

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590438

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体変異肺癌に対するゲフィチニブ治療による肺線維症発症

研究課題名(英文) Lung fibrosis caused by Gefitinib therapy for lung cancer with EGFR mutation

研究代表者

松原 修 (Matsubara, Osamu)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：40107248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲフィチニブ治療による間質性肺炎の予測が可能か検討した。病理像で線維芽細胞巢活性化、筋線維芽細胞出現がある。分子的活性化機構を5例のゲフィチニブ治療後を含む20例の症例と対照症例10例のVATS肺生検で検討した。免疫組織学的に線維芽細胞巢で $\alpha$ -SMA、vimentin、desmin陽性、肺胞上皮にアポトーシス、TGF- $\beta$ 、CTGF陽性であった。筋線維芽細胞出現は上皮-間葉移行によると考えた。健常部、線維化肺のプロテオーム解析では、annexin A3、plastin-2、Hsp27、Hsp70といったタンパク質の発現に相違を発見した。ゲフィチニブ治療と原因不明のもので違いを発見できなかった。

研究成果の概要(英文)：Gefitinib therapy is very effective for lung cancer with epithelial growth factor receptor (EGFR) mutation, but it sometimes causes interstitial pneumonia/lung fibrosis. The important pathohistology shows destruction of alveolar structures, activation of fibroblastic foci and an increase of myofibroblasts. We studied pathological materials of video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) lung biopsy, using 20 cases including 5 Gefitinib therapy cases and 10 controls to examine molecular mechanism of activation. Immunohistochemically myofibroblasts were positive for  $\alpha$ -SMA, vimentin, desmin and regenerated pneumocytes were positive for TGF- $\beta$  and CTGF. Pneumocytes revealed apoptosis. Myofibroblasts are thought to appear by epithelial mesenchymal transformation (EMT). Proteome analysis showed the difference of protein expression of some proteins, such as annexin A3, plastin-2, Hsp 27 and Hsp 70. We now have examined again to confirm the results.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺線維症 間質性肺炎 病理発生機序 EGFR変異肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

ゲフィチニブは、上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを選択的に阻害する内服できる抗がん剤である。分子標的治療薬の一種で、手術不能または再発した非小細胞肺癌に対する治療薬として用いられている。ゲフィチニブにより縮小した肺癌の EGFR に遺伝子変異が認められ、この遺伝子変異とゲフィチニブの臨床効果の間に強い相関が発見された。遺伝子変異を持った EGFR は、その ATP 結合部位に構造変化が生じる結果、EGFR が恒常的に活性化して悪性度が高まる一方、ゲフィチニブとの親和性が高まり、EGFR の下流のシグナルが遮断されることによりアポトーシスが誘導され、腫瘍縮小効果を示すことが分かっている。また、非喫煙者、腺癌、女性、東洋人では EGFR の遺伝子変異をもつ割合が高いために腫瘍縮小率が高い可能性を示している。

## 2. 研究の目的

ゲフィチニブは副作用として肺障害を生じ、重篤な場合は間質性肺炎・肺線維症から呼吸不全死を引き起こす。ゲフィチニブ治療による肺線維症発症のリスクの予想がつくと治療を安全に行えるのではないかと考えた。EGFR 変異肺癌に対するゲフィチニブによる肺線維症発症に発現タンパクの差が存在するという仮説のもとに、EGFR 変異肺癌の手術後再発して、ゲフィチニブ治療を受けた症例の、手術材料の肺組織を使って、肺線維症発症した群と肺病変のないものの群に分けて、免疫組織化学とプロテオーム解析を行い、比較する。ゲフィチニブ治療による肺線維症発症のリスクの予想を可能とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

EGFR 変異肺癌の手術後再発して、ゲフィチニブ治療を受けた症例の手術時の摘出材料の組織を使って、肺線維症発症した群と肺病変のないものの群に分けて、病理組織の解析と変異の解析を行い、また発現タンパクの免疫組織化学とプロテオーム解析を行い比較した。EGFR 変異肺癌と確認された症例の内、再発してゲフィチニブ治療を受けた症例の中から、肺障害を発症した 5 例、発症しなかった 5 例。その他原因不明の間質性肺炎の症例 15 例、健常肺と思われる 10 症例を対象とした。主として手術材料と VATS 生検材料を用いた。凍結保存していた腫瘍肺組織からマイクロトームを使用して作製した凍結切片より、レーザーマイクロダイゼクション法にて腫瘍部を切り出し、タンパクのプロテオーム解析を行った。pH3-10 のストリップゲルにローディングし、一次元目の等電点電気泳動を行い、さらに SDS-PAGE ゲルを用いて二次元

