

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659666

研究課題名(和文)肺扁平上皮癌に対するFGFR抑制ベクター遺伝子治療

研究課題名(英文)Gene therapy using FGFR-inhibiting vector against lung squamous cell carcinoma

研究代表者

伊達 洋至 (Date, Horoshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60252962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：肺扁平上皮癌の治療として、FGFR抑制ベクターによる癌遺伝子治療の研究を行った。肺癌におけるFGFR family発現の臨床的解析を行った。FGFR1だけでなくFGFR2も治療ターゲットになりうることを考え、FGFR2発現抑制ベクターをアデノウィルスベクターで作製した(Ad-shFGFR2)。FGFR2高発現細胞株A549でin vitro実験を行った。Ad-shFGFR2によりFGFR2のノックダウン効率を認めた。しかし、MTTアッセイでは腫瘍増殖抑制効果は十分とは言えなかった。FGFR2が単独のドライバー遺伝子ではない可能性もあり、他の候補とのco-transfectionも行っている。

研究成果の概要(英文)：We performed an experimental study on the gene therapy using a FGFR-inhibiting vector for a new treatment against lung squamous cell carcinomas. First, we have done a clinical study on the intratumoral expressions of FGFR family genes. Consequently, we considered that not only FGFR1 but also FGFR2 could be target genes for treatments. We produced a FGFR2-inhibiting vector using an adenoviral vector (Ad-shFGFR2). in vitro experiments using the Ad-shFGFR2 were performed against a lung cancer cell line A549, which has high expression levels of FGFR2. The Ad-shFGFR2 effectively knocked down the FGFR2 expression (approximately 85%). However, MTT assays revealed that the Ad-shFRFR2 did not effectively inhibit the growth of tumor cells. Therefore, considering that FGFR2 may not be a simple driver gene, we perform an experimental study using co-transfection with other candidates of driver genes.

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：FGFR shRNA アデノウィルス ベクター 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

これまで我々は肺癌の治療に有効と思われる癌関連分子を同定しながら、それらをターゲットとした癌遺伝子治療の基礎的研究を行ってきた(2009 Annual Meeting of American Association for Cancer Research, #3791). その中で最近我々は、肺扁平上皮癌において FGFR (fibroblast growth factor receptor) の腫瘍内過剰発現が特異的にみられ、腫瘍のプログレッションを促進することをみだした。FGFR は腫瘍増殖の促進のみならず、周囲組織への炎症の誘導も起こし、より悪性度の高い進行期扁平上皮癌を形成することが判明してきた。そのため、肺扁平上皮癌に対する新しい治療戦略として、FGFR 抑制ベクターによる新しい癌遺伝子治療の開発を我々は目指してゆく。

肺癌は本邦の癌死の第1位であり、その約70%は扁平上皮癌と腺癌を含む非小細胞肺癌である。更にこの非小細胞肺癌の約3分の2は進行期癌で、治療成績は未だ不良である。そのため、進行期肺癌に対する新治療戦略の開発が必要である。近年における分子生物学的癌研究の進歩により、様々な癌関連分子が同定され、それをターゲットとする分子標的治療や化学療法も開発され、臨床実用されるようになってきた。Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子に変異をもつ肺癌は、その特異的チロシンキナーゼ拮抗剤である gefitinib や erlotinib が有効であることが、我々の臨床的研究も含めて広く認められている (Int J Cancer 2007; 121: 1162-1167)。更に、腫瘍内血管新生に關与する vascular endothelial growth factor (VEGF) に対する抗体である bevacizumab も非小細胞肺癌で臨床実用されている。また、thymidylate synthase (TS) の腫瘍内発現が低い腫瘍は、5-FU 系抗腫瘍剤や pemetrexed が有効であることも判明してきた。

