

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22501051

研究課題名(和文)喫煙者肺扁平上皮癌におけるメタロプロテアーゼによるEGFR TKI耐性機構の検討

研究課題名(英文)The role of ADAM17 in squamous cell lung cancer

研究代表者

白井 崇生 (Sirai, Takao)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：90384362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙との関係が強い扁平上皮肺癌において、EGFRタンパク質の発現は、腺癌よりも多い。EGFRを分子標的とした治療は、分子標的の多い扁平上皮癌により有効であることが期待される。しかし、EGFRを標的とした抗体やEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の扁平上皮癌への効果率は、腺癌よりも不良である。EGFR遺伝子変異の検出頻度も低い。しかし、現時点で、「なぜ標的分子の多い扁平上皮癌にEGFRを標的とした治療が効果しないのか」を説明し得る確証はない。そこで、「炎症性サイトカインによるEGFRの発現の上昇と活性化が、肺扁平上皮癌の発症や治療抵抗性に関与している」との仮説を立て、新たな治療戦略の確立を検討した。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpression and aberrant activation are frequently identified in non small cell lung carcinoma (NSCLC). Although EGFR-targeted therapies (i.e.: EGFR-TKIs, and anti-EGFR antibody) are used, the prognosis of NSCLC remains poor. ADAM17 induces activation of EGFR through EGF-like ligand cleavage. We hypothesized that the inflammatory cytokines and EGF-like ligands might up-regulate the expression of EGFR via ADAM17, leading to the resistance to EGFR-TKIs in squamous cell carcinoma of lung. These findings promisingly indicate additional therapeutic strategies and the understanding of tumorigenesis for NSCLC.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：喫煙者肺癌 扁平上皮肺癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 喫煙との因果関係が強い肺癌の組織型は、扁平上皮癌がある。EGFR のタンパク質レベルでの発現は、組織学的には腺癌よりも扁平上皮癌に多いことが報告されており、EGFR を分子標的とした治療は、分子標的の多い扁平上皮癌により有効であることが期待される (Semin Oncol 2002. 29:3)。しかしながら、EGFR を分子標的とした抗体である cetuximab の扁平上皮癌への効奏率は、抗癌剤治療との併用下で、生存期間中央値で 10.2 ヶ月であり、腺癌の 12 ヶ月よりも不良である (Lancet 2009. 373:1525)。さらに、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine Kinase Inhibitor: TKI) である Erlotinib と Gefitinib の効奏率は、扁平上皮癌では、それぞれ 4.1% と 4.8% であり、腺癌の 13.9% と 11.9% よりも明らかに不良である (N Engl J Med 2005. 14:353, Lancet 2005. 366:1527)。EGFR 遺伝子変異の検出頻度も低く、EGFR TKI の効果が期待し難い癌腫である。しかしながら、現時点で、「なぜ標的分子の多い扁平上皮癌に EGFR を標的とした治療が効奏しないのか」を説明し得る確証はない。

(2) 2003 年に Lemjabbar らは、タバコの煙が ADAM17 (tumor necrosis factor alpha-converting enzyme: TACE) によるリガンド (Amphiregulin) 切断を誘導し、その結果、EGFR を活性化し細胞に増殖作用を及ぼすことを報告した (J Biol Chem 2003. 278:26202)。更に、2006 年に Zhou らは、肺癌患者の切除標本で、癌の部位と正常の部位との比較で、癌の部位に ADAM17 の発現が多いことを報告し、ADAM 活性を抑制することにより、抗腫瘍効果を及ぼすこと、また、EGFR-TKI との相乗的効果も期待できることを証明した (Cancer Cell 2006. 10:39)。我々も、2005 年に EGFR-TKI である Gefitinib の獲得耐性細胞を肺癌細胞株 PC-9 で樹立し、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF) による EGFR のトランス活性化について検討し、トランス活性化の減少した獲得耐性細胞は、TNF により強いアポトーシス誘導作用を有することを証明した (Clin Cancer Res 2005. 11:8872)。また、分担研究者である Yamaoka らは、TNF は、細胞内シグナル伝達因子である Src を介して EGFR をリン酸化し、抗アポトーシス作用を上皮細胞に及ぼすことを報告している。 (Proc Natl Acad Sci US A 2008. 105:11772)。

2. 研究の目的

喫煙者で EGFR 発現の多い肺扁平上皮癌は、ADAM17 活性を介して EGFR を始めとする ErbB 受容体ファミリーのリガンド切断をすることにより ErbB 受容体を恒常的に活性化し、EGFR-TKI 耐性あるいは他の抗癌剤耐性をもたらしているのではないかと仮説を立て、今後の研究支援期間を通じて基礎と臨床の両面より立証を試みる。

