

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 5 月 21 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591006

研究課題名（和文）シグナル情報解析を用いた肺癌分子標的治療感受性予測法の開発とイメージング

研究課題名（英文）Development of molecular predictive model for molecular targeted therapy in lung cancer using pathway analysis

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

研究成果の概要（和文）：非小細胞肺癌の標的治療の感受性モデルを構築するために、肺癌細胞株パネルの感受性データベースを作成し、関連および感受性関連遺伝子のマクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析などの結果と抗癌剤感受性との関係を解析し、この結果に、薬剤の分子標的のシグナル情報解析 (Pathway Architect software) を取り入れた。この解析により、HDAC 阻害薬感受性を識別する support vector machine algorithm model を構築した。加えて、HDAC 阻害薬に影響される因子を解析し、それを基に併用治療開発を行なった。HDAC 阻害薬と S-1 の治療は有望な治療と考えられる。

また、PKC 阻害薬について検討し、JAK/STAT signalling pathway が感受性に関わり、実際に JAK 阻害薬や、JAK 高発現細胞で機能的に、その関与が証明された。我々の研究結果は、JAK1 パスウェイが PKC 阻害剤の感受性予測に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To identify a molecular model of sensitivity to molecular target therapy in NSCLC, we conducted a gene expression profiling study using cDNA arrays on the same set of cell lines and related the cytotoxic activity to corresponding gene expression pattern using a modified National Cancer Institute program. In addition, pathway analysis was done with Pathway Architect software. We used the genes, which were identified by gene-drug sensitivity correlation and pathway analysis, to build a support vector machine algorithm model by which sensitive cell lines were distinguished from resistant cell lines. The gene classifier is useful in predicting drug sensitivity to HDAC inhibitors. In addition, we identified the genes influenced by HDAC inhibitor treatment and designed combination using these cross-talk. The designed combination therapy with SAHA and S-1 in lung cancer may be promising due to its potential to overcome S-1 resistance via modulation of 5-FU/S-1 sensitivity-associated biomarker (TS) by HDAC inhibitor.

We identified eight genes related PKC inhibitor by pathway analysis of molecules having gene-drug sensitivity correlation, and used them to build a support vector machine algorithm model by which sensitive cell lines were distinguished from resistant cell lines. Pathway analysis revealed that the JAK/STAT signalling pathway was one of the main ones involved in sensitivity to enzastaurin. Simultaneous administration of enzastaurin and JAK inhibitor inhibited enzastaurin-induced cell growth-inhibitory effect. Furthermore, lentiviral-mediated JAK1-overexpressing cells were more sensitive to enzastaurin than control cells. Our results suggested that the JAK1 pathway may be used as a single predictive biomarker for enzastaurin treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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、EGFR、VEGFR

1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本人における癌死亡原因の第一位である。これは、現在の治療限界を示しており、新しい抗癌剤治療、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法の開発が行われ期待されているが、このような限定された標的に対する治療法の役割が高まるにつれ、合理的な治療方法選択システムの確立が必要になる。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、治療法決定因子の知見が未だ不足している点、第二に、血液腫瘍、消化器腫瘍、乳腺腫瘍などと異なり、肺癌は、腫瘍組織の採取が難しい点である。第一の点に関し、近年開発された網羅的解析の種々の方法などを利用し多くの研究がなされてきた。しかし、**Epidermal growth factor receptor (EGFR)** のチロシンキナーゼ阻害剤のように、その標的因子に高頻度の遺伝子変異が存在するという幸運な状況を除き、再現性の問題などからコンセンサスの得られた研究は少ない。第二の点については、今後、腫瘍の標的分子状況をリアルタイムに把握すること困難さとなり、将来的に治療選択上の障害としてクローズアップされることが想定される。

2. 研究の目的

我々は、これらの点に焦点を当て、新しく臨床開発されつつある分子標的治療薬に対し、種々の網羅的解析方法を利用しながら、機能的な観点からの選択法を導入し、再現性のある確かな感受性関連因子を選択し感受性予測モデルを構築することと、リアルタイムな解析のため、膨大な網羅的解析情報を利用したバイオイメージングの実現を目指す視点での感受性予測因子選択を計画した。

