器腫瘍、乳腺腫瘍と異なる点であるが、肺癌は、腫瘍組織の採取が難しい点、第二に、治療法決定因子の知見が未だ不確実な点である。特に、第一点を言い換えれば、腫瘍の性格をリアルタイムに把握することの困難さとなり、これは、治療選択上大きな障害であるといえる。

## 2. 研究の目的

今回、我々は、これらの点に焦点を当て、近年開発された網羅的解析の種々の方法を利用し確かな感受性関連因子を単離することと、リアルタイムな解析のため、バイオイメージングの実現を目指すことを計画した。この観点で診断用因子を選択し、動物レベルでの検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺癌細胞株30株パネルの感受性データ作成

肺癌のみの30株パネルを作成した。このパネルについて、現在肺癌治療に繁用されている9抗癌剤、2分子標的薬剤の感受性データをMTTアッセイにより作成した。

### (2) DIGEを用いた網羅的蛋白発現解析と確認

上記肺癌細胞株30株パネルについて、Ettan DIGE解析装置(Amersham Biosciences)を用いて、蛍光2次元電気泳動による網羅的蛋白量解析データを得た。特に、感受性に関わると考えられた因子について、質量分析装置による解析を行

った。

### (3) 抗体アレイを用いた網羅的蛋白発現解析と確認

少量の発現蛋白を解析するため、抗体アレイ(clontech)を用いて、肺癌細胞株30株についての網羅的蛋白量解析データを得た。

### (4) 情報管理と感受性関連蛋白の解析

大規模発現解析情報の管理は、専用管理ソフトウェアLIMSGene(メディビック社)などにより行った。感受性と発現の相関解析システムElectorGene Finding(Genetic Lab社)(modified NCI60 program)により、感受性関連蛋白あるいは活性化蛋白を同定した。同定された因子群は、人工知能型アルゴリズム解析(ニューラルネットワークと遺伝的アルゴリズムを用いた解析)解析ソフトウェアElectorGene Validation(Genetic Lab社)により、感受性予測を行った。

### (5) イメージングに適した感受性関連蛋白の選定

上記解析から感受性と相関することが示された因子から、①蛋白量の増加を認めるもの、②肺組織の発現が障害にならないもの、③治療効果発現機序に関わる因子、④膜や代謝に関わるものなど、の観点からイメージングに適した蛋白を選択した。

### (6) マウスによるイメージングと治療実験

肺癌細胞株PC9とso gefitinib resistant株PC9/f14をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍径>10mmの状態で、

IRDye 800CW labeled EGF (1 nmol/mouse) と IRDye 800CW labeled anti-VEGFR antibody (50  $\mu$  mol/mouse) を尾静脈から注入し、腫瘍を評価した。治療は、同時期に、gefitinib と EGFR-VEGF-TKI を口腔から投与した。

#### 4. 研究成果

肺癌における化学療法を合理的に選択するシステムの確立や標的分子のモニターリングを行うため、トランスクリプトーム、プロテオームの網羅的解析を利用し感受性関連因子を単離、バイオイメージングによるリアルタイムな診断への活用が可能な適切な因子の選択を行った。具体的には、薬剤感受性パネルについて、cDNA array、2D-DIGE 解析、抗体アレイ (clontech) を用いて、網羅的蛋白解析データを得た。この解析結果と感受性データから ElectorGene Finding (Genetic Lab 社) (modified NCI60 program) を用いて感受性発現関連解析を行い、感受性と相関することが示された因子から、方法に示した条件から、バイオイメージングに適した蛋白を選択因子とした。この一方で、データの妥当性を検討するため、抗体アレイとトランスクリプトームの薬剤のクラスターリングを比較したが、クラスターリングでは、再現性のあるデータを得ている。ただ、感受性規定因子は解析により異なり、イメージングに適した因子は、蛋白解析から得ることとした。

その因子の中から、妥当と考えられたマウス皮下移植腫瘍に対し、その腫瘍の EGFR、VEGFR のイメージングを行った。そして、EGFR 阻害剤、EGFR と VEGFR の阻害剤を投与し、その治療効果を EGFR、VEGFR のイメージングにより評価した。培養株およびマウスモデルの抗腫瘍効果は、ほぼ同様の結果が定量的に得られた (Table 1, 2)。これらのイメージングの情報により、標的分子を有する腫瘍量を定量的に得られることから、今後、他の薬剤感受性予測因

子を用いることで、標的因子と感受性の両面から適切な薬剤投与が可能になると考えられた。

**Table 1 Summary of imaging (EGF)**  
(Fluorescence signal /  $\text{mm}^2$ )

	PC9	PC9/f14
untreated	105.89	36.59
treated	5.81	26.88

**Table 2 Summary of imaging (VEGF)**  
(Fluorescence signal /  $\text{mm}^2$ )

	PC9	PC9/f14
untreated	189.92	72.37
treated	66.77	47.76

#### 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 10 件)

1. Minegishi Y, Takenaka K, Mizutani H, Sudoh J, Noro R, Okano T, Azuma A, Yoshimura A, Ando M, Tsuboi E, Kudoh S, Gemma A. Exacerbation of idiopathic interstitial pneumonias associated with lung cancer therapy. Intern Med. 48(9):665-72, 2009, 有
2. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, Ando M, Yamazaki K, Saijo Y, Gemma A, Miyazawa H, Tanaka T, Ikebuchi K, Nukiwa T, Morita S, Hagiwara K; North East Japan Gefitinib Study Group. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. J Clin Oncol. 27(9):1394-400, 2009, 有.
3. Kuribayashi H, Tsuta K, Mizutani E, Maeshima AM, Yoshida Y, Gemma A, Kudoh S, Asamura H, Matsuno Y. Clinicopathological analysis of primary lung carcinoma with heterotopic

