

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 1 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790367

研究課題名（和文） 肺腺癌の転移成立を防ぐための研究

研究課題名（英文）

研究代表者 佐久間 裕司（SAKUMA YUJI）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・
がん分子病態学部・副技幹

研究者番号：10364514

研究成果の概要（和文）：*EGFR* 遺伝子変異陽性肺腺癌細胞は、浮遊培養系では *EGFR* 阻害薬に対して高感受性を示し容易に apoptosis に陥るのに対し、通常の単層培養系で維持された場合、その癌細胞が発現する *EGFR* の自己リン酸化は浮遊状態と同様に *EGFR* 阻害薬により完全に抑制されるにもかかわらず、*EGFR* 阻害薬に顕著に抵抗性を示すことを見出した。*EGFR* 遺伝子変異陽性の肺腺癌患者のリンパ節転移巣を検索した結果、生体内に存在する癌細胞は、細胞外基質と接着していても、脈管内に浮遊していても同様に変異型 *EGFR* 蛋白を発現していた。以上の実験結果から *EGFR* 阻害薬は生体内においては、特に脈管内に浮遊した *EGFR* 遺伝子変異陽性肺腺癌細胞をより効果的に細胞死させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*EGFR*-mutant lung adenocarcinoma cells in suspension culture system undergo massive apoptosis by treatment with *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs). On the other hand, *EGFR*-mutant cells in monolayer culture system are much more resistant to *EGFR* TKIs-induced apoptosis than suspended tumor cells, although the phosphorylation of *EGFR* expressed in *EGFR*-mutant cells is completely suppressed in either culture condition. Also intrasinus floating tumor cells in metastasis-positive lymph nodes from *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma patients expressed mutant specific *EGFR* in the same way as extracellular matrix adhesive tumor cells. These findings suggest that the tumor cells floating in vessels would be highly susceptible to *EGFR* TKIs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺腺癌、転移、アポトーシス、EGFR、Src

1. 研究開始当初の背景

最大径 2 cm 以下の小型肺腺癌で脈管浸潤陰性の症例ではほぼ全例が手術のみで完治するが、脈管侵襲が組織学的に確認された症例では約半数が術後再発することを我々は以前に報告していた(Sakuma et al. *Lung Cancer* 2009)。一方、正常な上皮細胞は脈管内のような細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) から遊離した環境では短時間で apoptosis に陥ることが知られており、この種の apoptosis は特に anoikis と呼ばれる。上記した臨床病理学的データは、肺腺癌細胞は ECM から遊離した脈管内においても apoptosis に陥らない(即ち anoikis 抵抗性を獲得している)ため脈管内を旅し、他臓器に微小転移巣を形成し、それがやがて増大し臨床症状を伴った術後再発に至ることを示している。よって我々は、遠隔転移成立を減少させることを目指し、脈管内に浮遊した肺腺癌細胞を効率的に細胞死させるための研究“肺腺癌における anoikis 抵抗性の研究”を開始した。

2. 研究の目的

本研究を開始するまでに我々は tyrosine kinase Src が肺腺癌細胞の anoikis 抵抗性に一定の役割を果たしていること (Sakuma et al. *J Pathol* 2010)、および Src tyrosine kinase inhibitors (TKIs) が誘導する肺腺癌細胞の anoikis (apoptosis) は Bcl-2 阻害薬 (BH3 mimetic と呼ばれる) である ABT-263 を添加することで顕著に増強されることを見出し報告した (Sakuma et al. *Oncol Rep* 2011)。しかしこの apoptosis 誘導効果は 24-48 時間の短時間の結果であり、この治療効果は長時間継続するか否かは定かではないため本研究を行った。なお本研究では日本人の肺腺癌の半数以上に認められる epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異陽性 (EGFR mutant) の肺腺癌に焦点を当てて解析した。

3. 研究の方法

(1) 対象：2つの EGFR-mutant 肺腺癌細胞株 HCC827 (E746-A750 del in exon 19), H1975 (L858R in exon 21 + T790M in exon 20)および 16 人の EGFR-mutant 肺腺癌患者から得られたリンパ節転移巣を用いた。

