

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590995

研究課題名（和文）非喫煙者肺癌モデルを用いた細気管支肺胞上皮癌より浸潤癌への進展機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of progression from bronchioloalveolar carcinoma to invasive adenocarcinoma

研究代表者

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60325107

研究成果の概要（和文）：細気管支肺胞上皮癌（BAC）パターンは肺腺癌の辺縁（進展部）でしばしば認められる。その部位の上皮成長因子受容体（EGFR）関連シグナルについて検討した。胸部 CT 上で、すりガラス陰影を伴う肺腺癌の手術検体 50 例中、腫瘍径 1 cm 未満が 6 例、1 - 2 cm が 18 例、2 cm 以上が 26 例であった。2 cm 以下の小型肺癌 24 例中 9 例が非浸潤型で 15 例が浸潤型であった。免疫組織染色にて EGFR、pAKT、pMAPK は腫瘍の辺縁の BAC パターン部位よりも腫瘍中心部に多く発現していたが、pSTAT3 は逆に BAC パターン部位に多く発現していた。腫瘍径 2 cm 以下の腫瘍では中心部の pSTAT3 の発現は浸潤型より非浸潤型で多く認められた。EGFR 遺伝子変異の有無では pSTAT3 の発現には差は認められなかった。EGFR 遺伝子改変マウスの肺発癌モデルでは、pSTAT3 は腫瘍中心部より辺縁の BAC パターン部位により多く発現しており、2 つの肺癌細胞株（EGFR 遺伝子変異を有する PC-9、EGFR 野生型の A549）では JAK2/STAT3 阻害剤（JSI-124）に対して同等の感受性が示された。以上より、BAC 成分を有する腺癌の進展部位には STAT3 が強く発現しており、STAT3 の阻害によりその進展を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Bronchioloalveolar carcinoma (BAC) pattern is often seen at the margin of invasive adenocarcinoma. We investigated EGFR signaling abnormalities involved in the progression of adenocarcinoma. Fifty tumors were obtained from patients who underwent surgery for lung adenocarcinoma seen as dense areas in ground glass opacity on computed tomography. Six, 18, and 26 tumors < 1 cm, 1-2 cm, and \geq 2 cm in diameter, respectively, were analyzed. Of the 24 tumors \leq 2 cm in diameter, nine were preinvasive and 15 were invasive. EGFR, pAKT, and pMAPK were overexpressed in the center of the adenocarcinoma compared to the BAC component by immunohistochemistry, while pSTAT3 expression was reversed. In the tumors \leq 2 cm in diameter, pSTAT3 expression in the central area was higher in preinvasive tumors than in invasive tumors. pSTAT3 was identified in the BAC component of 88% of the EGFR mutant (n = 17) and 82% of the wild-type tumors (n = 33). Transgenic mice expressing delE748-A752 EGFR and two lung cancer cell lines (PC-9 mutant and A549 wild-type EGFR) were also investigated. In transgenic mice, pSTAT3 was overexpressed in the BAC component around the adenocarcinoma center. Two lung cancer cell lines that overexpressed pSTAT3 were equally sensitive to a JAK2/STAT3 inhibitor (JSI-124). In conclusion, adenocarcinomas with a BAC component overexpressed pSTAT3 at the margin compared to the center of the tumor. Moreover, STAT3 inhibitors may have therapeutic potential in the inhibition of adenocarcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、発癌、EGFR

1. 研究開始当初の背景

肺癌は喫煙が主たる原因で発症する悪性腫瘍の代表的疾患であるが、肺癌全体では男性の約15%、女性の約50%が非喫煙者である。今後、禁煙により喫煙関連の肺癌死亡は減少することが予想されるが、非喫煙者の肺癌については未だ有効な予防法は確立されていない。非喫煙者肺癌の組織型は50%から80%を腺癌が占めており、肺癌全体で最多の組織型であるため、特に非喫煙者肺腺癌を対象とした予防および治療法の確立が強く望まれる。非喫煙者肺腺癌の多くに上皮性成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異が認められている。我々は、肺のみに発現している Surfactant protein-C (SP-C) に変異型 EGFR 遺伝子を付加することによる遺伝子改変マウスを開発し、ヒトの肺腺癌と同様に病理学的に異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia: AAH)、細気管支肺胞上皮癌 (bronchioloalveolar carcinoma: BAC)、浸潤癌 (invasive adenocarcinoma) への進行を確認している。

2. 研究の目的

非喫煙者肺癌マウスモデルと臨床検体を用いて、BACより浸潤癌へ至るEGFR伝達経路を明らかにし、それを遮断することにより肺癌の進展を抑制する方法を模索する。

3. 研究の方法

(1) 手術検体

術前CT画像にて中心部に充実性部分を有するすりガラス陰影 (GGO) を認めた肺腺癌50例の手術検体を用いた。

(2) マウスモデルと細胞株

EGFR遺伝子変異 (E748-A752欠損) を発現したヒト遺伝子改変マウスからの腫瘍組織をパラフィン包埋し5μmの切片を作成した。また2つの肺癌細胞株は、EGFR遺伝子変異 (E746-A750欠損) を持つ細胞株PC-9と野生