3. 研究の方法

喫煙者で EGFR 発現の多い肺扁平上皮癌は、ADAM17 活性を介して EGFR を始めとする ErbB 受容体ファミリーのリガンド切断をすることにより ErbB 受容体を恒常的に活性化し、発がんや EGFR-TKI 耐性あるいは他の抗癌剤耐性をもたらしているのではないかと仮説を立て、今後の研究支援期間を通じて基礎と臨床の両面より立証を試みる。

4. 研究成果

(1) 細胞株を用いた基礎分野の研究。

① 肺癌細胞株における炎症性サイトカイン TNF による EGFR トランス活性化の確認。

肺腺がん細胞株である NCI-H292 細胞は、炎症性サイトカインである TNF の接触により、EGFR の活性化を受ける事をウェスタンブロット法で確認した。この TNF による EGFR のトランス活性化は、TNF 接触後約 15 分でも強くなり、さらに、TNF の濃度依存的に強くなる事が、確認された。

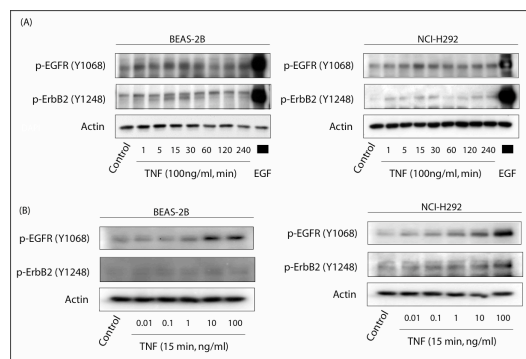
② TNF による EGFR トランス活性化は ADAM17 阻害剤で抑制される。ADAM17 阻害剤である TAPI-1 の接触で TNF による EGFR のトランス活性化は抑制された。この事は、TNF 誘導性の EGFR トランス活性化が、ADAM17 (TACE) を介した EGFR のリガンドの切断により生じている可能性がある事が示唆された。

③ ADAM17 阻害剤による EGFR トランス活性化の阻害により NCI-H292 細胞に TNF 誘導性アポトーシスが有意に誘導された。

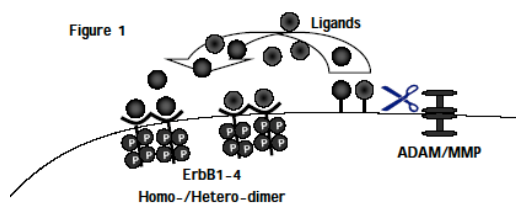
TNF 誘導性の細胞死：アポトーシスを確認するために TUNEL 法を用いた。NCI-H292 細胞は、TNF 接触により EGFR のトランス活性化を受ける。この EGFR のトランス活性化を ADAM17 阻害剤が抑制する事により、TNF 誘導性のアポトーシスが促進される事を確認した。この事象は、EGFR のトランス活性化が、炎症性サイトカインである TNF による細胞障害から細胞を保護する効果のある事を示唆している。

④ TNF による EGFR トランス活性化の機序において TNF が切断する EGFR のリガンドの同定。

TNF による EGFR トランス活性化に寄与する EGFR のリガンドを同定する目的で、EGFR リガンドの各種中和抗体を接触し、EGFR トランス活性化が阻害されるかを、ウェスタンブロット法で確認した。EGFR のリガンドは、Amphiregulin (AR), EGF, TGF- α ,



beta-cellulin (BT), HB-EGF, epiregulin (EP)の6種類が同定されている。それぞれの中和抗体を接触した結果、AR, TGF- α , HB-EGF で、EGFR トランス活性化が抑制された。この結果より、ADAM17 により切断される EGFR リガンドは、AR, TGF- α , HB-EGF で



ある事が示唆された。下記にこの、機序の参照図を示す。

(2) 肺癌患者検体を用いた臨床分野の研究。
① 肺癌組織検体における ADAM17, EGFR, Notch1 の発現の検討。

肺癌組織検体を -80°C に保存し、蛋白質を抽出し、ウェスタンブロット法で発現の検討を行う。

② 肺癌組織検体における EGFR のリガンド発現量の検討。

肺癌組織検体を -80°C に保存し、蛋白質を抽出し、ELISA 法で発現量の検討を行う。

③ 上記①と②に付いて、肺扁平上皮癌患者と肺腺癌患者を比較し検討する。

④ 患者情報の解析。

上記①と②、および肺癌組織型における生存の検討を患者情報から施行する。

以上の、臨床分野の検討は、患者検体を集積し、さらに、予後解析を施行する目的で現在も機関承認の上、臨床試験(昭和大学医学部医の倫理委員会承認番号 1086 号)を継続中である。今後、集積結果を含め、論文として報告する。