(2) 方法：上記した 2 つの肺腺癌細胞株を超低接着性培養皿を利用した浮遊培養系で

培養し Src tyrosine kinase inhibitor (TKI) である AZD0530, Bcl-2 inhibitor である ABT-263, EGFR TKI である WZ4002 で最長 144 時間、治療した。細胞がどの程度 apoptosis に陥るかを PARP-1 cleavage assay 等で検証した。また肺腺癌のリンパ節転移巣に関しては変異特異型 EGFR 抗体を用いた免疫組織化学染色を試行した。

4. 研究成果

(1) AZD0530 + ABT-263 併用療法は 24 時間という短時間では浮遊培養された HCC827, H1975 の両細胞株を効果的に apoptosis に誘導することを確認した。ただしこの併用療法を 144 時間継続した場合の治療効果に関しては両細胞間に顕著な差を認めず。すなわち浮遊状態の HCC827 細胞は 144 時間、AZD0530 + ABT-263 併用療法を受けると根治に近い状態まで apoptosis に陥ったのに対し、浮遊培養された H1975 細胞は治療後も残存する細胞が多数存在していた (図 1)。この両細胞の治療感受性の差異を規定するものとして我々は EGFR のキナーゼ活性に着目した。使用した 2 種の細胞株は EGFR-mutant であるため EGFR は恒常的に活性化しているが、Src TKI AZD0530 で治療されると HCC827 細胞に発現する EGFR の活性化 (自己リン酸化) は効果的に抑制されるのに対し、H1975 細胞のそれは自己リン酸化されたままであることを見出した (図 2)。

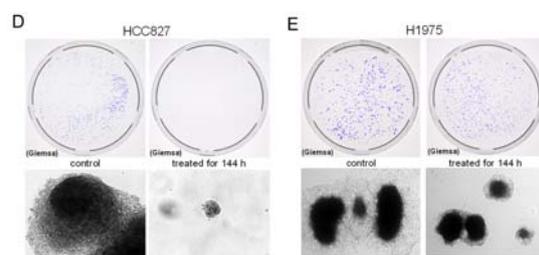


図 1：AZD0530 + ABT-263 併用療法を 144 時間継続した場合、HCC827 細胞では残存する細胞が肉眼的には殆ど確認できないが、H1975 細胞では多数の細胞が残存しているのが分かる。

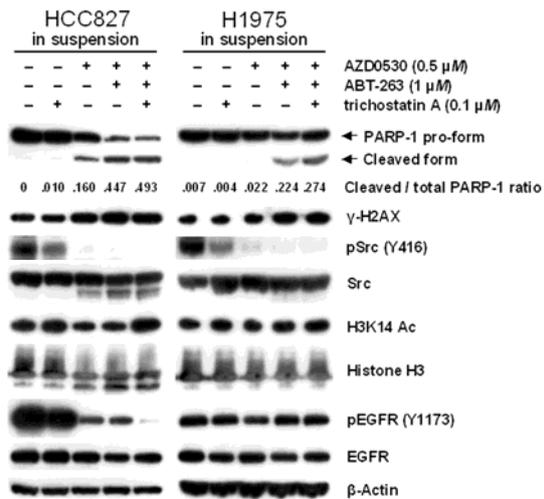


図2：AZD0530で治療された場合、HCC827のEGFRの活性化（自己リン酸化）は効果的に抑制されているが、H1975のそれは活性化した状態を保っている。

(2) 既述のように Src TKI に対する顕著な治療感受性の相違は EGFR の活性化が保たれるか否かに依存していると推察された。そこで浮遊状態の両細胞株を第3世代の EGFR TKI である WZ4002 + ABT-263 で 144 時間治療してみると両細胞ともに根治に近い状態まで生細胞が減少した (図3)。

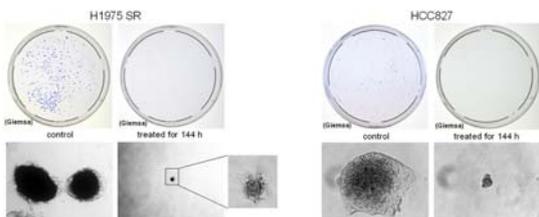


図3：WZ4002 + ABT-263 併用療法を 144 時間継続した場合、HCC827, H1975 の両細胞で残存する細胞が肉眼的には殆ど確認できないレベルまで細胞死が誘導された。