しかしながら、EGFR 遺伝子変異腫瘍は非小細胞肺癌の中でも腺癌に特異的にみられ、TS 低発現腫瘍も肺腺癌に多くみられる (Future Oncol 2006; 2: 289-299)。更に bevacizumab は、喀血などの副作用のため、その臨床適応は非扁平上皮癌と限定されている。以上より、進行期肺腺癌に対しては、現在幾種類かの有効な化学療法または分子標的治療が存在するが、進行期肺扁平上皮癌における有効な分子標的治療や化学療法は、未だ確立されてものがない。

その中で、過剰発現している癌関連分子を同定し、その癌関連分子をターゲットとした癌遺伝子治療を開発する本研究は理想的である。この発現抑制には RNA interference (RNAi) 技術が有用で、我々も臨床実用を目指して、これまでに多くの shRNA 発現ベクター (プラスミド、アデノウイルス) を自ら作製し所有し、この研究を発展的に継続してゆく体制を築いている (Oncogene 23:7475, 2004; Oncogene 25:6480, 2006)。

## 2. 研究の目的

まずヒト FGFR family のメンバー全4種類 (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4) について、それぞれの腫瘍内発現の臨床的意義を包括的に解析し、肺扁平上皮癌に対する治療ターゲットとなる FGFR メンバーを同定する。そして、治療ターゲットとなりうる FGFR メンバーに対する抑制ベクターを、抑制効率がよく持続性の長い shRNA 発現アデノウイルスベクターを用いて作製する。次に、作製した FGFR 発現抑制ベクターを用いて、FGFR 高発現癌細胞株に対する in vitro 遺伝子治療実験を行う。そして、in vitro 実験で有効な抗腫瘍効果がみられた FGFR 発現抑制ベクターについて、担癌マウスによる in vivo 遺伝子治療実験を行う。

### 3. 研究の方法

3-1. 肺癌における FGFR の発現に関する包括的な臨床的解析

肺癌の外科的切除標本などの臨床検体を用いて以下の項目について包括的に解析

#### ●FGFR メンバーの腫瘍内発現

FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 を検討する。quantitative real-time RT-PCR により遺伝子発現の定量する。免疫組織化学法により蛋白発現を検討する。更に、高発現がみられた FGFR メンバーについては、FISH 法により遺伝子増幅も検出する。

#### ●生物学的動態の検討

免疫組織化学法による Ki67 増殖指数の評価し、腫瘍増殖能を評価する。腫瘍内血管新生に対しては、CD34 染色により腫瘍内血管密度の評価する。

●病理学的病期と予後などによる臨床的解析  
FGFR メンバーの腫瘍内発現別及び遺伝子増幅の有無について、肺癌患者の予後との関連を検討する。

以上の臨床的解析の結果を元に、癌治療の標的分子となる FGFR メンバーを同定し、以下のベクター作製を行う。

3-2. 合成 siRNA による遺伝子治療実験  
それぞれの標的分子で数種類のターゲット部位に対する合成 siRNA (small interfering RNA) を作製する。そして、FGFR 高発現癌細胞株に対して、リポフェクションにより合成 siRNA を直接導入する。ノックダウン効率を評価し、最適な siRNA 配列を決定する。ノックダウン効率は real-time RT-PCR により遺伝子発現を定量し、Western Blot による蛋白発現を定量し、発現抑制を総合的に評価する。以上の実験結果により、最適な siRNA 配列を決定する。

#### 3-3. FGFR 発現抑制ベクターの作製

最適な siRNA 配列とループ配列を含む shRNA 配列で合成オリゴ DNA (sh オリゴ) を作製する。この合成オリゴ DNA を RNA polymerase III 系プロモーター (human U6) を搭載したプラスミドベクター (pBasi-hU6) に組み込み、shRNA 発現プラスミドベクターを作製する。次に、shRNA 発現プラスミドベクタ

