

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590850

研究課題名（和文） 上皮成長因子受容体下流シグナル系の個人差についての検索

研究課題名（英文） Analysis of individual difference of an epidermal growth factor receptor downstream signal system

研究代表者 塚田 恵美子（SAKAIDA EMIKO）

千葉大学 医学部附属病院 助教

研究者番号：60422218

研究成果の概要（和文）：EGFR-TKIのひとつであるエルロチニブの感受性を決定するEGFR遺伝子変異以外の要因を明らかとし、同時に腫瘍の悪性形質におけるEGFRの下流シグナル系の役割を検討し、同経路の遺伝的個人差の存在の有無を検討とすることを目的とした。野生型EGFR遺伝子をもつ非小細胞肺癌症例を対象に、エルロチニブを投与する臨床試験を行い、cDNAマイクロアレイ、RT-PCRによるバイオマーカー検索を行った。非小細胞肺癌細胞株、中皮腫細胞株を用いてEGFR下流シグナル系、薬剤相互作用、耐性機構のための基礎的検討を行った。Thymidylate synthaseの発現に注目して解析を加えたが、中皮腫細胞株においてはpemetrexed耐性機構に関連はなく、非小細胞肺癌細胞株においては、メトホルミンによる制癌効果を認める結果を得、特に腫瘍形成初期における制癌効果が高いことを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose is to examine the role of a downstream signal system of EGFR in detail for clarifying factors other than the EGFR gene variation which determines the susceptibility of the medicine, and considering existence of the hereditary individual difference of the course. We planned clinical trial which prescribes erlotinib for the patient as second line treatment for a non-small-cell-lung-cancer case with a wild type EGFR gene, and performing biomarker search by a cDNA microarray and RT-PCR. It checked that RNA extraction of the high purity of a tumor was possible from the minute biopsy sample of puncture under the ultrasound endoscopy (EBUS), and established the method of conducting DNA microarray analysis efficiently from a clinical sample. Furthermore, fundamental study was performed using the non-small-cell-lung-cancer-cells and mesothelioma-cells stock for the purpose of clarifying biological significance relevant to the effect of Erlotinib. Thymidylate synthase expression did not necessarily correlate with pemetrexed resistance. Metformin inhibited the proliferation of various histological types of human lung cancer cell lines, possibly by varied mechanisms including apoptosis induction and G0/G1 arrest according to the cell line.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

EGFR-TKI は、EGFR のリン酸化を特異的に阻害する薬剤であり、日本ではエルロチニブとゲフィチニブが臨床使用され、非小細胞肺癌に対する臨床的有用性が証明されているこれまでにEGFR-TKI により特異的に高い腫瘍縮小効果を示す集団（女性・腺癌・非喫煙者・アジア人）が存在することが報告されている。ゲフィチニブに関しては、EGFR 遺伝子変異を有する症例においては高い有効性を示す一方で、認めない症例においては生存期間の延長をもたらさず、その臨床的有用性はほとんど否定的である。これに対し、エルロチニブに関して状況はやや複雑である。腫瘍縮小効果については、EGFR 遺伝子変異を有する腫瘍においては70%程度の奏効率を示すものの、変異陰性例における奏効率はわずかに3.3%であり、状況はゲフィチニブと同様といえる。しかし、奏効例にSD (stable disease) 例を加えた病勢制御率は63.3%と比較的良好であり、セカンドライン治療として用いた大規模なBR.10 試験では、主目的である全症例においてプラセボに比べてエルロチニブによる全生存期間の延長を示しただけでなく、そのサブセット解析では、EGFR 遺伝子変異の頻度が低いとされる、扁平上皮癌症例、男性+喫煙+扁平上皮癌症例においてもエルロチニブによる全生存期間の延長が示された。これ以外に

も、EGFR 変異陰性例におけるエルロチニブによる生存期間の延長はSATURN 試験による無作為化試験により、また前向き試験のTRUST 試験、後ろ向き研究によってもその良好な生存期間が再現性をもって示されている。これらの知見は、エルロチニブにおいては、EGFR 変異陰性例においても、病勢制御効果を示し、その結果として生存期間の延長をもたらしている可能性を示唆するものである。この理由としては、現在臨床使用されている薬剤用量においては、ゲフィチニブに比べエルロチニブのほうが生物学的効果として高く設定されていること、これら2剤の作用機序に差異が存在する可能性などが考えられている。一方、EGFR-TKI を使用した患者の予後と、副作用としての皮膚病変の強さに正の相関があることが報告されている。皮膚の上皮細胞にもEGFR 遺伝子が発現していることが皮膚障害の発生机序と考えられるが、正常皮膚細胞のEGFR 遺伝子はすべて野生型のはずであり、EGFR-TKI の抗腫瘍効果がEGFR 遺伝子変異の有無のみに規定されるとしたら、予後と皮膚病変の強さが相関することは説明できない。さらにEGFR に対する単クローン性抗体薬であるセツキシマブの有効性（大腸癌、頭頸部癌、非小細胞肺癌で示されている）はEGFR 遺伝子変異に影響されないものの、やはり皮膚障害と