3. 研究の方法

現在までに、肺癌細胞株を収集し、現在肺癌治療に頻用されている10薬剤および新しく開発されつつある分子標的薬2剤について、肺癌細胞株30株パネルの感受性データベースを作成し終えた。また、NCI60の為に開発されたソフトを関連企業で修飾し(**ElectorGene Finding, Genetic Lab社**)、この肺癌細胞株パネル解析に特化した解析体制を整えた。すでに、アフィンメトリックス社の**Genechip**、関連および感受性関連遺伝子のマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム、抗体アレイや**2D-DIGE**のプロテオーム解析の結果と抗癌剤感受性との関係を解析した。この結果に、薬剤の分子標的のシグナル情報解析(図1)を取り入れる事で、確実性の高い感受性予測因子を選択し、その因子による予測モデル(図2)を構築する試みを行っている。今後、この感受性予測パネルを用いたこの方法を応用し、前臨床や第I相試験の段階の薬剤に対象を拡げ、なされるべき臨床試験対象を明らかにしていく予定である。また、今回は、**cDNA array**、抗体アレイや**2D-DIGE**を用いる蛋白レベルの解析に加え、キナーゼアレイ解析を加えることで、現状以上に機能情報が得られる可能性が高いと考えている。今回の研究のもう一つの重要な視点は、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であるが、適切な因子の選択には、膜への局在や代謝産物であることなど、現在の技術では、多くの条件が存在する。多くの方向からの網羅的解析により条件を満たす因子が得られる。

4. 研究成果

肺癌における合理的治療選択システム構築のため、新しく臨床開発されつつある分子標的治療薬に対

し、種々の網羅的解析方法を利用しながら、機能的な観点からの選択法を導入し、再現性のある確かな感受性関連因子を選択した。この情報を用い、感受性予測モデルを構築することを試みている。肺癌細胞株30株パネルの感受性データベースを作成し、関連および感受性関連遺伝子のマクロアレイを用いたトランスクリプトーム、抗体アレイや2D-DIGEのプロテオーム解析、キナーゼ解析などの結果と抗癌剤感受性との関係を解析し、この結果に、薬剤の分子標的のシグナル情報解析を取り入れている。現在進めている分子標的治療薬は、HDAC阻害薬、PKC阻害薬、EGFR阻害薬、VEGF阻害薬である。HDAC阻害薬については、すでに、トランスクリプトームから多数の感受性予測因子候補を選択、これらの因子についてシグナル情報解析を行うことで、より確実性の高い感受性予測モデルを構築した。同時に、この薬剤暴露により変化する分子を用い、併用療法開発を行い報告している(Cancer Sci. 2010)。PKC阻害薬については、遺伝子発現解析から、8遺伝子発現を用いた薬剤感受性予測モデルを構築し、100%の精度での感受性予測を可能にした。JAKシグナル関連分子の過剰発現が予測因子の重要な候補として単離された(Br J Cancer. 2012)。EGFR阻害薬、VEGF阻害薬については、遺伝子発現の状況による個別化治療の限界はあるものの、レセプター発現のリアルタイムにin vivoスクリーニングは可能であることを示した。

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20件)

すべて査読あり

1.Oizumi S, Kobayashi K, Inoue A, Maemondo M, Sugawara S, Yoshizawa H, Isobe H, Harada M, Kinoshita I, Okinaga S, Kato T, Harada T, Gemma A, Saijo Y, Yokomizo Y, Morita S, Hagiwara K, Nukiwa T.

Quality of Life with Gefitinib in Patients with EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Quality of Life Analysis of North East Japan Study Group 002 Trial.Oncologist. 2012 May 11.

doi: 10.1634/theoncologist.2011-0426

2.Hayashi H, Saito Y, Kokuho N, Morimoto T, Kobayashi K, Tanaka T, Abe S, Fujita K, Azuma A, Gemma A.

Fatal Pneumonia Associated with Temozolomide Therapy in Patients with Malignant Glioma.

Jpn J Clin Oncol. 2012 Apr 23. [Epub ahead of print]

doi: 10.1093/jjco/hys058

3.Usuki J, Matsuda K, Azuma A, Kudoh S, Gemma A.

Sequential analysis of myofibroblast differentiation and transforming growth factor- β 1/Smad pathway activation in murine pulmonary fibrosis.

J Nihon Med Sch. 2012;79(1):46-59.

doi:10.1272/jnms.79.60

4.Shimokawa T, Seike M, Soeno C, Uesaka H, Miyanaga A, Mizutani H, Kitamura K, Minegishi Y, Noro R, Okano T, Yoshimura A, Gemma A.

Enzastaurin has anti-tumour effects in lung cancers with overexpressed JAK pathway molecules.Br J Cancer. 2012 Feb

28;106(5):867-75. Epub 2012 Feb 14.

doi: 10.1038/bjc.2012.7.

5.Mukai H, Ohyashiki K, Katoh T, Kusumoto M, Gemma A, Sakai H, Sugiyama Y, Hatake K, Fukuda Y, Kudoh S.

[Lung injury associated with bortezomib therapy in Japan].

Rinsho Ketsueki. 2011 Dec;52(12):1859-69.

6.Abe S, Hayashi H, Seo Y, Matsuda K, Kamio K, Saito Y, Usuki J, Azuma A, Kudo S, Gemma A.

Reduction in serum high mobility group box-1 level by polymyxin B-immobilized fiber column in patients with idiopathic pulmonary fibrosis with acute exacerbation.Blood Purif.

2011;32(4):310-6. doi: 10.1159/000330325.

Epub 2011 Sep 2.

doi: 10.1159/000330325

7.Satoh H, Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Saijo Y, Yoshizawa H, Hagiwara K, Nukiwa T.