ーから，制限酵素処理で“プロモーター+shRNA 配列”を切出し，コスミドベクターに組み込む．そして，COS-TPC 法で shRNA 発現アデノウイルスベクターを作製する．作製した shRNA 発現アデノウイルスベクターを大量培養，塩化セシウム法で濃縮・精製する (Oncogene 23:7475-7483,2004; Oncogene 25:6480-6488,2006) ．

### 3 - 4 癌細胞株における in vitro 遺伝子治療実験

FGFR 高発現癌細胞株に対して，FGFR 抑制ベクターによる遺伝子治療実験を行う．

#### ● ノックダウン効率の評価

quantitative real-time RT-PCR により FGFR 遺伝子発現抑制を評価する．更に，Western Blot による FGFR 蛋白発現の抑制を評価する．

#### ● 抗腫瘍効果の評価

MTT アッセイにより，腫瘍細胞障害性を定量する．フローサイトメーターにより，細胞周期解析を行う．

### 3 - 5 担癌実験動物における遺伝子治療実験

ヌードマウスに，FGFR 高発現ヒト癌細胞株または外科的切除腫瘍組織を移植し，担癌モデルの作製する．ベクター投与方法としては，まず腫瘍内への直接注入法を，次に気道内吸入法を検討する．

#### ● ノックダウン効率の評価

real-time quantitative RT-PCR により 標的遺伝子発現抑制の評価する．免疫組織化学法と Western Blot により，標的蛋白発現の評価を行う．

#### ● FGFR 抑制アデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果の評価

腫瘍体積の定時的測定を行い，腫瘍増殖の抑制を評価する．更に，免疫組織化学法により，Ki67 指数で腫瘍増殖能を，CD34 染色で血管新生を評価する．また，TUNEL 法により，腫瘍内アポトーシスを評価する．

肺や肝臓への転移数，及び組織学的評価を行い，転移能を評価する．また，生命予後の検討を行う．そして，生化学的・免疫学的評価：ELISA によるサイトカイン発現定量も行う．更に，抗腫瘍効果を認めたベクターは，アテロコラーゲン複合体による徐放効果も検討する．

### 4 ．研究成果

#### 4 - 1 ．肺癌における FGFR の発現に関する包括的な臨床的解析

外科的切除を行った非小細胞肺癌 155 例（腺癌 103 例，扁平上皮癌 41 例，その他 11 例）を対象に，FGFR family の腫瘍内発現に関する臨床的解析を行った．まず，PCR-SSCP(single strand conformational polymorphism)を用いて epidermal growth factor receptor(EGFR)遺伝子の変異をエクソン 18 から 21 まで検出し，modified mutagenic PCR-restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP)を用いて K-ras 遺伝子のエクソン 1 における変異を検出した．検出さ

れた遺伝子変異はそれぞれ direct sequencing で塩基配列を確認した．その結果，EGFR 変異は 35.5%にみられ，K-ras 変異は 6.5%にみられた．EGFR 変異と K-ras 変異を同時に持った腫瘍は認められなかった．組織型別にみると，EGFR 変異のみられた腫瘍は全て腺癌であり，K-ras 変異の多くも腺癌であった．これらの結果は，EGFR と K-ras の遺伝子変異はそれぞれ肺腺癌における独立したドライバー遺伝子であるとされているこれまでの報告と一致するものであった．

次に我々は本研究の課題である FGFR family の腫瘍内発現について臨床的解析を行った．ヒトの FGFR family 遺伝子である FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 の腫瘍内発現を，TaqMan Probe を用いた quantitative real-time PCR で遺伝子発現をそれぞれ定量した．ヒト肺癌細胞株 H520 を FGFR1 と FGFR3 のポジティブコントロールとし，ヒト肺癌細胞株 A549 を FGFR2 と FGFR4 のポジティブコントロールとした．ヒト Actin 遺伝子発現で，症例間の発現を標準化した．