型EGFR細胞株A549を用いた。

(3) 免疫組織化学染色

手術検体のパラフィン包埋した組織から5μmの切片を作成しスライドグラスに乗せ、キシレンとエタノールで脱パラフィン作業を行い、pH 6.0の10mMクエン酸緩衝液で抗原を賦活し、0.3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。1次抗体として、抗EGFR抗体、抗HER3抗体、抗pSTAT3抗体、抗pAKT抗体、抗pMAPK抗体と反応後、2次抗体と反応させ、diaminobenzidineで発色させヘマトキシリン染色を行った。EGFR遺伝子改変マウスにおいても同様の方法にてpSTAT3による免疫組織化学染色を行った。

(4) 薬剤感受性試験

JAK2/STAT3阻害剤 (JSI-124) を用いて、細胞増殖抑制効果をMTTアッセイ法により検証した。

(5) ウェスタンブロット法

EGFRシグナル伝達経路の蛋白pEGFR、pSTAT3、pSRC、pJAK2、EGFR、JAK2、SRC、STAT3をそれぞれ検出した。

(6) 統計学的検討

統計学的検討はカイ二乗検定を用い、 $p < 0.05$ で統計学的に有意と判定した。

4. 研究成果

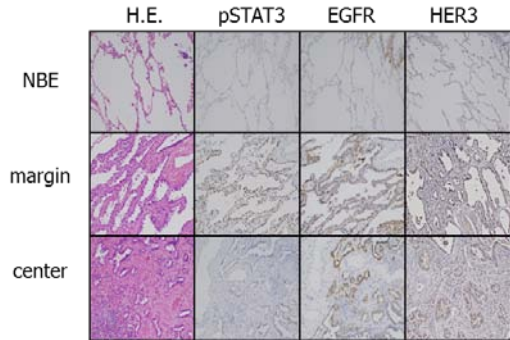
(1) 患者背景

手術検体の患者背景は、年齢中央値が66歳 (42-83歳)、男性18例と女性32例であり98%が術後病期IAまたはIBであった。腫瘍径1cm未満が6例、1-2cmが18例、2cm以上が26例であり、2cm以下の24例中9例が野口分類AとBで、15例がCであった。

(2) 免疫組織化学染色

EGFR、HER3、pSTAT3、pAKT、pMAPKの強発現はそれぞれ15例、17例、42例、13例、18例で認められた。EGFR、HER3、pMAPKは腫瘍径1cm以上でより多く発現していた。腫瘍を中心部位と辺縁部位 (CT画像での充実性部

位と GGO 部位に相当) に分けて検討すると、EGFR の発現は辺縁よりも中心部位で多く (26%対 14%)、pSTAT3 は中心よりも辺縁部位で多く発現していた (34%対 84%)。中心部位での pSTAT3 の発現をみると、腫瘍径 1 cm 未満のほうが 1 cm 以上より多く発現しており、野口分類では C よりも A と B のほうが多く発現していた。



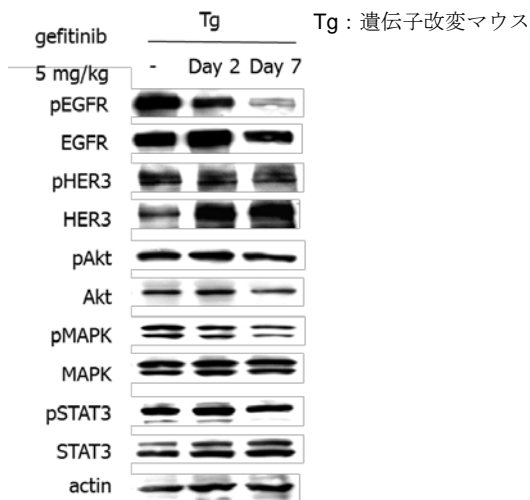
NBE: 正常気管支上皮
margin: 辺縁部、center: 中心部
HE: ヘマトキシリン・エオジン染色

(3) EGFR 遺伝子変異

50 例のうち EGFR 遺伝子変異は 17 例 (エクソン 19 欠失が 7 例、エクソン 21 点突然変異が 10 例) で認めたが、EGFR、HER3、pSTAT3、pAKT、pMAPK の発現と遺伝子変異の有無には差が認められなかった。

