

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 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659163

研究課題名（和文） 分子標的薬暴露癌細胞の中長期生存分子機構の解明と新規癌関連遺伝子同定への応用

研究課題名（英文） Investigation of the molecular mechanisms that are involved in the survival of cancer cells in the presence molecular targeting drugs, and its implication for the development of novel drugs for cancer therapy.

研究代表者

萩原 弘一（HAGIWARA KOICHI）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240705

研究成果の概要（和文）：

EGFR 阻害剤，ALK 阻害剤は遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に著効するが，K-ras 阻害剤は無効である。各阻害剤の効果の違い・耐性のメカニズムなどは明確でない。これを解明するため，各変異細胞株の遺伝子発現を，各遺伝子阻害前，各遺伝子阻害 96 時間目で比較検討した。II-18，PC9，A549 の正常細胞・96 時間遺伝子機能を抑制した細胞を各々 2 種類、計 12 種類提出し、RNA 発現アレイの結果を得た。約 47000 種類の遺伝子について、提出した正常細胞 2 種類、96 時間遺伝子機能を抑制した細胞 2 種類で同様の結果となっている遺伝子を選択した。II-18，PC9 では遺伝子機能抑制状態で発現が亢進しており、A549 では発現の亢進を認めない遺伝子を 12 種類発見した。この遺伝子は肺非小細胞肺癌の治療過程において耐性発現を認める原因遺伝子の候補となりえる。

研究成果の概要（英文）：

EGFR, EML4-ALK, and K-ras are major genetic mutations in non small cell lung cancers. Though inhibitors for EGFR and ALK are effective for each mutant cancers, K-ras inhibitor is not effective for cancers with mutated K-ras. It is not clear why the effects of inhibitor differ and how the tolerance is acquired. To clarify questions and to study new molecular targets, we examined gene expression profiles after addition of each inhibitor in NSCLC cell lines II-18, PC9, A549 that have mutated EGFR, EML4-ALK, and mutated K-ras, respectively. A microarray analysis of about 47000 genes of NSCLC cell lines, and we found 12 candidate genes that may be related to the drug resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学系

科研費の分科・細目：内科臨床医学、呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌、耐性、EGFR、K-ras、EML4-ALK

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、EGFR 阻害剤、EML4-ALK 阻害剤が、各変異遺伝子保有細胞を根絶できず、結果として耐性細胞を生じる分子機構を探ることにある。

2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異 EML4-ALK 融合遺伝子 K-ras 遺伝子変異は、非小細胞肺癌で認められる主要な遺伝子変異である。しかしながら、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤はそれぞれの遺伝子変異を有する肺癌に著効するにもかかわらず、K-ras 阻害剤は無効であることが知られている。非小細胞肺癌の遺伝子変異の理解は単純ではない。

(1) EGFR、EML4-ALK 以外に、非小細胞肺癌において主要な役割を演じているチロシンキナーゼは存在するか。すなわち、その阻害剤が肺癌治療に有用であるようなチロシンキナーゼは存在するか。

(2) EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤は対応する遺伝子変異を有する肺癌に有効なのに、K-ras 阻害剤はなぜ無効なのか。EGFR 遺伝子変異、EML4-ALK 融合遺伝子と K-ras 遺伝子変異は相互排他的に存在する。すなわち、一つの肺癌は3者のうち最大1つのみを有している。これは、3つの変異遺伝子が発癌において同様の役割を演じており、どれか1つで発癌に必要な条件を満たすことを示唆している。なぜ治療効果に相違があるのか

(3) EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤は全ての癌細胞を殺し切らず、一部の肺癌細胞は残存する。この現象は、同一性の強いと思われる細胞株において観察され、さらに臨床で分子治療薬の効果が不十分な大きな理由と考えられる。細胞死に陥る細胞と生存する細胞の違いは何なのか。

EGFR、ALK 融合遺伝子、K-ras は、全て細胞増殖・生存シグナル伝達経路中の分子だが、

既知のシグナル伝達経路図を見ても上記の疑問に対する答えは明確でない。さらに短時間のシグナル伝達はリン酸化など既存の蛋白の修飾によって行なわれるが、細胞生存・増殖などの長期間の変化は遺伝子発現を通じて実現されるため、遺伝子発現の面からの検討が必要である。