その結果，EGFR 遺伝子と K-ras 遺伝子が共に野生型である腫瘍では，これらのどちらかが変異型である腫瘍より，FGFR1 と FGFR2, FGFR3 の腫瘍内遺伝子発現が有意に高かった（それぞれ  $P=0.012$ ,  $P=0.003$ ,  $P=0.039$ ）．しかし，FGFR4 の腫瘍内遺伝子発現は，EGFR 遺伝子と K-ras 遺伝子の状態では有意な関連はみられなかった．

組織型別にみると，腫瘍内 FGFR2 遺伝子発現は，腺癌よりも扁平上皮癌で有意に発現が高かった ( $P<0.001$ ) ．また，腫瘍内 FGFR3 遺伝子発現も，腺癌よりも扁平上皮癌で有意に発現が高かった ( $P=0.004$ ) ．一方，FGFR1 と FGFR4 の腫瘍内発現は，組織型別では明らかな差はみられなかった．

更に，FGFR family の腫瘍内遺伝子発現の相対的な比較を行うと，4 種類のメンバーの中で，FGFR2 の腫瘍内発現が最も高かった．FGFR1 発現と FGFR2 発現の間には有意差はみられなかったが，FGFR3 発現と FGFR4 発現は FGFR2 発現と比べて 10 倍以上も低かった（それぞれ  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ）．つまり，非小細胞肺癌における FGFR3 と FGFR4 の遺伝子発現は，FGFR1 と FGFR2 の遺伝子発現より有意に低かった．

これらの結果から，我々は FGFR1 と FGFR2 の腫瘍内発現に着目し，これらの腫瘍内蛋白発現を免疫組織化学法で評価した．一次抗体は，ウサギポリクローナル抗 FGFR1 抗体 (Flg(C-15)) とウサギポリクローナル抗 FGFR2 抗体(Bek (C-17))をそれぞれ使用し，ABC 法により評価した．また，腫瘍増殖能を評価するため，Ki-67 染色 (MIB-1) も同時に行い，Ki67 増殖指数を算出した．

その結果，FGFR1 蛋白と FGFR2 蛋白は，腫瘍細胞において細胞質に存在して発現がみられた．EGFR 遺伝子と K-ras 遺伝子の状態で比較してみると，EGFR 遺伝子と K-ras

遺伝子が共に野生型である腫瘍では、これらのどちらかが変異型である腫瘍より、腫瘍内 FGFR2 蛋白発現が有意に高かった ( $P=0.028$ )。しかし、腫瘍内 FGFR1 蛋白発現は、EGFR 遺伝子と K-ras 遺伝子の状態との間に有意な関連はみられなかった。組織型別にみると、腫瘍内 FGFR2 蛋白発現は、腺癌よりも扁平上皮癌で有意に高かった ( $P<0.001$ )。一方、腫瘍内 FGFR1 蛋白発現は、組織型の間で明らかな差はみられなかった。

一方、細胞機能の面からみると、腫瘍内 FGFR1 蛋白発現は Ki67 増殖指数と有意な正の相関がみられ ( $P<0.001$ )、腫瘍内 FGFR2 蛋白発現も Ki67 増殖指数と有意な正の相関がみられた ( $P<0.001$ )。以上より、腫瘍内 FGFR1 蛋白発現と腫瘍内 FGFR2 蛋白発現は共に腫瘍増殖能に関与することが示された。

これらの研究成果から、FGFR family の中で FGFR1 と FGFR2 は、非小細胞肺癌 (特に扁平上皮癌) におけるドライバー遺伝子である可能性が考えられた。そこで、我々は FISH 法を用いて、肺扁平上皮癌における FGFR1 と FGFR2 の遺伝子増幅について検索した。その結果、肺扁平上皮癌において、FGFR1 の遺伝子増幅は 30.8% に、FGFR2 の遺伝子増幅は 20.5% にみられた。特に、7.7% の肺扁平上皮癌では、FGFR1 と FGFR2 共に遺伝子増幅がみられた。一方、56.4% の肺扁平上皮癌では、FGFR1 と FGFR2 共に遺伝子増幅はみられなかった。この結果から、FGFR1 と FGFR2 は約 40% の肺扁平上皮癌におけるドライバー遺伝子である可能性が示された。