- ossification. Lung Cancer. 64(2):160-5, 2009, 有.
4. 4 Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, Aokage K, Saijo N, Nishiwaki Y, Gemma A, Kudoh S, Ochiai A. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. Cancer. 113(6):1387-95, 2008, 有.
- 5 Miyanaga A, Gemma A, Noro R, Kataoka K, Matsuda K, Nara M, Okano T, Seike M, Yoshimura A, Kawakami A, Uesaka H, Nakae H, Kudoh S. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. Mol Cancer Ther. 1923-30, 2008, 有.
- 6 Takemura A, Gemma A, Shibuya M, Matsuda K, Okano T, Nara M, Noro R, Minegishi Y, Yoshimura A, Kudoh S. Gemcitabine resistance in a highly metastatic subpopulation of a pulmonary adenocarcinoma cell line resistant to gefitinib. Int J Oncol. 31(6):1325-32, 2007, 有.
- 7 Noro R, Gemma A, Miyanaga A, Kosaihiira S, Minegishi Y, Nara M, Kokubo Y, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, Okano T, Yoshimura A, Kudoh S. PTEN inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Int J Oncol. 31(5):1157-63, 2007, 有.
- 8 Seike M, Yanaihara N, Bowman ED, Zanetti KA, Budhu A, Kumamoto K, Mechanic LE, Matsumoto S, Yokota J, Shibata T, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Wang XW, Harris CC. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. J Natl Cancer Inst. 99(16):1257-69, 2007, 有.
- 9 Li C, Gemma A, Minegishi Y, Matsuda K, Seike Y, Noro R, Shionoya A, Kawakami A, Ogawa N, Kudoh S. In vitro simulation study of individualized chemotherapy in lung cancer. J Nippon Med Sch. 2007 Jun;74(3):217-22, 有.
- 〔学会発表〕(計1件)  
弦間昭彦. 抗癌剤のリスクとベネフィット—イレッサを中心に。特別シンポジウム「呼吸器領域におけるリスクアセスメントとリスクコミュニケーション」第47回日本呼吸器学会、2007
- 〔図書〕(計10件)
1. 弦間昭彦。(2008) 抗がん剤 d. 間質性肺炎 医薬品副作用ハンドブック(高橋隆一 編集)、日本臨床社(東京)
  2. 弦間昭彦。(2007) 第12章 癌緊急対応と支持療法 4 抗癌剤による間質性肺炎(ゲフィチニブ、ボルテゾミブを含む)「Cancer Treatment Navigator」(中川和彦 編集)、メディカルビュー社(東京)
  3. 弦間昭彦。(2007) II. 肺癌の分子生物学 3. 癌の生物学と臨床応用の現状。肺癌のすべて(江口研二、横井香平、弦間昭彦 編集)、28-33 文光堂(東京)
  4. 弦間昭彦。(2007) IX. 分子標的治療 CE. 薬剤性肺障害。肺癌のすべて(江口研二、横井香平、弦間昭彦 編集)、346-349 文光堂(東京)

5. 弦間昭彦 (2007) II疾患の病因と病態 8  
肺の線維化と発癌 Annual Review 呼吸器  
2007(工藤翔二、土屋了介、金沢 実、大田 健  
編集)、117-121 中外医学社(東京)

6. 峯岸裕司、弦間昭彦。(2007) 腫瘍性疾患 3  
非小細胞肺癌の集学的治療 呼吸器疾患最新の  
治療 2007-2009(工藤翔二、中田紘一郎、貫和敏  
博 編集)、399-404 南江堂(東京)

7. 篠田欣也、弦間昭彦。(2007) 第1部5章  
総論 1 薬物療法 E 抗癌薬。「呼吸器専門医テ  
キスト」(工藤 翔二、中田 紘一郎、永井 厚  
志、大田 健 編集)、南江堂(東京)

8. 岡野哲也 弦間昭彦。(2007) 第2章 診断  
法一現況と最新の進歩 肺癌診療におけるDNA  
診断。医学の歩み 呼吸器疾患-state of  
arts-Ver. 5。(北村 諭、工藤 翔二、石井芳樹  
編集)、医歯薬出版株式会社(東京)

9. 弦間昭彦。(2007) 2. 薬効群別副作用 1  
4) 抗がん剤 d. 間質性肺炎 医薬品副作用学  
-薬品の安全使用 Update-(高橋隆一 編集)、  
299-303 日本臨床社(東京)

10. 弦間昭彦。(2007)「発見 診断」肺癌を合  
併しやすい呼吸器疾患。MOOK「肺癌の臨床  
2006-2007」(監修 加藤 治文、西條 長宏、  
福岡 正博、小林 紘一、海老原 善郎、井内  
康輝、早川 和重)、113-118 篠原出版新社(東  
京)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

弦間 昭彦 (GEMMA AKIHIKO)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20234651

### (2) 研究分担者

工藤 翔二 (KUDOH SHOJI)

日本医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：40256912

清家 正博 (SEIKE MASAHIRO) 日本医科大  
学・医学部・講師

研究者番号：30366687

岡野 哲也 (OKANO TETSUYA)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：00339376

### (3) 連携研究者