

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590372

研究課題名(和文) ABCG2 遺伝子多型に基づく非小細胞肺癌のゲフィチニブ感受性・副作用発症予測

研究課題名(英文) Effects of functional ABCG2 polymorphisms on the sensitivities/adverse effects of gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer

研究代表者

今井 康雄 (IMAI YASUO)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10342651

研究成果の概要(和文)：ABCG2は半分子型ABCトランスポーターで、gefitinibを細胞外に排泄する。ABCG2は種々の幹細胞や消化管粘膜、血管内皮細胞に発現し gefitinib の有害事象発症に関与する可能性が示唆されている。ABCG2にはC376TとC421Aという機能低下・喪失型遺伝子多型が存在する。我々は gefitinib を250 mg/日経口投与された日本人の非小細胞肺癌患者75名を対象に *ABCG2* 遺伝子多型を解析し、その副作用発症との関連を調べた。野生型は34例、少なくとも1本のアレルに多型を認める変異型は41例に認められ、各群で臨床的背景に有意差を認めなかった。しかし急性肺障害(野生型4/変異型2)、肝機能障害(5/8)、下痢(10/12)、皮膚症状(26/30)の発症にも有意差を認めなかった。大腸癌株DLD-1に野生型 *ABCG2* とC421A変異 *ABCG2* のcDNAを強制発現させるとmRNA発現レベルは同様だがC421A導入細胞では蛋白質発現が野生型の1/2であり、SN-38に対して野生型より高感受性を示したが gefitinib に対する感受性は同様であった。以上の結果からEGFRシグナル伝達系の支配を強く受けない細胞・組織では gefitinib の有害事象に対する *ABCG2* 遺伝子多型の影響は少ないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：ABCG2 is a half-size ATP-binding cassette transporter implicated in cellular gefitinib transport. Reportedly, the C421A *ABCG2* gene variant was associated with gefitinib-induced diarrhea in Caucasian patients with non-small cell lung cancer. C421A *ABCG2*, resulting in Q141K substitution, is more prevalent in Asian populations. Therefore, the putative relationship between gefitinib-induced adverse effects and this functional polymorphism was investigated in 75 Japanese patients with non-small cell lung cancer treated with gefitinib 250 mg/d orally. C376T, resulting in truncated, non-functional ABCG2, was also investigated. Forty one (54.7%) patients harbored 376T or 421A *ABCG2* on at least one allele, while the remaining 34 (45.3%) were wild type for *ABCG2*. No significant group differences were observed in frequency of gefitinib-related diarrhea or other adverse effects. Next, DLD-1 colon cancer cells expressing wild-type (DLD-1/WT) or 141K mutant ABCG2 (DLD-1/Q141K) were established for investigation of in-vitro cell sensitivity to the ABCG2-substrate drugs, gefitinib and SN-38. ABCG2 expression was much lower in DLD-1/Q141K cells than in DLD-1/WT cells, despite similar *ABCG2* mRNA levels. DLD-1/WT cells acquired more resistance to SN-38 than did DLD-1/Q141K cells, but neither cell line acquired gefitinib resistance compared with parental cells. In-vitro data also suggested that ABCG2 has only a limited role in toxicity of gefitinib, but not SN-38, in colon-derived cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理 抗癌剤感受性・副作用発症予測 遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

(1) Epidermal growth factor receptor (EGFR) は進行非小細胞肺癌の 40-80%に過剰発現している。その分子標的治療薬であるゲフィチニブは非小細胞肺癌の一部の症例に対して劇的な効果を示すが、感受性を規定する因子は未だ十分に明らかではない。また、ゲフィチニブが世界に先駆けて治療薬として承認された我が国では急性肺障害・間質性肺炎による死亡が多数報告され社会問題となった。ゲフィチニブは非小細胞肺癌の一部の症例に対して劇的な効果を示すが、第3相臨床試験 (INTACT 1 and 2, ISEL) では患者選択を行わなかった場合有為な生存期間の延長が認められないことが明らかとなり、製造・販売業者である AstraZeneca 社は欧州での治療薬剤としての承認申請を取り下げた。一方で東洋人では生存期間の延長を認めたとの報告もあり、日本では引き続き臨床使用が継続されている。この結果はゲフィチニブの有用性を否定するものではなく、その効果には人種差や個人差があるということを示唆するものである。これまでにゲフィチニブの感受性を予測する因子としては *EGFR* の活性化遺伝子変異が報告されている。この遺伝子変異は東洋人、女性、腺癌、非喫煙者の患者群に高頻度に認められ、実際にゲフィチニブが著効した症例の 80%に遺伝子変異が認められることが明らかになった。しかし、追試により有効症例でも 20%に *EGFR* 活性化変異が認められず変異のない症例でも 30%に有効例が存在する事が判明した。また、*EGFR* の活性化遺伝子変異の検索には腫瘍組織の採取が不可欠であり必然的に侵襲的な処置を伴う点が難点である。