上記(1)(2)(3)の疑問に対する手がかりを掴み、新たな分子標的治療の標的分子を探るため、複数の EGFR 変異細胞株、EML4-ALK を有する細胞株、K-ras 遺伝子変異細胞株の遺伝子発現を、各遺伝子阻害前、各遺伝子阻害 96 時間目で比較検討する。コントロールとして、変異を保有しない細胞株に各阻害剤を投与したものを使用する。96 時間としたのは、阻害剤投与後速やかにアポトーシスに陥る細胞の影響を除外し、阻害剤投与にも関わらず生存する細胞の遺伝子発現パターンを観察するためである。この実験から以下の情報が得られると期待される。

(4) 複数の EGFR 遺伝子変異細胞、EML4-ALK 保有細胞で、EGFR 阻害剤、ALK 阻害剤投与後に共通して上昇し、変異を有しない細胞では上昇しない遺伝子(遺伝子 A とする)は、分子標的治療時の残存癌細胞の生存に關与している可能性がある。EGFR または ALK と同時に遺伝子 A を阻害することで生存細胞数が減少するならば、遺伝子 A は分子標的治療の有効なターゲットとなる。

遺伝子 A は、その細胞で主として働いているチロシンキナーゼの阻害にตอบสนองする遺伝子である。EGFR 変異(-)かつ EML4-ALK(-)かつ K-ras 変異(-)の細胞を、遺伝子 A のプロモーターをレポーター(応答遺伝子断片)とし、各チロシンキナーゼに対する siRNA でスクリーニングすることにより、その細胞株で主として働いているチロシンキナーゼ

を同定できる可能性がある。これにより、EGFR 遺伝子変異, EML4-ALK 融合遺伝子以外に非小細胞肺癌で働いている癌遺伝子を同定できる可能性がある。

(5) EGFR 遺伝子変異細胞, EML4-ALK 保有細胞に各阻害剤を投与した場合の遺伝子発現変化と, K-ras 変異細胞に K-ras 阻害剤を投与した場合の遺伝子発現変化を比較することにより, K-ras 阻害が細胞死に繋がらない原因が検討できる。

小細胞肺癌細胞株 (EGFR 変異陽性株, EML4-ALK 融合遺伝子陽性株, K-ras 変異陽性株, 全遺伝子陰性株) を使用する。変異陽性株では, 変異遺伝子阻害前, および阻害後 96 時間の RNA 発現を, 47000 種類の RNA が検索可能な発現アレイにて比較する。EGFR 変異陽性細胞株の複数細胞株, EML4-ALK 保有細胞株で共通して発現が亢進している遺伝子を選択し, 癌細胞が依存しているシグナル阻害後中長期的に細胞を生存させる応答遺伝子の候補とする。シグナル遮断 + 応答遺伝子遮断で癌細胞生存率が減少することを確認し, それを「遺伝子 A」とする。ついで, 全遺伝子陰性細胞株を利用し, siRNA + 応答遺伝子遮断で癌細胞生存が減少するようなチロシンキナーゼをスクリーニングする。そのチロシンキナーゼが細胞内で変異していることを確認し, 非小細胞肺癌関連の癌遺伝子候補とする。

3. 研究の方法

(1)EGFR 遺伝子, EML4-ALK 融合遺伝子, K-ras 遺伝子機能抑制前後における mRNA 発現レベルの包括的検索と「遺伝子 A」候補遺伝子の絞り込み
細胞株

以下の肺非小細胞肺癌細胞株 (腺癌細胞株) を使用する。EGFR 変異遺伝子保有細胞

株: II-18 (L858R), PC9 (exon 19 deletion: L747-E740del), RERF-LC-Ad2 (L747-E740del, A750P), EML4-ALK 融合遺伝子保有細胞株: NCI-H2228, K-ras 変異遺伝子保有細胞株: LK87 (G12S) (A549 に変更)

RNA 発現レベルの包括的検索

各細胞株において, EGFR 遺伝子は gefitinib (10 μ M, 原末: アストラゼネカから提供), EML4-ALK 融合遺伝子は ALK チロシンキナーゼ配列に対する siRNA, K-ras 遺伝子は K-ras 遺伝子に対する siRNA (Santa Cruz K-ras siRNA (h): sc-35731) にて, 各遺伝子機能を抑制する。遺伝子機能抑制前, 抑制後 96 時間の RNA を採取し, RNA 発現アレイ (Affymetrix 社) にて抑制前後の各 RNA の相対比率を検討する。