(3) WZ4002 + ABT-263 併用療法の治療効果については、上述のように浮遊培養された EGFR-mutant 肺腺癌細胞には顕著であった。ところが興味深いことに通常の培養法である単層接着培養された肺腺癌細胞は同様の治療に対して顕著に抵抗性を示すことを見出した (図4)。通常の抗癌剤で治療された場合は単層接着培養された癌細胞 (活発に増殖している) の方が浮遊状態の癌細胞 (細胞周期が停止している) よりも治療感受性が高いことも考慮すると、EGFR-mutant 肺腺癌細胞を EGFR TKI で治療する場合に浮遊状態の癌細胞の方が治療に高感受性を示すという現象は特異的であると考えられる。

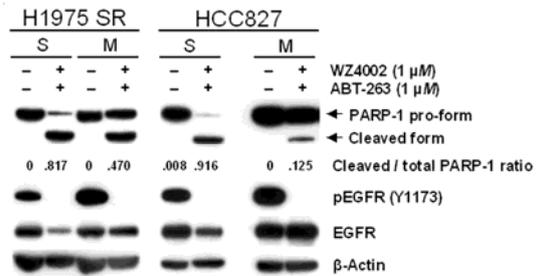


図4：両細胞ともに apoptosis マーカーである cleaved-PARP-1 の発現は浮遊培養(S)に高く、単層培養(M)では低いことが分かる。

(4) 16 人の EGFR-mutant 肺腺癌患者から得られたリンパ節転移巣に対して変異特異型 EGFR 抗体を用いて免疫染色を行うと細胞外基質と接着した癌細胞も洞内で浮遊する癌細胞も同様に変異型 EGFR 蛋白を発現していた (図5)。上記した培養細胞を用いた実験結果と併せると脈管内に浮遊する EGFR-mutant 肺腺癌細胞は EGFR TKI の格好の治療標的と考えられた。

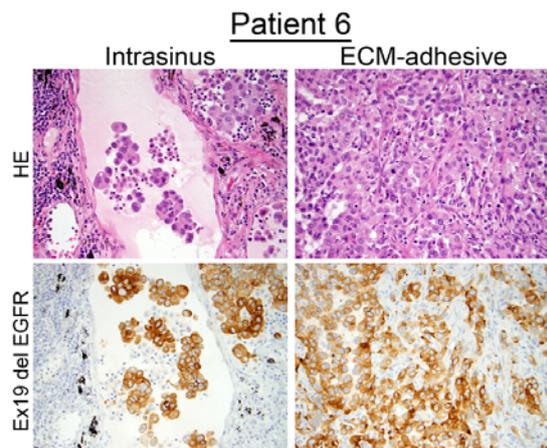


図5：生体内では細胞外基質と接着する癌細胞も洞内に浮遊する癌細胞も同様に変異型 EGFR 蛋白を発現している。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計2件) (査読有り)

1) Sakuma Y, Yamazaki Y, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Nakayama H, Yokose T, Kameda Y, Koizume S, Miyagi Y. WZ4002, a third-generation EGFR inhibitor, can overcome anoikis resistance in EGFR-mutant lung adenocarcinomas more efficiently than Src inhibitors. *Lab Invest* 2012; **92**: 371-383.

2) Sakuma Y, Tsunozumi J, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Koizume S,

Miyagi Y. ABT-263, a Bcl-2 inhibitor, enhances the susceptibility of lung adenocarcinoma cells treated with Src inhibitors to anoikis. *Oncol Rep* 2011; **25**: 661-667.

〔学会発表〕（計 3 件）

1) Sakuma Y, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Miyagi Y. *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma cells depend critically on *EGFR* activation to thrive in anchorage-independent conditions. (第70回日本癌学会総会、演題番号 J-3070、2011年10月5日 名古屋・名古屋国際会議場)

2) 佐久間裕司、中村圭靖、横瀬智之、亀田陽一、宮城洋平：肺腺癌における anoikis 抵抗性の研究（第100回日本病理学会総会、演題番号 1-F-13、2011年4月28日 横浜・パシフィコ横浜）

3) Sakuma Y, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Miyagi Y. ABT-263 enhances the susceptibility of lung adenocarcinoma cells treated with Src inhibitors to anoikis. (第69回日本癌学会総会、演題番号 O-068、2010年9月22日 大阪・大阪国際会議場)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kcch.kanagawa-pho.jp/kccri/project/lungcancer.html>

6. 研究組織

研究者番号：

(1) 研究代表者

佐久間 裕司 (SAKUMA YUJI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・がん分子病態学部・副技幹

研究者番号：10364514