2. 研究の目的

ABCG2 とゲフィチニブとの相互作用は複数のグループから報告されている。ゲフィチニブは *ABCG2* による薬物耐性を克服するが、これはゲフィチニブが *ABCG2* の輸送基質である薬物と競合するためであるのか、あるいは単にゲフィチニブが *ABCG2* と相互作用してその輸送機能を抑制するために過ぎないのかは議論されているところである。ゲフィチニブは *ABCG2* の輸送基質ではないとする報告もあるが、我々の実験結果では *ABCG2* を高発現させた A431 細胞がゲフィチニブに耐性になることからゲフィチニブ自体が *ABCG2* の輸送基質ではないかと考えている。今後より精度の高い輸送実験系の構築によりこの点を明らかに

することが必要である。*ABCG2* 遺伝子にはその蛋白質発現量に大きく影響を与えるエクソン 5 の C421A という遺伝子多型とエクソン 4 の C376T という遺伝子多型があり、これは我々が初めて発見・報告したものである。本研究は、ゲフィチニブの薬物動態に関わる可能性がある *ABCG2* の遺伝子多型に基づき非小細胞肺癌の感受性と肺の有害事象の出現を予測するための初めての研究であり、安全で効果的なゲフィチニブ治療の確立に貢献する可能性がある

3. 研究の方法

(1) 茨城県立中央病院地域がんセンターと獨協医科大学越谷病院呼吸器内科にてゲフィチニブの投与を受けた成人患者本人あるいは患者家族に対し研究内容の十分な説明を行い文書による同意を得た上で、患者末梢血あるいは病理検体からゲノム DNA/RNA を抽出し *ABCG2* の遺伝子多型の解析を行った。試料提供者の個人識別情報 (氏名・住所・電話番号等、個人を特定できる情報) は、個人情報管理者により管理されて連結不可能匿名化を行った。有害事象の発生や予後等の臨床情報については茨城県立中央病院地域がんセンターおよび獨協医科大学越谷病院で各患者の担当医により後向きに収集した。

(2) 平行して茨城県立中央病院地域がんセンターでゲフィチニブの投与を受けた成人患者本人に対し研究内容の十分な説明を行い文書による同意を得た上で、患者末梢血からゲノム DNA/RNA を抽出し *ABCG2* の遺伝子多型の解析を行った。個人情報保護は後向き研究と同様に厳密に行われた。

(3) 抽出された非腫瘍部ゲノム DNA を鋳型として *ABCG2* のエクソン 4、エクソン 5 を PCR で増幅し、増幅産物を抽出、精製したのち直接塩基配列決定を行った。必要に応じてエクソン 4-イントロン 4-エクソン 5 を一括増幅し TA クローニング後、クローン毎に塩基配列を決定した。

(4) 治療効果と有害事象の発症について Common Terminology Criteria for Adverse Event v3.0 に基づき Grade 評価を行う。*ABCG2* 遺伝子多型に基づく非小細胞肺癌のゲフィチニブ感受性と有害事象発症予測に関する研究の実験結果の解析を行った。

(5) 大腸癌細胞株 DLD-1 に野生型 ABCG2 cDNA と C421A 変異型 ABCG2 cDNA を transfection した後 puromycin で選択し、野生型あるいは変異型 ABCG2 を安定的に高発現する細胞 (DLD-1/WT, DLD-1/Q141K) を樹立した。これらの細胞から total RNA と蛋白質を抽出し、real-time RT-PCR と Western blot により ABCG2 の発現レベルを RNA レベルと蛋白質レベルで解析を行った。

(6) DLD-1, DLD-1/WT, DLD-1/Q141K 細胞を 12 穴プレートに様々な濃度の抗癌剤の存在下で 3×10^4 /well でまき 4 日間培養後、Coulter counter で細胞数を決定した。抗癌剤のない状態で培養されたコントロール細胞に対する細胞数の割合を求め細胞増殖阻害曲線を描いて IC₅₀ 値を決定した。