その結果から, EGFR 遺伝子, EML4-ALK 融合遺伝子と同様の役割を非小細胞肺癌で果たしているチロシンキナーゼのスクリーニングを行う。

4. 研究成果

これまでに, 各細胞株のうち, II-18, PC9, A549 の正常細胞・96 時間遺伝子機能を抑制した細胞を各々 2 種類, 計 12 種類提出し, RNA 発現アレイの結果を得た。

約 47000 種類の遺伝子について, 提出した正常細胞 2 種類, 96 時間遺伝子機能を抑制した細胞 2 種類で同様の結果となっている遺伝子を選択し, この中から II-18, PC9 では遺伝子機能抑制状態で発現が亢進しており, A549 では発現の亢進を認めない遺伝子を 12 種類発見した。この遺伝子は肺非小細胞肺癌の治療過程において耐性発現を認める原因遺伝子の候補となりえる。

今後, 再現性の確認, さらに耐性発現の原因となる遺伝子の絞り込みを行う。

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 49 件。うち 13 件を示す。英文は全て査読あり)

1. Kim, S.T., et al., Can Serum be Used for Analyzing the EGFR Mutation Status in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer? *Am J Clin Oncol*, 2012.
2. Huqun, et al., Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 2011.
3. 萩原弘一, 【内科診療における論点】呼吸器 化学療法不可で EGFR-TKI 不応となった肺癌症例では EGFR-TKI は中止すべきか? *内科*, 2011. 107(6): p. 952-955.
4. 萩原弘一, 【Cancer Stem Cell を標的とした新しいがん分子標的の動向】Hedgehog シグナル伝達系と肺がん. *がん分子標的治療*, 2011. 9(1): p. 18-21.
5. 萩原弘一, EGFR 遺伝子変異検査法とそれぞれの違いについて教えてください. *肺癌診療 Q & A 一つ上に行く診療の実践*, 2011: p. 235-236.
6. Maruyama, H., et al., Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 2010. 465(7295): p. 223-6.
7. Tanaka, T., et al., Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int J Cancer*, 2010. 126(3): p. 651-5.
8. Yamaguchi, T., et al., Salbutamol modulates the balance of Th1 and Th2 cytokines by mononuclear cells from allergic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010. 152 Suppl 1: p. 32-40.
9. 萩原弘一, 【呼吸器疾患と分子標的治療】肺癌に対する分子標的治療. 呼吸と循環, 2010. 58(10): p. 1005-1010.
10. 萩原弘一, 治療のピットフォール 薬剤性肺障害 日本人における特性. *治療学*, 2010. 44(5): p. 591-593.
11. 萩原弘一, 【呼吸器疾患の性差医学】肺癌の性差. *呼吸器内科*, 2010. 17(2): p. 132-135.
12. 萩原弘一, 診断の進歩 異常遺伝子を標的とした分子標的治療. *Annual Review 呼吸器*, 2010. 2010: p. 159-163.
13. Maemondo, M., et al., Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*, 2010. 362(25): p. 2380-8.

〔学会発表〕(計 56 件。うち 25 件を示す)

