

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15日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591831

研究課題名（和文） 肺癌における発癌過程の腫瘍不均一形成に関する因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of heterogeneity related g factors in carcinogenesis of lung cancer.

研究代表者

浦本 秀隆 (URAMOTO HIDETAKA)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90389445

研究成果の概要（和文）：肺癌の死亡数は今後、更に増加すると予測される。分子標的治療薬はある特定の母集団を選別して投与すれば、一定の効果があるが、完治することない。2次性のEGFR遺伝子変異が獲得耐性にある程度関与していることは解明されたが、耐性に関する遺伝子の発生の必然性やその biological effect は不明である。本研究では肺癌細胞株におけるEGFR発現安定株を作製した。今後、異なる変異株の共培養実験にて腫瘍増殖能の測定とEGFR-TKIに対する反応などを検討する。また heterogeneity のモデルとして腺扁平上皮癌のデータを検証した。さらにEGFR TKI 治療前後の検体を用いて獲得耐性の分子機序を報告し、T790Mの有無により生存期間が異なることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer has been the most common cancer in the world for several decades and the prognosis is currently unacceptable. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in lung adenocarcinoma are associated with a dramatic clinical response to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKI). However, patients often experience a relapse. However, the whole picture and biological significance regarding acquired resistance remains unclear. in this research. We planned the experiment to establish the visualization for the cancer cell transferred for GFR gene transiently and stably by using lung cancer cell lines, measurement for tumor growth potential by co-culture, and investigation of relationship between mix ratio and drug resistance to EGFR-TKI. We also examined the clinical feature of adenosquamous cell carcinoma as a representative model for heterogeneity of the tumor. Furtherer, our results showed that various alterations in gene or protein expression can account for all resistant mechanisms and this phenomenon suggests the existence of complicated relationships among acquired resistance-related genes. We also reported that T790M may thus be a useful marker for predicting a favorable prognosis in Japanese patients treated by an EGFR-TKI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：EGFR、lung cancer、heterogeneity

1. 研究開始当初の背景

肺癌の死亡数は悪性腫瘍の中で第1位で今後増加すると予測されている。現在行われている肺癌の治療とは集学的治療をもってしても治療成績は悪く難治性癌である。今日までの固形癌の進展においては成長因子および受容体遺伝子、細胞接着因子や、また細胞周期関連遺伝子、微小環境を解明することは重要とされてきた。中でもEGFRは肺癌において過剰発現し、予後不良因子となりうるために治療の標的とされ、EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI)が開発された。今日までにEGFR遺伝子変異の選別が直接肺癌患者の個別化医療に繋がることは明らかである (Uramoto H, et al. Epidermal growth factor receptor mutations are associated with gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer in Japanese. Lung Cancer. 51:71-7, 2006)。しかし、EGFR-TKIは一般にたとえ、当初奏効しても、ほぼ全症例で病態は進行する。近年、exon20の二次変異 T790M が獲得耐性に関与していることが報告された。また、T790M発生の必然性や腫瘍形成能における biological effect は不明である。したがって薬剤感受性と耐性の変異の相互関係における分子機構の解明を通して heterogeneity の成因に関する知見を広げたい。これらの知見は単に表裏一体の感受性や耐性機構を説明するだけでなく、次世代のEGFR-TKIの開発へと繋がると推測される。

2. 研究の目的

肺癌が難治である理由は癌の進行にした

がって genome を変化させ、結果として治療抵抗性となるからである。つまりいったん有効な薬剤であってもいずれ、ほぼ全症例で病態は進行する。いわゆる固形癌、特に原発性肺癌における heterogeneity の成因の解明こそが究極の治療法の breakthrough になると考え、その分子機構を解析することが新たな治療法の開発へと繋がるという着想に至った。したがって本研究は、肺癌について、EGFR 遺伝子変異を基軸として heterogeneity の成因に関わる因子を総合的に解析し、臨床応用に向けての基礎とすることと二つの component を同時に有し heterogeneity のモデルとなる腺扁平上皮癌の臨床的特徴を把握することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) In vitro の解析：