4. 研究成果

(1) 患者の臨床像と ABCG2 遺伝子型の相関
非小細胞肺癌患者 75 名について ABCG2 遺伝子型が決定された。

表 1. ABCG2 遺伝子多型の頻度

		C421A	CC	CA	AA
			n = 35	n = 39	n = 1
C376T					
CC	n = 73		34	38	1
CT	n = 2		1	1	0
TT	n = 0		0	0	0

表 2. ABCG2 遺伝子型と臨床像

	合計	野生型	変異型	p 値
患者数 (%)	75	34 (45.3%)	41 (54.7%)	
性(男/女)	36 / 39	15/19	21/20	0.54
平均年齢(範囲)	62 (36-80)	62 (36-75)	62 (38-80)	0.844 _b
組織型(腺癌/扁平上皮癌他)	65/10	30/4	35/6	1.00 ^a
病期 (IA-IIIIB/IV)	21/50	13/21	8/29	0.125
喫煙歴 (有/無)	35/40	15/19	20/21	0.687
WHO 活動指数 (0/1-4)	27/44	15/19	12/25	0.311
放射線治療既往 (-/+)	48/27	22/12	26/15	0.908
化学療法既往 (-/+)	8/67	4/30	4/37	1.00 ^a
手術既往 (-/+)	42/33	20/14	22/19	0.654

^a, 両側 Fisher 正確検定; ^b, Mann-Whitney U 検定.

C421A 多型の CC, CA, AA 型は各々 35 (46.7%), 39 (52.0%), 1 (1.3%) 例に認められた。C376T 多型の CC, CT, TT 型は各々 73 (97.3%), 2 (2.7%), 0 (0.0%) 例に認められた。(表 1) 1 人の患者は C421A 多型と C376T 多型を

別々のアレルにそれぞれ有していることがエクソン 4-イントロン 4-エクソン 5 全体ゲノム DNA の PCR-TA クローニング-塩基配列決定によって確かめられた。結果として 34 人 (45.3%) が ABCG2 野生型であり 41 人 (54.7%) が変異型と分類された。C421A の遺伝子型は理由は不明であるが Hardy-Weinberg 平衡に従っていなかった。患者の臨床像は表 2 に示されているが、野生型と変異型との間で臨床像に有意な違いを認めることはできなかった。

(2) ゲフィチニブの副作用と ABCG2 遺伝子型の相関

ゲフィチニブの治療効果・有害事象は投与開始から少なくとも 8 週間後以降で評価された。

Grade 1-5 の間質性肺障害は 75 人中 6 人 (8.0%) に認められた。患者一人が grade 5 の間質性肺障害で死亡した。Grade 1-2 の下痢が 22 人 (29.3%) に、grade 1-3 の肝機能障害と皮膚症状が各々 13 人 (17.3%) と 56 人 (74.7%) に認められた (表 3)。

表 3. ABCG2 遺伝子型によるゲフィチニブ効果

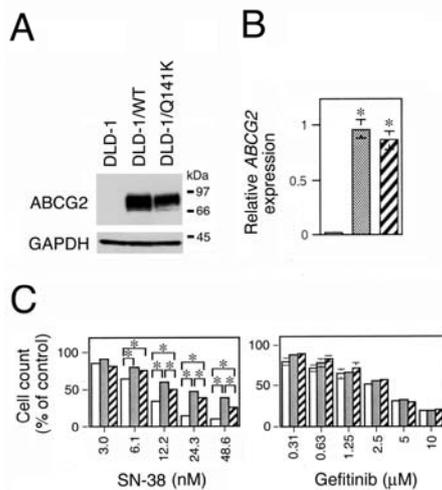
効果	合計	野生型	変異型	p 値
間質性肺障害 (grade 0/1-5)	69/6	30/4	39/2	0.401 _a
下痢 (grade 0/1-4)	53/22	24/10	29/12	0.989
皮膚毒性 (grade 0/1-4)	19/56	8/26	11/30	0.795 _a
肝機能障害 (grade 0/1-4)	62/13	29/5	33/8	0.761 _a
抗腫瘍効果 (SD, PD/CR, PR)	36/30	18/13	18/17	0.589