これら FGFR の遺伝子増幅の機能面を、腫瘍増殖の指標である Ki67 指数で評価した。その結果、FGFR1 の遺伝子増幅は、Ki67 指数と有意な相関はみられなかった。しかし、FGFR2 の遺伝子増幅は、Ki67 指数と有意な相関がみられ ( $P=0.008$ )、FGFR2 の遺伝子増幅が、肺扁平上皮癌における増殖能亢進に関連があることが示された。

一方、肺扁平上皮癌における FGFR1 と FGFR2 の遺伝子増幅について、臨床的背景因子との関連を検討したが、これらの遺伝子増幅と性別、年齢、喫煙などと明らかな関連はみられなかった。更に、FGFR1 と FGFR2 の状態について、肺扁平上皮癌の患者における予後との関連についても検討した。FGFR1 の遺伝子発現と蛋白発現、遺伝子増幅ともに、肺扁平上皮癌患者の予後とは明らかな関連はみられなかった。また、FGFR2 についても、遺伝子発現と蛋白発現、遺伝子増幅ともに、肺扁平上皮癌患者の予後とは明らかな関連はみられなかった。

以上のとおり、肺癌における FGFR family メンバーの包括的な臨床的解析から、FGFR1 と FGFR2 は、肺扁平上皮癌におけるドライバー遺伝子である可能性が示された。実際、FGFR1 については、肺扁平上皮癌におけるドライバー遺伝子としての報告が近年ある (Weiss, et al. *Sci Transl Med* 2010; 2: 62ra93;

Dutt, et al. *PLoS One* 2011; 6: e20351)。そのような中で、今回の我々の研究成果からは、FGFR2 も肺扁平上皮癌におけるドライバー遺伝子としての可能性が新たに強く示唆された。そのため我々は、この FGFR2 を主な対象として、抑制ベクターを作製して遺伝子治療の研究を行うこととした。

4 - 2 . 合成 siRNA による遺伝子治療実験  
まず、ヒト FGFR2 遺伝子の mRNA 配列を元に異なる配列をもった合成 siRNA (small interfering RNA) を 3 種類作製した (FGFR2-siRNA1, FGFR2-siRNA2, FGFR2-siRNA3)。そして、TransIT-TKO (Mirus) を用いて、FGFR2 高発現ヒト肺癌細胞株 A549 に、これら 3 種類の合成 siRNA をそれぞれ in vitro でトランスフェクションした。トランスフェクション後 72 時間に、quantitative real-time PCR で FGFR2 遺伝子発現を定量し、Western Blot により FGFR2 蛋白発現を定量した。その結果、FGFR2-siRNA1 によるトランスフェクションが最も高い FGFR2 のノックダウン効率 (約 85%) があり、この配列を元に抑制ベクターを作製することにした。

4 - 3 . FGFR 発現抑制ベクターの作製  
FGFR2-siRNA1 の配列を元に、ループ配列を含む shRNA 配列 (センス鎖+ループ鎖+アンチセンス鎖+polymerase III terminator) で合成オリゴを作製した。次に、この合成オリゴを、ヒト RNA polymerase III 系プロモーター (human U6) を搭載したプラスミドベクター (pBAsi-hU6, Takara) に組み込み、FGFR2 抑制 shRNA 発現プラスミドベクター (Pl-shFGFR2) を作製した。