1. 清水久実, 宮永晃彦, 豊川優, 北村和広, 小齊平聖治, 野呂林太郎, 峯岸裕司, 清家正博, 吉村明修, 弦間昭彦, 川本雅司, 萩原弘一, 曾田学, 間野博行, 竹内賢吾, 石川雄一. EGFR 遺伝子変異と EML4-ALK 融合遺伝子が併存した肺腺癌の 1 例. 第 159 回日本肺癌学会関東支部会. 2010 年 12 月 11 日. 東京.
2. 里内美弥子, 石井源一郎, 藤堂卓也, 西尾和人, 萩原弘一, 光富徹哉, 後藤功一. 気管支鏡による擦過洗浄細胞診検体及び胸水を用いた EGFR 遺伝子変異検査法の Validation study. 第 51 回日本肺癌学会総会. 2010 年 11 月 3 日. 広島.
3. 後藤功一, 石井源一郎, 藤堂卓也, 西尾和人, 萩原弘一, 光富徹哉, 里内美弥子. 合成 DNA 検体及びホルマリン固定パラフィン包埋組織検体による EGFR 遺伝子変異検査法の Validation study. 第 51 回日本肺癌学会総会. 2010 年 11 月 3 日. 広島.
4. 西垣豊, 藤田結花, 藤内智, 山本泰司, 武田昭範, 山崎泰宏, 藤兼俊明, 萩原弘一. 肺癌診断における 10%高張性食塩水 15 分間吸入誘発喀痰法の意義. 第 51 回日本肺癌学会総会. 2010 年 11 月 3 日. 広島.
5. 貞方里奈子, 宮沢仁志, 張嘉玲, 呼群, 後藤義也, 清水禎彦, 小林国彦, 石川雄一, 萩原弘一, 小山信之. 悪性胸膜中皮腫における HYAL2 プロモーターメチル化解析. 第 51 回日本肺癌学会総会. 2010 年 11 月 3 日. 広島.
6. 北村和広, 岡野哲也, 河野 あゆみ, 武内進, 宮永晃彦, 小齊平聖治, 峯岸裕司, 清家正博, 吉村明修, 西尾和人, 萩原弘一, 弦間昭彦. PNA-LNA PCR clamp 法および PCR-invader 法による EGFR 遺伝子変異解析の validation 試験. 第 48 回日本癌治療学会学術集会. 2010 年 10 月 28 日. 京都.
7. 坂口浩三, 石田博徳, 二反田博之, 山崎庸弘, 坪地宏嘉, 長井良昭, 小山信之, 大谷秀雄, 村山芳武, 小林国彦, 萩原弘一, 清水禎彦, 金子公一. 肺癌気管支鏡検体と手術検体における EGFR 遺伝子変異検出の比較. 第 33 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会. 2010 年 6 月 9 日. 横浜.
8. 原田真雄, 井上彰, 小林国彦, 前門戸任, 菅原俊一, 大泉聡史, 西條康夫, 弦間昭彦, 磯部宏, 森田智視, 萩原弘一, 貫和敏博. EGFR 変異陽性の進行非小細胞肺癌におけ

るゲフィチニブと化学療法の比較第3相試験 (NEJ002) . 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2010 年 4 月 23 日 . 京都 .

9 小山信之, 張嘉玲, 呼群, 後藤義也, 清水禎彦, 石川雄一, 坂口浩三, 金子公一, 大谷秀雄, 村山芳武, 小林国彦, 萩原弘一. 悪性胸膜中皮腫における HYAL2 DNA プロモーター領域のメチル化解析. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2010 年 4 月 23 日 . 京都 .

10. 山口剛史, 杉知行, 高久洋太郎, 中込一之, 萩原弘一, 金澤實, 永田真. 気管支喘息における炎症性サイトカイン産生に及ぼすサルプタモールの影響. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2010 年 4 月 23 日 . 京都 .

11. 平間崇, 福永興壱, 金澤實, 萩原弘一. ヒト細胞標準化 real-time PCR 法を用いた呼吸器感染症の起炎病原体スクリーニング検査. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2010 年 4 月 23 日 . 京都 .

12. 立花暉夫, 萩原弘一, 上甲剛, 澄川裕充, 西村一孝, 高橋弘毅, 泉信有, 石田直, 吉村邦彦. 日本の肺微石症症例の長期予後の検討. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2010 年 4 月 23 日 . 京都 .

13. 風間俊文, 佐藤浩二, 湊浩一, 藤田敦, 萩原弘一. 当院における EGFR 遺伝子変異検出解析. 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2010 年 4 月 23 日 . 京都 .

14. 石本修, 小林国彦, 井上彰, 前門戸任, 菅原俊一, 大泉聡史, 西條康夫, 弦間昭彦, 森田智視, 萩原弘一, 貫和敏博. EGFR 遺伝子変異を有する未治療進行非小細胞肺癌に対するゲフィチニブとプラチナ併用化学療法との無作為化比較試験 (NEJ002) . 第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会 . 2010 年 3 月 18 日 . 東京 .

15. 菊地英毅, 大泉聡史, 本村文宏, 井上彰, 大河内真也, 小林国彦, 萩原弘一, 原田敏之, 秋田弘俊, 磯部宏, 西村正治. ゲフィチニブが奏功した EGFR 遺伝子変異陰性非小細胞肺癌の一例 ~ 変異陰性例に対する前向き試験 (HOT0702) より ~ . 第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会 . 2010 年 3 月 8 日 . 東京 .