野生型と変異型との間でゲフィチニブによる副作用の発症に差は見られなかった。興味深いことに C421A ホモの症例及び C376T と C431A を別々のアレルにもつ症例でも間質性肺障害の発症は認められなかった。部分寛解あるいは完全寛解は野生型 31 例中 13 例 (41.9%) に認められたが変異型では 35 例中 17 例 (48.6%) に見られ、ゲフィチニブへの反応および全生存期間に両群間で差が認められなかった (data not shown)。

(3) ABCG2 の遺伝子導入大腸癌細胞 DLD-1 での ABCG2 発現レベル

各々野生型あるいは Q141K 変異型 ABCG2 を発現する DLD-1/WT 細胞、DLD-1/Q141K 細胞を樹立した。ABCG2 の mRNA 及び蛋白質発現レベルを RT-PCR および Western blot で解析したところ、蛋白質発現レベルは DLD-1/Q141K 細胞で DLD-1/WT の約半分であった (Fig. 1A) が mRNA 発現レベルは両細胞で差が見られなかった (Fig. 1B)。

Fig. 1.



(4) 細胞増殖阻害試験

DLD-1/WT 細胞と DLD-1/Q141K 細胞を用いて ABCG2 の輸送基質である抗癌剤に対する感受性試験を行った。DLD-1/Q141K 細胞は DLD-1 細胞に比べて SN-38 に対して耐性を示したが、その耐性度は DLD-1/WT 細胞よりも低かった (Fig. 1C)。DLD-1, DLD-1/WT, そして DLD-1/Q141K 細胞の SN-38 に対する IC₅₀ 値は各々 8.26 ± 0.32, 21.4 ± 0.49, 12.2 ± 1.58 nM であった。これに対して DLD-1, DLD-1/WT, DLD-1/Q141K 細胞のゲフィチニブに対する IC₅₀ 値は各々 2.60 ± 0.28, 2.96 ± 0.12, 3.02 ± 0.10 μM であり、これらの細胞間で有意差を認めなかった。ゲフィチニブの血漿中最高濃度は 1μM 以下であるため、これらの細胞は基本的にゲフィチニブ耐性と考えられる。これらの結果は、EGFR シグナルの影響をあまり受けにくい組織、細胞ではゲフィチニブの毒性に ABCG2 の遺伝子多型があまり影響しないことを示唆する。

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] (計 2 件)

- ① Akasaka K, Kaburagi T, Yasuda S, Ohmori K, Abe K, Sagara K, Ueda Y, Nagao K, Imura J, Imai Y. Impact of functional *ABCG2* polymorphisms on the adverse effects of gefitinib in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 査読有, Vol. 66, 2010, pp. 691-698
- ② Kuroso K, Imai Y, Kobayashi M,

Yanagimoto K, Suzuki T, Kojima M, Ueda Y. Immunohistochemical detection of fibroblast growth factor receptor 3 in human breast cancer: correlation with clinicopathological / molecular parameters and prognosis. *Pathobiology* 査読有 Vol. 77, 2010, pp. 231-240

[学会発表] (計 4 件)

- ① Imai Y, Akasaka K, Kaburagi T, Yasuda S, Imura J, Ueda Y. The *ABCG2* polymorphism and the gefitinib-induced side effects in Japanese patients with non-small cell lung cancer. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Osaka, 2010
- ② Imai Y, Akasaka K, Kaburagi T, Imura J, Ueda Y. Association between the *ABCG2* polymorphisms and the gefitinib-induced side effects in Japanese patients with non-small cell lung cancer. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2010, Washington, DC
- ③ 今井康雄, 赤坂圭一, 鏑木孝之, 井村穰二, 上田善彦 非小細胞肺癌患者における gefitinib の有害事象発症に対する *ABCG2* 遺伝子多型の影響 第 99 回日本病理学会総会 東京都新宿区, 2010
- ④ 赤坂圭一, 鏑木孝之, 一和多俊男, 相良博典, 上田善彦, 長尾光修, 井村穰二, 今井康雄 *ABCG2* 遺伝子多型と gefitinib による有害事象の相関についての検討 第 50 回日本肺癌学会 東京都新宿区, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 康雄 (IMAI YASUO)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10342651

(2) 連携研究者

上田 善彦 (UEDA YOSHIHIKO)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：50151808
赤坂 圭一 (UEDA YOSHIHIKO)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：50364542