次に、制限酵素 EcoR V を用いて、この Pl-shFGFR2 から、「プロモーター-human U6 + shRNA 配列」を切り出し、アデノウィルスを搭載したコスミドベクター-pAxcwit に組み込んだ。そして、COS-TPC 法を用いて、非増殖型アデノウィルスベクターとして FGFR2 抑制 shRNA 発現ベクターを作製した (Ad-shFGFR2)。このベクターは、アデノウィルスの増殖に必要な E1 遺伝子領域を欠失しており、human U6 プロモーターの元に、FGFR2 抑制 shRNA を発現する構造になっている。同様にして、コントロールベクターとして Ad-shNC も作成した。

4 - 4 . 癌細胞株における in vitro 遺伝子治療実験

FGFR2 高発現ヒト肺癌細胞株 A549 に、FGFR2 抑制 shRNA 発現ベクター Ad-shFGFR2 とコントロールベクター Ad-shNC をそれぞれ 5 MOI, 10 MOI, 20 MOI でトランスフェクションした。トランスフェクション後、4 8 時間、7 2 時間、9 6 時間にそれぞれ FGFR2 発現を測定した。測定法は、quantitative real-time PCR で FGFR2 遺伝子発現を定量し、Western Blot により FGFR2 蛋白発現を定量した。その結果、Ad-shFGFR2 により、A549 細胞における FGFR2 発現は遺伝子発現と蛋

白発現共に約 85%のノックダウン効率が認められた。

次に機能解析として、A549 細胞に Ad-shFGFR2 をトランスフェクション後 96 時間に、MTT アッセイ(Cell Proliferation Kit I, Roche)を行った。しかしながら、A549 細胞に対する Ad-shFGFR2 の腫瘍細胞増殖抑制効果は、コントロールベクター Ad-shNC と比べて有意差はなく、不十分なものであった。

#### 4 - 5 . 担癌実験動物における遺伝子治療実験

in vivo 遺伝子治療実験を行うために、FGFR2 高発現ヒト肺癌細胞株 A549 を、ヌードマウスに皮下移植し、担癌マウスモデルを作製した。腫瘍の生着後(約 8 mm<sup>3</sup>)、Ad-shFGFR2 とコントロールベクター Ad-shNC をそれぞれ腫瘍内注入した。ベクターの投与は  $2 \times 10^9$  PFU を 96 時間おきに行った。Ad-shFGFR2 の腫瘍内注入により、A549 細胞における FGFR2 発現の低下は、遺伝子発現と蛋白発現共に認められた。しかしながら、腫瘍サイズを 72 時間おきに継続的に観察したところ、Ad-shFGFR2 の腫瘍細胞増殖抑制効果は、コントロールベクター Ad-shNC と比べて有意差はなく、不十分なものであった。

#### 4 - 6 . 考察

我々が作製した Ad-shFGFR2 では、FGFR2 発現の抑制がみられたにもかかわらず、FGFR2 高発現ヒト肺癌細胞株 A549 に対して有効な腫瘍細胞増殖抑制効果は認められなかった。その理由として、Ad-shFGFR2 のノックダウン効率が生体内では不十分であることが考えられる。そのため、更に強力なノックダウン効率を持ったベクターを作製するために、FGFR2 に対する他の siRNA 配列を元に新たなベクター作製の必要性も検討される。また、FGFR2 が単独のドライバー遺伝子ではないなどの可能性も考えられた。実際、我々の肺癌における臨床的解析でも、FGFR2 と FGFR1 の遺伝子増幅を共にもった腫瘍があることが示されていた。そのため、現在我々は FGFR2 だけでなく、他のドライバー遺伝子候補との co-transfection の実験も継続して行っている。今後、FGFR2 と有効なドライバー遺伝子候補との co-transfection の結果が得られれば、これらを共にノックダウンできるダブルカセットをもった抑制ベクターの作製を行いたいと考えている。

#### 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 15 件)

Kobayashi M, Sonobe M, Takahashi T, Yoshizawa A, Ishikawa M, Kikuchi R, Okubo K, Huang CL, Date H. Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2011; 31: 4619-4623