EGFR 可視化遺伝子導入細胞の確立とEGFR-TKIに対する薬剤抵抗性の獲得と混合比の関係の検討。

(2) 腺扁平上皮癌に関する解析：

肺腺扁平上皮癌は一般に予後不良と報告されているがその理由は不明である。【方法と対象】1994-2006年までに当科で手術(完全切除)を施行した肺癌779例中、肺腺扁平上皮癌(AdSq)11例(1.6%)を対象とした。

4. 研究成果

(1) 当科樹立肺癌細胞株 (Sugaya, et al. Chest, 122: 282-288, 2002) にて endogenous EGFR 遺伝子変異をまず検討した。Wild type: A110L, F1121L, H1224L, L619L, and L804L

であり、exon 19 deletion: B901L, L858R : : G603Lであった。EGFRの安定株発現および改変遺伝子作製のために Albany medical college の Sally Temple 博士から peGFP-N1-EGFR plasmid (Neuron 2005:45, 873-886)の供与を受けた。この plasmid が 293 cell に infection し、GFP を発することを蛍光顕微鏡で確認した。今後、EGFR expression を認めず(null) 遺伝子導入効率のよいと予想される株に EGFR 19 deletion もしくは L858R と EGFR 19deletion もしくは L858R+T790M の改変 plasmid DNA (or virus vector) を導入し、薬剤選択と limiting dilution にて stable clone を作成し、それぞれの共培養実験の腫瘍増殖能の測定と EGFR-TKI に対する薬剤抵抗性の獲得と混合比の関係の検討する予定である。

(2) 1994-2006 年までに当科で手術(完全切除)を施行した肺癌 779 例中、肺腺扁平上皮癌(AdSq) 11 例(1.6%)を対象とした。【結果】男性 5 例、女性 6 例、平均年齢 67.3 歳、病理病期は IA3, IB1, IIA1, IIIA5, IIB1 例、重複癌は 5 例(胃癌 2, 直腸癌 1, 前立腺癌 1, 膀胱癌 1 例)であった。平均観察期間は 45.4 ヶ月であり、11 例中 4 例は原病死。多発肺癌を除く解析にて AdSq は扁平上皮癌(Sq)に比べ男性が少なく(p=0.001)、腺癌(Ad)に比べ高齢(p=0.017)であり、病理病期は進行していた(p<0.0001)。Ad, Sq, AdSq それぞれの 5 生率は 71.4, 55.8, 50.6%であった。重複癌例を合併する比率は Ad, Sq, AdSq それぞれ 21.1, 17.6, 45.5%であり(Ad vs AdSq p=0.05, Sq vs AdSq p=0.003)、AdSq は有意に重複癌を合併した(AdSq vs non-AdSq p=0.03)。【考察】肺腺扁平上皮癌は multi-step gene abnormality が発症しやすい高齢者に多く、重複癌例を合併する傾向

にある。したがって病理学的に単に腺癌と扁平上皮癌の component を有するだけではなく特異的な発癌機構が関与する可能性がある。

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] (計 21 件)

- ① Nakagawa M, Uramoto H, Oka S, Chikaishi Y, Iwanami T, Shimokawa H, So T, Hanagiri T, Tanaka F: Clinical Significance of IGF1R Expression in Non-Small-Cell LungCancer. Clin Lung Cancer 13 : 136-142. 2012 査読有
DOI : 10.1016/j.clcc.2011.10.006
- ② Gu C, Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Iwanami T, Nakagawa M, Oyama T, Tanaka F: Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma byimmunohistochemical analysis. Anticancer Res 31 : 1141-1145. 2011 査読有
- ③ Hanagiri T, Sugaya M, Takenaka M, Oka S, Baba T, Shigematsu Y, Nagata Y, Shimokawa H, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K, Tanaka F: Preoperative CYFRA 21-1 and CEA as prognostic factors in patientswith stage I non-small cell lung cancer. Lung Cancer 74 : 112-117. 2011 査読有
DOI : 10.1016/j.lungcan.2011.02.001
- ④ Hanagiri T, Takenaka M, Oka S, Shigematsu Y, Nagata Y, Shimokawa H, Uramoto H, Yamada S, Tanaka F: Prognostic Significance of Lymphovascular Invasion for Patients