強い正相関があることが示されている。以上のことから、EGFR-TKI のうち、少なくともエルロチニブに関しては、EGFR 遺伝子変異以外の効果予測因子が存在し、しかも皮膚病変との関連から推測すると、この効果予測因子は、必ずしも腫瘍細胞特異的でなく、従って個人の遺伝的多型に基づくものである可能性が示唆された。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌症例における、上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害薬

(EGFR-TKI) の感受性にはEGFR 遺伝子の特定の突然変異が重要な予測因子となることが知られているが、EGFR-TKI のひとつであるエルロチニブの感受性を決定するEGFR 遺伝子変異以外の要因を明らかにすることにより、腫瘍の悪性形質におけるEGFR の下流シグナル系の役割をより詳細に明らかにすると同時に、同経路の遺伝的個人差の存在の有無を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型EGFR 遺伝子をもつ非小細胞肺癌症例を対象に、セカンドライン治療としてエルロチニブを投与する臨床試験を行い、cDNA マイクロアレイ、RT-PCR によるバイオマーカーの検索を行った。臨床試験で得られた知見をもとに、培養細胞 (野生型EGFR 遺伝子をもつ非小細胞肺癌株、および正常線維芽細胞) における生物学的validation 試験を行い、EGFR およびその下流シグナルとの関連を解析した。さらにエルロチニブの効果に関連する生物学的意義を明らかにすることを目的とし、非小細胞肺癌細胞株を用いてEGFR下流シグナル系の基礎的検討を行った。いずれも、得られた結果、臨床経過・治療効果について解析を行った。

4. 研究成果

承認を得た臨床試験を遂行し症例を集積し、主要評価項目として治療開始8週目における

病勢制御率、副次的評価項目としてwaterfall plot 解析、奏効率、生存期間 (PFS、OS)、副作用、バイオマーカーの検索を行った。基礎的研究として超音波内視鏡下 (EBUS) 穿刺の微小生検検体から腫瘍の高純度のRNA採取可能であることを確認し、臨床検体から効率よくDNA microarray解析を行う方法を確立した。さらにエルロチニブの効果に関連する生物学的意義を明らかにすることを目的とし、非小細胞肺癌細胞株、中皮腫細胞株を用いてEGFR下流シグナル系、薬剤相互作用、耐性機構のための基礎的検討を行った。Thymidylate synthaseの発現に注目して解析を加えたが、中皮腫細胞株においてはpemetrexed耐性機構に関連はなく、非小細胞肺癌細胞株においては、メトホルミンによる制癌効果を認める結果を得、特に腫瘍形成初期における制癌効果が高いことを明らかとした。

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 17 件)

1. Ashinuma H, Takiguchi Y, Sakaida E, Sekine I *et al*: **Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines.** *Oncology Reports* 2012, **28**(1):8-14.
DOI: 10.3892/or.2012.1763
2. Kitazono-Saitoh M, Takiguchi Y, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N *et al*: **Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines.** *Oncology Reports* 2012, **28**(1):33-40.
DOI: 10.3892/or.2012.1799
3. Sakairi Y, Saegusa F, Takiguchi Y, Tatsumi K, Yoshino I, *et al*:

- Evaluation of a learning system for endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Respiratory Investigation* 2012, **50**(2):46-53.
4. Kitamura A, Takiguchi Y, Kurosu K, Tanabe N, Nakatani Y, Yoshino I *et al*. **Feasibility of cytological diagnosis of sarcoidosis with endobronchial US-guided transbronchial aspiration. Sarcoidosis, Vasculitis, And Diffuse Lung Diseases: Official Journal Of WASOG / World Association Of Sarcoidosis And Other Granulomatous Disorders** 2012, **29**(2):82-89.
 5. Anzai M, Kenmochi T, Takiguchi Y, Matsumura C, Kanemoto K, *et al*: **A case report of mediastinal seminoma arising after renal transplantation. CEN Case Rep** 2012, **1**:90-95.
 6. Li Q, Kawamura K, Yamanaka M, Fukamachi T, Kobayashi H, Tada Y, Takiguchi Y *et al*: **Upregulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. Cancer Gene Therapy** 2012, **19**(3):218-228.
DOI: 10.1038/cgt.2011.86
 7. Nagakawa H, Shimozato O, Tada Y, Takiguchi Y, Tatsumi K *et al*: **Expression of a murine homolog of apoptosis-inducing human IL-24/MDA-7 in murine tumors fails to induce apoptosis or produce anti-tumor effects. Cellular Immunology** 2012, **275**(1-2):90-97.
DOI: 10.1016/j.resinv.2012.04.002
 8. Shigeta A, Tada Y, Wang J-Y, Kasahara Y, Iesato K, Tanabe N, Takiguchi Y *et al*: **CD40 amplifies Fas-mediated apoptosis: a mechanism contributing to emphysema. American Journal Of Physiology Lung Cellular And Molecular Physiology** 2012, **303**(2):L141-L151.
DOI: 10.1152/ajplung.00337.2011
 9. Iwasawa S, Yamano Y, Takiguchi Y, Tanzawa H, Tatsumi K, Uzawa K: **Upregulation of thioredoxin reductase 1 in human oral squamous cell carcinoma. Oncology Reports** 2011, **25**(3):637-644.
DOI: 10.3892/or.2010.1131
 10. Kitamura A, Matsushita K, Takiguchi Y, Shimada H, Tada Y, , Matsubara H *et al*: **Synergistic effect of non-transmissible Sendai virus vector encoding the c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor plus cisplatin in the treatment of malignant pleural mesothelioma. Cancer Science** 2011, **102**(7):1366-1373.
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.01931.x
 11. Nagayoshi M, Tada Y, West J, Tanabe N, Takiguchi Y, Yasuda T *et al*: **Inhalation of *Stachybotrys chartarum* Evokes Pulmonary Arterial Remodeling in Mice,**