Sonobe M, Kobayashi M, Ishikawa M, Kikuchi R,

Nakayama E, Takahashi T, Menju T, Takenaka K, Miyahara R, Huang CL, Okubo K, Bando T, Date H. Impact of KRAS and EGFR gene mutations on recurrence and survival in patients with surgically resected lung adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2012; 19 Suppl 3:S347-354

Kobayashi M, Huang CL, Sonobe M, Kikuchi R, Ishikawa M, Kitamura J, Miyahara R, Menju T, Iwakiri S, Itoi K, Yasumizu R, Date H. Intratumoral Wnt2B expression affects tumor proliferation and survival in malignant pleural mesothelioma patients. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2012; 3: 952-958

Kobayashi M, Sonobe M, Takahashi T, Yoshizawa A, Kikuchi R, Date H. Detection of ALK fusion in lung cancer using fluorescence in situ hybridization. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2012; 20:426-431

Shoji T, Sonobe M, Sakai H, Fujinaga T, Sato T, Chen F, Miyahara R, Bando T, Wada H, Date H. Pharmacokinetic study of weekly (days 1-5) low-dose S-1 in patients with non-small-cell lung cancer. *Rev Recent Clin Trials* 2012; 7: 167-172

Ishikawa M, Miyahara R, Sonobe M, Horiuchi M, Menju T, Nakayama E, Kobayashi M, Kikuchi R, Kitamura J, Imamura N, Huang CL, Date H. Higher expression of EphA2 and ephrin-A1 is related to favorable clinicopathological features in pathological stage I non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2012; 76:431-438

Chen F, Sonobe M, Sato T, Sakai H, Huang CL, Bando T, Date H. Clinicopathological characteristics of surgically resected pulmonary pleomorphic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012; 41:1037-1042

Kikuchi R, Sonobe M, Kobayashi M, Ishikawa M, Kitamura J, Nakayama E, Menju T, Miyahara R, Huang CL, Date H. Expression of IGF1R is associated with tumor differentiation and survival in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2012; 3: 412-420

Sonobe M, Kobayashi M, Ishikawa M, Kikuchi R, Nakayama E, Takahashi T, Menju T, Takenaka K, Miyahara R, Huang CL, Okubo K, Bando T, Date H. Impact of KRAS and EGFR gene mutations on recurrence and survival in patients with surgically resected lung adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 2012;19 Suppl 3:S347-354

Chen F, Fujinaga T, Shoji T, Kubo T, Sonobe M, Sato M, Aoyama A, Sato T, Sakai H, Bando T, Date H. Short-term outcome in living donors for lung transplantation: the role of preoperative

computer tomographic evaluations of fissures and vascular anatomy. *Transpl Int* 2012; 25: 732-738

Chen F, Fujinaga T, Shoji T, Sonobe M, Sato T, Sakai H, Bando T, Date H. Outcomes and pulmonary function in living lobar lung transplant donors. *Transpl Int* 2012; 25: 153-157

Sonobe M, Date H, Wada H, Okubo K, Hamakawa H, Teramukai S, Matsumura A, Nakagawa T, Sumitomo S, Miyamoto Y, Okumura N, Takeo S, Kawakami K, Aoki M, Kosaka S; The Japan-Multinational Trial Organization. Prognostic factors after complete resection of pN2 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 146:788-795

Kobayashi M, Huang CL, Sonobe M, Kikuchi R, Ishikawa M, Imamura N, Kitamura J, Iwakiri S, Itoi K, Yasumizu R, Date H. Snail expression is associated with a poor prognosis in malignant pleural mesotheliomas. *Ann Thorac Surg* 2013; 95:1181-1188

Ishikawa M, Sonobe M, Nakayama E, Kobayashi M, Kikuchi R, Kitamura J, Imamura N, Date H. Higher expression of receptor tyrosine kinase Axl, and differential expression of its ligand, Gas6, predict poor survival in lung adenocarcinoma patients. *Ann Surg Oncol* 2013; 20 Suppl 3: S467-476