- with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. Eur Surg Res 47 : 211-217. 2011 査読有
DOI : 10.1159/000333367
- ⑤ Hofstetter G, Berger A, Chamson M, Muller-Holzner E, Reimer D, Ulmer H, Uramoto H, Marth C, G Zeimet A, Zeillinger R, Concin N: Clinical Relevance of TAp73 and ΔNp73 Protein Expression in Ovarian Cancer: A Series of 83 Cases and Review of the Literature. Int J Gynecol Pathol 30 : 527-531. 2011 査読有
DOI : 10.1097/PGP.0b013e31821ac519
- ⑥ Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T, Tanaka F: The expression of ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. Anticancer Res 31 : 4277-4282. 2011 査読有
DOI : 10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd
- ⑦ Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, Gu C, Hanagiri T, Oyama T, Yasumoto K: Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence. J Thorac Cardiovasc Surg 141 : 895-898. 2011 査読有
DOI : 10.1016/j.jtcvs.2010.09.044
- ⑧ Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, Iwata T, Nakagawa M, Ono K, Hanagiri T: TS expression predicts postoperative recurrence in adenocarcinoma of the lung. Lung Cancer 72 : 360-364. 2011 査読有
DOI : 10.1016/j.lungcan.2010.08.024
- ⑨ Shimokawa H, Uramoto H, Tanaka F: Comment on 'Pre-treatment levels of circulating free IGF-1 identify NSCLC patients who derive clinical benefit from figitumumab'. Br J Cancer 105 : 1465-1466. 2011 査読有
DOI : 10.1038/bjc.2011.412
- ⑩ Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Kuwano M, Ono M: Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. Lung Cancer 73 : 361-365. 2011 査読有
DOI : 10.1016/j.lungcan.2011.01.008
- ⑪ Uramoto H, Tanaka F: Natural air leak test without submergence for spontaneous pneumothorax. J Cardiothorac Surg 6 : 165-165. 2011 査読有
DOI : 10.1186/1749-8090-6-165
- ⑫ Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, Chundong G, Hanagiri T, Oyama T, Yasumoto K: Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence. J Thorac Cardiovasc Surg 141 : 895-898. 2011 査読有
DOI : 10.1016/j.jtcvs.2010.09.044
- ⑬ Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, Takenoyama M, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K: Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status. Lung Cancer 68 : 198-203. 2010 査読有
DOI : 10.1016/j.lungcan.2009.05.022
- ⑭ Onitsuka T, Uramoto H, Ono K, Takenoyama M, Hanagiri T, Oyama T,

- Izumi H, Kohno K, Yasumoto K:
Comprehensive Molecular analyses of lung adenocarcinoma with regard to the epidermal growth factor receptor, K-ras, MET, and hepatocyte growth factor status. *J Thorac Oncol* 5: 591-596. 2010 査読有
DOI : 10.1097/JTO.0b013e3181d0a4db
- ⑮ Uramoto H, So T, Nagata Y, Kuroda K, Shigematsu Y, Baba T, So T, Takenoyama M, Hanagiri T, Yasumoto K:
Correlation between HLA alleles and EGFR mutation in Japanese patients with adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 5 : 1136-1142. 2010 査読有
DOI : 10.1097/JTO.0b013e3181e0b993
- ⑯ Uramoto H, Yamada S, Hanagiri T:
Clinicopathological characteristics of resected adenosquamous cell carcinoma of the lung: risk of coexistent double cancer. *J Cardiothorac Surg* 29: 92-97. 2010 査読有
- ⑰ Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, Nakashima K, Kage M, Izumi H, Kohno K, Uramoto H, Yasumoto K, Kuwano M, Ono M: Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGFR in Gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Research* 70: 8715-25. 2010 査読有
DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-10-0043
- ⑱ Yamashita T, Uramoto H, Onitsuka T, Ono K, Baba T, So T, So T, Takenoyama M, Hanagiri T, Oyama T, Yasumoto K:
Association between lymphangiogenesis -/micrometastasis-and adhesion-related molecules in resected stage I NSCLC. *Lung Cancer* 70: 320-328. 2010 査読有
DOI : 10.1016/j.lungcan.2010.02.013
- ⑲ Uramoto H, Takenoyama M, Hanagiri T:
Simple prophylactic fixation for lung torsion. *Ann Thorac Surg* 90: 2028-2030. 2010 査読有
DOI:0.1016/j.athoracsur.2010.07.040
- ⑳ Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Hanagiri T: TS, DHFR and GARFT expression in non-squamous cell carcinoma of NSCLC and malignant pleural mesothelioma patients treated with pemetrexed. *Anticancer Res* 30: 4309-15. 2010 査読有
- ㉑ Nose N, Sugio K, Oyama T, Nozoe T, Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Yasumoto K: Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 27: 411-417. 2009 査読有
DOI : 10.1200/JCO.2008.18.3251
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 浦本秀隆, 中西良一, 菅谷将一, 内山明彦, 井上政昭, 岩田輝男, 海老規之, 花桐武志, 田中文啓 : 非小細胞肺癌完全切除に例に対するCBDCA+DTX術後補助化学療法の間報告(臨床第Ⅱ相試験) . 第 52 回日本肺癌学会総会 大阪国際会議場 大阪. 2011 年 11 月 3-4 日