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 10 件)

① Okuda K, Hirose T, Oki Y, Murata Y, Kusumoto S, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Ohnishi T, Ohmori T. Evaluation of the safety and efficacy of combination chemotherapy with vinorelbine and platinum agents for patients with non-small cell lung cancer with interstitial lung disease. *Anticancer Res.* 査読有、2012 Dec;32(12):5475-80. <http://ar.iiajournals.org/content/32/12/5475.long>

② Hirose T, Murata Y, Oki Y, Sugiyama T, Kusumoto S, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohnishi T, Ohmori T. Relationship of circulating tumor cells to the

effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res.* 査読有、2012;20(2-3):131-7.

③ 白井 崇生, 廣瀬 敬, 村田 泰規, 大木康成, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 石田博雄, 中嶋 賢尚, 大西 司, 山岡 利光, 大森 亨, 奥田 健太郎. 進行再発非小細胞肺癌に対するセカンドライン化学療法の検討. *昭和医学会雑誌.* 査読有、72 巻 4 号 Page446-452(2012.08)

④ Kishida Y, Hirose T, Shirai T, Sugiyama T, Kusumoto S, Yamaoka T, Okuda K, Adachi M, Nakamura A. Myelosuppression induced by concurrent chemoradiotherapy as a prognostic factor for patients with locally advanced non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 査読有、2011 Sep 1;2(5):949-955.

⑤ Murata Y, Hirose T, Yamaoka T, Shirai T, Okuda K, Sugiyama T, Kusumoto S, Nakashima M, Ohmori T, Adachi M. Phase II trial of the combination of carboplatin and irinotecan in elderly patients with small-cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 査読有、2011 Jun;47(9):1336-42. doi:10.1016/j.ejca.2011.03.007.

⑥ Hirose T, Nakashima M, Shirai T, Kusumoto S, Sugiyama T, Yamaoka T, Okuda K, Ohnishi T, Ohmori T, Adachi M. Phase II trial of amrubicin and carboplatin in patients with sensitive or refractory relapsed small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 査読有、2011 Sep;73(3):345-50. doi:10.1016/j.lungcan.2010.12.015.

⑦ Oki Y, Hirose T, Yamaoka T, Kusumoto S, Shirai T, Sugiyama T, Okuda K, Nakashima M, Murata Y, Ohmori T, Adachi M. Phase II study of S-1, a novel oral fluoropyrimidine, and biweekly administration of docetaxel for previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 査読有、2011 Apr;67(4):791-7. doi:10.1007/s00280-010-1382-1.

⑧ Hirose T, Okuda K, Yamaoka T, Ishida K, Kusumoto S, Sugiyama T, Shirai T, Ohnishi T, Ohmori T, Adachi M. Are levels of pro-gastrin-releasing peptide or neuron-specific enolase at relapse prognostic factors after relapse in patients with small-cell lung cancer? *Lung Cancer.* 査読有、2011Feb;71(2):224-8. doi:10.1016/j.lungcan.2010.05.004.

⑨ 塩沢 英輔, 大井 正也, 廣田 真規, 白井 崇生, 前田 朱美, 矢持 淑子, 瀧本

雅文, 太田 秀一. 急速に進展し心タンポナーデを起こした心外膜原発多形型悪性線維性組織球腫/未分化多形細胞肉腫 Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma/Undifferentiated highgrade pleomorphic sarcoma の1 剖検例. 診断病理、査読有、(1345-6431)28 巻4号 Page247-253(2011.10)

⑩ Sugiyama T, Hirose T, Kusumoto S, Shirai T, Yamaoka T, Okuda K, Ohnishi T, Ohmori T, Adachi M. The UGT1A1*28 genotype and the toxicity of low-dose irinotecan in patients with advanced lung cancer. Oncol Res. 査読有、2010;18(7):337-42.