Sato M, Omasa M, Chen F, Sato T, Sonobe M, Bando T, Date H. Use of virtual assisted lung mapping (VAL-MAP), a bronchoscopic multispot dye-marking technique using virtual images, for precise navigation of thoracoscopic sublobar lung resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 147: 1813-1819

〔学会発表〕(計 9 件)

Kikuchi R, Huang CL, Miyahara R, Sonobe M, Menju T, Kobayashi M, Ishikawa M, Kitamura J, Date H. Overexpression of FGFR2 gene is associated with advanced stage squamous cell carcinoma of the lung. *AACR 102<sup>nd</sup> Annual Meeting* 2011. 4.2. Orlang, U.S.A.

Kobayashi M, Huang CL, Miyahara R, Sonobe M, Menju T, Kikuchi R, Ishikawa M, Kitamura J, Itoi K, Date H. The intratumoral Wnt2B expression affects tumor progression in malignant pleural mesotheliomas. *AACR 102<sup>nd</sup> Annual Meeting* 2011. 4.2. Orlang, U.S.A.

黄 政龍, 劉 大革, 横見瀬裕保, 伊達洋至, 和田洋巳. TS 抑制 shRNA 発現アデノウィルスベクターの抗腫瘍効果の検討. 第 28 回日本呼吸器外科学会総会 2011.5.13. 大分

小林正嗣, 黄 政龍, 喜多村次郎, 菊地柳太郎, 石川将史, 毛受暁史, 園部 誠, 宮原 亮, 伊達洋至. 悪性胸膜中皮腫において Wnt2B は腫瘍増殖に影響する. 第 28 回日本呼吸器外科学会総会 2011.5.13. 大分

菊地柳太郎, 喜多村次郎, 石川将史, 小林正嗣, 中山 英, 毛受暁史, 園部 誠, 宮原 亮, 黄 政龍, 伊達洋至. 非小細胞肺癌における FGFR2 発現の検討. 第 28 回日本呼吸器外科学会総会 2011.5.13. 大分

黄 政龍, 劉 大革, 中島成泰, 横見瀬裕保, 小林正嗣, 菊地柳太郎, 石川将史, 堀内真理佳, 園部 誠, 伊達洋至. 肺癌における腫瘍内 Wnt 発現と Wnt 抑制遺伝子治療. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011.10.3. 名古屋

黄 政龍, 中島成泰, 横見瀬裕保, 小林正嗣, 菊地柳太郎, 石川将史, 今村直人, 園部 誠, 伊達洋至. 非小細胞肺癌における Wnt family の腫瘍内発現の臨床的検討. 第 52 回日本肺癌学会総会 2011.11.4. 大阪

Masashi K, Huang CL, Sonobe M, Kikuchi R, Ishikawa M, Imamura N, Kitamura J, Iwakiri S, Itoi K, Yasumizu R, Date H. Snail expression is associated with epithelial to mesenchymal transition and a poor prognosis in malignant pleural mesotheliomas. *AACR 103<sup>rd</sup> Annual Meeting* 2012. 4.4. Chicago, U.S.A.

小林正嗣, 黄 政龍, 菊地柳太郎, 今村直人, 志熊 啓, 曾和輝正, 園部 誠, 伊達洋至. Ad-shWnt2B 胸腔内投与モデルに対する IVIS を用いた治療評価. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.4. 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊達 洋至(京都大学・医学(系)研究科)  
研究者番号: 60252962

(2)研究分担者

黄 政龍(公益財団法人田附興風会医学研究所)

研究者番号: 10271511

園部 誠(京都大学・医学(系)研究科)

研究者番号: 00432378

毛受暁史(京都大学・医学(系)研究科)

研究者番号: 30527081

(3)連携研究者 なし