- Attenuated by Rho-Kinase Inhibitor. *Mycopathologia* 2011, 172(1):5-15.
12. Saitoh M, Niijima M, Takiguchi Y, Hiroshima K, Tatsumi K: **An early event of EGFR mutation in pleomorphic carcinoma of the lung.** *International Journal Of Clinical Oncology / Japan Society Of Clinical Oncology* 2011, 16(6):770-773.
 13. Suzuki H, Sekine Y, Mizuno S, Takiguchi Y et al: **Risk of acute exacerbation of interstitial pneumonia after pulmonary resection for lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis based on preoperative high-resolution computed tomography.** *Surgery Today* 2011, 41(7):914-921.
 14. Takiguchi Y: **Pushing an old issue towards a new front line.** *Japanese Journal Of Clinical Oncology* 2011, 41(8):935-936.
 15. Takiguchi Y, Seto T, Ichinose Y, , Minato K, Seki N, Eguchi K, Kishi K *et al*: **Long-term administration of second-line chemotherapy with S-1 and gemcitabine for platinum-resistant non-small cell lung cancer: a phase II study.** *Journal Of Thoracic Oncology: Official Publication Of The International Association For The Study Of Lung Cancer* 2011, 6(1):156-160.
 16. Kobayashi H, Uno T, Isobe K, Ueno N, Watanabe M, Harada R, Takiguchi Y, Tatsumi K, Ito H: **Radiation pneumonitis following twice-daily radiotherapy with concurrent carboplatin and paclitaxel in patients with stage III non-small-cell lung cancer.** *Jpn J Clin Oncol* 2010, 40(5):464-469.
DOI:10.1093/jjco/hyp190
 17. Seto T, Yamanaka T, Wasada I, Seki N, Okamoto H, Ogura T, Shibuya M, Takiguchi Y, Shinkai T, Masuda N *et al*: **Phase I/II trial of gemcitabine plus oral TS-1 in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: Thoracic oncology research group study 0502.** *Lung Cancer* 2010.
DOI:10.1016/j.lungcan.2009.10.017
- [学会発表] (計 3 件)
1. Miyako Kitazono, Yuichi Takiguchi, Satoru Kitazono, Hironori Ashinuma, Atsushi Kitamura, Yuji Tada, Katsushi Kurosu, Emiko Sakaida, Ikuo Sekine, Nobuhiro Tanabe, Masatoshi Tagawa, Koichiro Tatsumi. Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines. American Association for Cancer Research 2012 Annual Meeting. Chicago, IL. USA March 31- April 4, 2012
 2. Hironori Ashinuma, Yuichi Takiguchi, Satoru Kitazono, Miyako Kitazono-Saitoh, Atsushi Kitamura, Yuji Tada, Katsushi Kurosu, Emiko Sakaida, Ikuo Sekine, Nobuhiro

Tanabe, Koichiro Tatsumi.

Anti-proliferative action of metformin on various types of human lung cancer cell lines. American Association for Cancer Research 2012 Annual Meeting. Chicago, IL. USA March 31- April 4, 2012

3. Satoru Kitazono, Yuichi Takiguchi, Hironori Ashinuma, Miyako Kitazono, Atsushi Kitamura, Yuji Tada, Katsushi Kurosu, Emiko Sakaida, Ikuo Sekine, Koichiro Tatsumi. Effects of metformin on a non-small cell lung cancer cell line with an EGFR mutation. American Association for Cancer Research 2012 Annual Meeting. Chicago, IL. USA March 31- April 4, 2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 堺田 恵美子 (SAKAIDA EMIKO)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60422218

(2) 研究分担者 瀧口 裕一 (TAKIGUCHI YUICHI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30272321

(3) 連携研究者
多田 裕司 (TADA YUJI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50344990

黒須 克志 (KUROSU KATSUSHI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20291106

田邊 信宏 (TANABE NOBUHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：40292700

巽 浩一郎 (TATSUMI KOICHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10207061