[学会発表] (計 10 件)

① 白井 崇生, 廣瀬 敬, 村田 泰規, 大木 康成, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 石田 博雄, 中畠 賢尚, 山岡 利光, 奥田 健太郎, 大西 司, 大森 亨, 相良 博典. 小細胞肺癌患者における末梢血中がん細胞数と予後の検討. 日本肺癌学会. 2013 年 11 月 21 日. 東京

② 大木 康成, 廣瀬 敬, 白井 崇生, 村田 泰規, 杉山 智英, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 中畠 賢尚, 山岡 利光, 奥田 健太郎, 大西 司, 大森 亨, 相良 博典. 非小細胞肺癌におけるエルロチニブとゾレドロン酸併用療法の有用性に関する後方視的解析. 日本肺癌学会. 2013 年 11 月 21 日. 東京

③ 廣瀬 敬, 白井 崇生, 杉山 智英, 村田 泰則, 大木 康成, 楠本 壮二郎, 中畠 賢尚, 奥田 健太郎, 田村 厚久, 大田 健. 再発あるいは前治療無効小細胞肺癌に対する topotecan、carboplatin 併用第 II 相試験. 日本癌治療学会学術集会. 2013 年 10 月 24 日. 京都

④ 廣瀬 敬, 野田 秀裕, 奥田 健太郎, 阿部 誠治, 大戸 祐治, 杉山 智英, 石田 博雄, 白井 崇生, 中畠 賢尚, 山岡 利光, 大森 亨, 吉田 浩二, 中村 祐輔. 標準治療不応進行非小細胞肺癌に対するペプチドワクチン療法(Cancer vaccination trial with novel multiple peptides in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)). 日本癌学会. 2012 年 9 月 19 日. 札幌

⑤ 山岡 利光, 大木 康成, 村田 泰規, 杉山 智英, 石田 博雄, 白井 崇生, 中畠 賢尚, 奥田 健太郎, 大西 司, 廣瀬 敬, 大森 亨. SPC/TNF トランスジェニックマウスモデルにおける EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による肺組織のアポトーシス誘導機構の検討. 日本呼吸器学会学術集会. 2012 年 4 月 19 日. 東京

⑥ 大木 康成, 村田 泰規, 杉山 智英, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 白井 崇生, 中畠 賢尚, 山岡 利光, 奥田 健太郎, 大

西 司, 大森 亨, 廣瀬 敬. EGFR 遺伝子変異陽性の肺腺癌患者に対する、ゲフィチニブとゾレドロン酸併用療法の有用性に関する後方視的解析. 日本呼吸器学会学術集会. 2012 年 4 月 19 日. 東京

⑦ 白井 崇生, 廣瀬 敬, 大木 康成, 村田 泰規, 杉山 智英, 石田 博雄, 中畠 賢尚, 大西 司, 氷室 直哉, 富田 由里, 廣野 素子, 片岡 大輔, 野中 誠, 門倉 光隆. 手術を回避した高齢者気胸の検討. 日本呼吸器学会学術集会. 2012 年 4 月 19 日. 東京

⑧ 白井 崇生, 廣瀬 敬, 大木 康成, 村田 泰規, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 石田 博雄, 中畠 賢尚, 奥田 健太郎, 大西 司, 足立 満, 山岡 利光, 大森 亨. Carboplatin+Paclitaxel+Bevacizumab による化学療法中に III 度房室ブロックをきたした肺腺癌症例. 日本肺癌学会. 2012 年 11 月 8 日. 岡山

⑨ 白井 崇生, 廣瀬 敬, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 中畠 賢尚, 山岡 利光, 奥田 健太郎, 大西 司, 大森 亨, 足立 満. 進行非小細胞肺癌の生存期間が延長しているのはなぜか? 日本肺癌学会. 2010 年 11 月 12 日. 東京

⑩ 山岡 利光, 大木 康成, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 白井 崇生, 中畠 賢尚, 奥田 健太郎, 廣瀬 敬, 大森 亨, 大西 司, 足立 満. 気道上皮細胞と非小細胞肺癌細胞における TACE/EGFR-リガンドを介した TNF による EGFR のトランス活性化の機序検討(TNF transactivates phospho-tyrosine 1068 of EGFR through TACE/EGFR-ligand dependent mechanism). 日本癌学会. 2011 年 10 月 3 日. 名古屋.

[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

白井 崇生 (SHIRAI Takao)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：90384362

(2)研究分担者

山岡 利光 (YAMAOKA Toshimitsu)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号：40384359

大森 亨 (OHMORI Tohru)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・准教授

研究者番号：10276529

廣瀬 敬 (HORISE Takashi)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：40307038

門倉 光隆 (KADOKURA Mitsutaka)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：60214417

足立 満 (ADACHI Mitsuru)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：10095870