- ② Uramoto H, Takenaka M, Yamashita T, Chikaishi Y, Oka S, Nakagawa M, Shimokawa H, Tanaka F : Association between lymphangiogenesis/micrometastasis and adhesion-related molecules in resected stage I NSCLC. 2011 ISMRC 大阪国際会議場 大阪. 2011年9月21-23日
- ③ 浦本秀隆, 栗田泰治, 馬場哲郎, 岡壮一, 重松義紀, 下川秀彦, 永田好香, 花桐武志, 田中文啓 : Video-assisted thoracoscopic pericardiectomy for malignant pericardial effusion. 第34回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 アクトシティ浜松 コンgressセンター 浜松. 2011年6月16-17日
- ④ 浦本秀隆, 栗田泰治, 岡壮一, 重松義紀, 馬場哲郎, 下川秀彦, 永田好香, 竹之山光広, 花桐武志, 田中文啓 : Simple prophylactic fixation for lung torsion. 第28回日本呼吸器外科学会総会 別府国際コンベンションセンター 別府. 2011年5月12-13日
- ⑤ 山本千鶴子, 馬崎雄二, 村上雄一, 河原明彦, 鹿毛政義, 浦本秀隆, 安元公正, 和泉弘人, 河野公俊, 桑野信彦, 小野眞弓 : ヒト非小細胞肺癌のゲフィチニブ耐性獲得におけるPTEN欠失とその制御メカニズム. 第69回日本癌学会学術総会 リーガロイヤルホテル 大阪. 2010年9月22-24日
- ⑥ Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Iwata T, Nakagawa M, Nagata Y, Shigematsu Y, Baba T, Ono K, Takenoyama M, Hanagiri T, Oyama T, Yasumoto K: Epithelial-mesenchymal transition status and EGFR mutation on

EGFR- TKI-resistant lung adenocarcinoma. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society 岐阜グランドホテル Gifu, Japan 2010年8月25-27日

- ⑦ 浦本秀隆, 鬼塚貴光, 重松義紀, 馬場哲郎, 宗 哲哉, 小野憲司, 宗 知子, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正: 肺腺癌手術、及びEGFR-TKI投与症例における感受性、耐性に関する分子の包括的解析と臨床的意義 第27回日本呼吸器外科学会総会 仙台国際センター 仙台 2010年5月13-14日
- ⑧ 浦本秀隆, 鬼塚貴光, 下川秀彦, 宗 哲哉, 小野憲司, 宗 知子, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正: Gefitinib耐性におけるT790M, MET, HGF status以外の分子の関与 第8回日本臨床腫瘍学会学術集会 東京ビックサイト 東京 2010年3月18-19日
- ⑨ 浦本秀隆, 鬼塚貴光, 馬場哲郎, 宗 哲哉, 宗 知子, 竹之山光広, 花桐武志, 小山倫浩, 安元公正: EGFR-TK1の獲得耐性. 第68回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 横浜. 2009年10月1-3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦本 秀隆 (URAMOTO HIDETAKA)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：90389445

(2) 研究分担者

重松 義紀 (SHIGEMATSU YOSHIKI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：10546469
安元 公正 (YASUMOTO KOSEI)
産業医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：30150452
(H21→H22：連携研究者)
小野 憲司 (ONO KENJI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：40369062
(H21→H23：連携研究者)