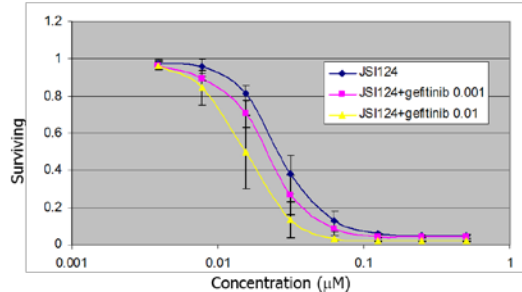
(4) EGFR 遺伝子改変マウスでの検討

生後 2 週の EGFR 遺伝子改変マウスの肺における EGFR シグナル経路の各蛋白発現を検討した。生後 8 週のマウスの肺腫瘍の免疫組織化学染色では、pSTAT3 は腫瘍の中心部位より辺縁の BAC パターンに、より多く発現していた。生後 7 週の遺伝子改変マウスに EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブを投与し、肺における EGFR シグナル経路の各蛋白発現を検討したところ、pSTAT3 の発現の減少量は pEGFR のそれよりも少なかった。



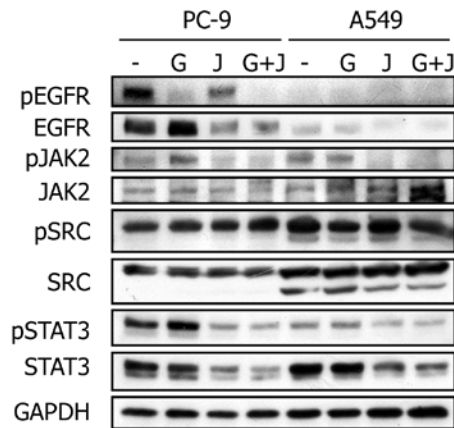
(5) 細胞株での検討

JSI-124 での PC-9 と A549 の 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) はそれぞれ 0.026±0.004 μM と 0.027±0.002 μM であった。JSI-124 にゲフィチニブを併用すると、PC-9 では IC₅₀ が 0.016±0.005 μM と低下したが、A549 では JSI-124 単剤と差は認められなかった。



薬剤付加 96 時間後の PC-9 細胞の反応曲線

ゲフィチニブ投与後では pSTAT3 の発現は不変であったが、JSI-124 は発現を抑制した。



G: gefitinib; J: JSI-124

(結論)

BAC より浸潤癌の進展には STAT3 の関与が認められ、JAK2/STAT3 の阻害により進展の抑制が期待されることが示唆された。

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 Takata Saburo, Takigawa Nagio, Segawa Yoshihiko, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Kozuki Toshiyuki, Teramoto Norihiro, Yamashita Motohiro, Toyooka Shinichi, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. STAT3 expression in activating EGFR-driven adenocarcinoma of the lung. Lung Cancer. 75: 24-29, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.05.015

② Kammei Rai, Takigawa Nagio, Ito Sachio, Kashihara Hiromi, Ichihara Eiki, Yasuda Tatsuji, Shimizu Kenji, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. Liposomal delivery of MicroRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistance in lung cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics. 10: 1720-1727, 2011 査読有 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0220

[学会発表] (計5件)

① 二宮崇, 瀧川奈義夫, 村上斗司, 本多宣裕, 南大輔, 越智宣昭, 八杉昌幸, 久保寿夫, 市原英基, 谷本光音, 木浦勝行. エクソン19欠失EGFR遺伝子変異陽性肺癌モデルに対するアファチニブの効果. 第52回日本肺癌学会総会, 2011年11月4日, 大阪市

② Yasugi Masayuki, Takigawa Nagio, Ochi Nobuaki, Ichihara Eiki, Hisamoto Akiko, Hotta Katsuyuki, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. Effect of everolimus on lung tumorigenesis in transgenic mice carrying activating EGFR mutation. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋市

③ Ochi Nobuaki, Takigawa Nagio, Yasugi Masayuki, Ichihara Eiki, Hisamoto Akiko, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. ERK reactivation mediated by SRC in acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer with EGFR mutation. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋市

④ Kammei Rai, Takigawa Nagio, Ito Sachio, Kiura Katsuyuki, Yasuda Tatsuji, Shimizu Kenji, Tanimoto Mitsune. Multiple molecular targeting effects by miR-7 in EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung cancer xenograft models. 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2011年4月4日, Orlando, USA

⑤ Harada Daijiro, Takigawa Nagio, Ohashi Kadoaki, Ichihara Eiki, Kubo Toshio, Takeda Hiromasa, Kashihara Hiromi, Hotta Katsuyuki, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. JAK2/STAT3 induces erlotinib-resistance in lung cancer cells harboring EGFR-activating mutations. 102nd Annual Meeting of

American Association for Cancer Research, 2011年4月3日, Orlando, USA

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
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

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60325107

(2) 研究分担者

木浦 勝行 (KIURA KATSUYUKI)
岡山大学・大学病院・教授
研究者番号: 10243502

(3) 連携研究者

なし