Low-dose gefitinib treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer harboring sensitive epidermal growth factor receptor mutations.

J Thorac Oncol. 2011 Aug;6(8):1413-7.

doi: 10.1097/JTO.0b013e31821d43a8

8. Yoshii N, Suzuki T, Nagashima M, Kon A, Kakihata K, **Gemma A**. Clarification of clinical features of interstitial lung disease induced by irinotecan based on postmarketing surveillance data and spontaneous reports. *Anticancer Drugs*. 2011 Jul;22(6):563-8. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283473f28
9. Minegishi Y, Kuribayashi H, Kitamura K, Mizutani H, Kosaihiira S, Okano T, **Seike M**, Azuma A, Yoshimura A, Kudoh S, **Gemma A**. The feasibility study of Carboplatin plus Etoposide for advanced small cell lung cancer with idiopathic interstitial pneumonias. *J Thorac Oncol*. 2011 Apr;6(4):801-7. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182103d3c
10. Yamamoto N, Yamanaka T, Ichinose Y, Kubota K, Sakai H, **Gemma A**, Saijo N, Fukuoka M, Niitani H. Pooled analysis of S-1 trials in non-small cell lung cancer according to histological type. *Anticancer Res*. 2010 Jul;30(7):2985-90. Erratum in: *Anticancer Res*. 2010 Sep;30(9):3851.
11. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, **Gemma A**, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T; North-East Japan Study Group. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010 Jun 24;362(25):2380-8. doi: 10.1056/NEJMoa0909530
12. Minegishi Y, Sudoh J, Kuribayashi H, Mizutani H, **Seike M**, Azuma A, Yoshimura A, Kudoh S, **Gemma A**. The safety and efficacy of weekly paclitaxel in combination with carboplatin for advanced non-small cell lung cancer with idiopathic interstitial pneumonias. *Lung Cancer*. 2011 Jan;71(1):70-4. Epub 2010 May 20. doi:10.1016/j.lungcan.2010.04.014
13. Noro R, Miyanaga A, Minegishi Y, Okano T, **Seike M**, Soeno C, Kataoka K, Matsuda K, Yoshimura A, **Gemma A**. Histone deacetylase inhibitor enhances sensitivity of non-small-cell lung cancer cells to 5-FU/S-1 via down-regulation of thymidylate synthase expression and up-regulation of p21(waf1/cip1) expression. *Cancer Sci*. 2010 Jun;101(6):1424-30. Epub 2010 Mar 10. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01559.x
14. Abe S, Seo Y, Hayashi H, Matsuda K, Usuki J, Azuma A, Kudoh S, **Gemma A**. Neutrophil adsorption by polymyxin B-immobilized fiber column for acute exacerbation in patients with interstitial pneumonia: a pilot study. *Blood Purif*. 2010;29(4):321-6. Epub 2010 Feb 24. 33. doi: 10.1159/000287232
15. Takiguchi Y, Tada Y, **Gemma A**, Kudoh S, Hino M, Yoshimori K, Yoshimura A, Nagao K, Niitani H. Phase I/II study of docetaxel and S-1, an oral fluorinated pyrimidine, for untreated advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010 Jun;68(3):409-14. Epub 2009 Sep 8. doi:10.1016/j.lungcan.2009.08.009
16. Tanaka T, Matsuoka M, Sutani A, **Gemma A**, Maemondo M, Inoue A, Okinaga S, Nagashima M, Oizumi S, Uematsu K, Nagai Y, Moriyama G, Miyazawa H, Ikebuchi K, Morita S, Kobayashi K, Hagiwara K. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int J Cancer*. 2010 Feb 1;126(3):651-5. doi: 10.1002/ijc.24746
17. **Seike M**, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, **Gemma A**, Kudoh S, Croce CM, Harris CC. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 21;106(29):12085-90. doi:10.1073/pnas.0905234106
18. 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*. 2009;48(9):665-72. doi:10.2169/internalmedicine.48.1650
19. Isobe K, Kobayashi K, Kosaihiira S, Kurimoto F, Sakai H, Uchida Y, Nagai Y, Yamaguchi T, Miyanaga A, Ando M, Mori G, Hino M, **Gemma A**.

Phase II study of nimustine hydrochloride
(ACNU) plus paclitaxel for refractory small cell
lung cancer.
Lung Cancer. 2009 Dec;66(3):350-4. Epub 2009
Apr 1.
Doi:10.1016/j.lungcan.2009.03.003

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 弦間 昭彦

薬剤性間質性肺炎の管理
日本臨床腫瘍学会
2010年3月19日 東京

2. 清家正博

肺がん細胞の薬剤感受性に関するマイク
ロ RNA 発現プロファイル
第 69 回日本癌学会学術総会
2010年9月 大阪

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

清家正博 (SEIKE MASAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30366687

(3) 連携研究者

研究者番号：