16. 磯部宏, 井上彰, 小林国彦, 前門戸任, 菅原俊一, 大泉聡史, 西條康夫, 弦間昭彦, 森田智視, 萩原弘一, 貫和敏博. EGFR 遺伝子変異陽性の進行非小細胞肺癌における第三相試験 (NEJ002) の中間解析結果 .

第 50 回日本肺癌学会総会 .
2009 年 11 月 12 日 . 東京 .

17. 山田範幸, 大泉聡史, 朝比奈肇, 菊地英毅, 菊地順子, 小西純, 品川尚文, 小林国彦, 宮澤仁志, 田中知明, 萩原弘一, 西村正治. 気管支鏡下細胞診検体を用いた PNA-LNA PCR clamp 法による上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異検出の検討. 第 50 回日本肺癌学会総会 . 2009 年 11 月 12 日 . 東京 .

18. 小山信之, 張嘉玲, 呼群, 石川雄一, 小林国彦, 萩原弘一. 悪性胸膜中皮腫の Semaphorin 3B プロモーター領域 DNA メチル化解析. 第 50 回日本肺癌学会総会 . 2009 年 11 月 12 日 . 東京 .

19. 風間俊文, 佐藤浩二, 湊浩一, 吉田勤, 中里宜正, 藤田敦, 北本佳住, 玉木義雄, 堀越浩幸, 萩原弘一. 進行非小細胞肺癌に対する初回化学療法としてのゲフィチニブ療法の検討. 第 50 回日本肺癌学会総会 . 2009 年 11 月 12 日 . 東京 .

20. 山田範幸, 大泉聡史, 朝比奈肇, 菊地英毅, 菊地順子, 小西純, 品川尚文, 小林国彦, 宮澤仁志, 田中知明, 萩原弘一, 西村正治. 気管支鏡下細胞診検体を用いた PNA-LNA PCR clamp 法による上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異検出の検討. 第 50 回日本肺癌学会総会 . 2009 年 11 月 12 日 . 東京 .

21. 小山信之, 呼群, 張嘉玲, 石川雄一, 小林国彦, 萩原弘一. Promoter methylation analysis of Semaphorin 3B gene in malignant mesothelioma. 第 68 回日本癌学会学術総会 . 2009 年 10 月 30 日 . 横浜 .

22. 坂口浩三, 石田博徳, 須谷顕尚, 斎藤恵理香, 小山信之, 小宮山謙一郎, 前野有里, 村山芳武, 萩原弘一, 小林国彦, 金子公一. 切除肺癌スタンブ標本及び組織標本における EGFR 遺伝子変異検出の比較. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2009 年 6 月 12 日 . 東京 .

23. 小山信之, 張嘉玲, 呼群, 石川雄一, 後藤義也, 坂口浩三, 須谷顕尚, 斎藤恵理香, 村山芳武, 金澤實, 小林国彦, 萩原弘一. 悪性胸膜中皮腫における Semaphorin 3B プロモーター領域の DNA メチル化解析. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 . 2009 年 5 月 29 日 . 東京 .

24. 杉尾賢二, 平島智徳, 樋田豊明, 萩原弘一, 砂長則明, 井上彰, 朝比奈肇, 森田智視, 光富徹哉, 福岡正博, 貫和敏博,

安元公正 .EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 症例に
対するゲフィチニブ治療の第 II 相試 験統合
解析 (I-CAMP study group) . 第 49 回日本呼
吸器学会学術講演会 . 2009 年 5 月 29 日 . 東
京 .

25 . 田中知明 , 松岡優 , 須谷顕尚 , 長井
良昭 , 小山信之 , 宮沢仁志 , 金澤實 , 清水禎
彦 , 池淵研二 , 森田智視 , 小林国彦 , 萩原弘
二 .EGFR 遺伝子変異と関連する患者因子につ
いて .
第 129 日本薬学会 . 2009 年 3 月 26 日 . 京都 .

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称 : HOMOLOGOUS HAPLOTYPE METHOD
発明者 : Koichi Hagiwara
権利者 : 同上
種類 : 特許 , 実用新案件 , 意匠権
番号 : PCT/JP2007/062368 米国移行 12/309994
出願年月日 : 2009 年 2 月 6 日
国内外の別 : 国外

〔その他〕
ホームページ
<http://www.hhanalysis.com>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 弘一 (HAGIWARA KOICHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 00240705