目の電気泳動を行い、画像をスキャナーで取り込み、ソフトウェア DeCyder 2D を用いて有意にタンパク発現の差のあるスポットを検出した。MALDI-TOF-MS をもちいて解析し、得られたピークをペプチドマスフィンガープリンティング法による Mascot 解析にて解析し、タンパクを同定した。免疫組織化学染色法にてタンパク発現を確認し、形態学的なタンパクの局在も確認した。

## 4. 研究成果

ゲフィチニブ治療による肺線維症発症のリスクの予想を目的に、原因不明のものとの違いを求めたが、ゲフィチニブ治療によるものも原発不明のものも共通して、生検組織での進展において重要な組織像は線維芽細胞巢の活性化と肺胞の破壊である。肺線維症発症のもの、ゲフィチニブ治療と原因不明のものとの共通して、線維芽細胞巢の活性化の時に肺胞上皮の壊死、特にアポトーシス、筋線維芽細胞の出現が生じていることが分かった。この線維芽細胞巢の活性化での分子的な機構、組織構築の改変の検討では、肺線維症と診断した症例の VATS 肺生検の病理材料で、免疫組織学的に、また TUNNEL 法でアポトーシスを検討した。線維芽細胞巢の紡錘形細胞は -smooth muscle actin、vimentin、desmin に陽性で、肺胞上皮にアポトーシスがみられ、再生と思われる増生した肺胞上皮には TGF- $\beta$ 、CTGF が陽性で、両者とも Ki-67 の陽性が増加していた。筋線維芽細胞の出現は肺胞上皮の壊死、再生、上皮-間葉移行によるのではないかと考えられた。健常部、線維化肺のプロテオーム解析では、annexin A3、plastin-2、Hsp27、Hsp70 といったタンパク質の発現に相違を発見した。現在その再現性の検討を行っている。

## 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 3 4 件)

1. Matsubara O. Pulmonary Pathology: LC22-1 SEVERAL TOPICS OF PULMONARY VASCULITIS AND PULMONARY HEMORRHAGE SYNDROMES. Pathology. 2014 Oct;46 Suppl 2:S38.
2. Takajo D, Iwaya K, Katsurada Y, Miyai K, Takasu A, Matsubara O, Sakamoto T, Tamai S, Tsuda H. Community-acquired lobar pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa infection in Japan: a case report with histological and immunohistochemical examination. Pathol Int. 2014 May;64(5):224-30.
3. Kikuchi R, Kikuchi Y, Tsuda H, Maekawa H, Kozaki K, Imoto I, Tamai S, Shiotani

- A, Iwaya K, Sakamoto M, Sekiya T, Matsubara O. The expression and clinical significance of connective tissue growth factor in advanced head and neck squamous cell cancer. *Hum Cell*. 2014 Jul;27(3):121-8.
4. Fujikura Y, Kanoh S, Kouzaki Y, Hara Y, Matsubara O, Kawana A. Pleuroparenchymal fibroelastosis as a series of airway complications associated with chronic graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med*. 2014;53(1):43-6.
  5. Katsurada Y, Yoshida M, Maeshima AM, Ikeda K, Shibata T, Kinoshita T, Matsubara O, Tsuda H. Wide local extension and higher proliferation indices are characteristic features of symptomatic lobular neoplasias (LNs) and LNs with an early invasive component. *Histopathology*. 2014 Jun;64(7):994-1003.
  6. Miyai K, Iwaya K, Asano T, Tamai S, Matsubara O, Tsuda H. Fatty acid synthase overexpression in adult testicular germ cell tumors: potential role in the progression of non-seminomatous germ cell tumors. *Virchows Arch*. 2014 Feb;464(2):221-8.
  7. Kodama T, Motoi N, Ninomiya H, Sakamoto H, Kitada K, Tsukaguchi T, Satoh Y, Nomura K, Nagano H, Ishii N, Terui Y, Hatake K, Ishikawa Y. A Novel Mechanism of EML4-ALK Rearrangement Mediated by Chromothripsis in a Patient-Derived Cell Line. *J Thorac Oncol*. 2014 Aug 20. [Epub ahead of print]
  8. Inamura K, Ninomiya H, Nomura K, Tsuchiya E, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Takata A, Kohyama N, Ishikawa Y. Combined effects of asbestos and cigarette smoke on the development of lung adenocarcinoma: different carcinogens may cause different genomic changes. *Oncol Rep*. 2014 Aug;32(2):475-82. doi: 10.3892/or.2014.3263. Epub 2014 Jun 13.
  9. Kenmotsu H, Niho S, Ito T, Ishikawa Y, Noguchi M, Tada H, Sekine I, Watanabe S, Yoshimura M, Yamamoto N, Oshita F, Kubota K, Nagai K. A pilot study of adjuvant chemotherapy with irinotecan and cisplatin for completely resected high-grade pulmonary neuroendocrine carcinoma (large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung cancer). *Lung Cancer*. 2014 Jun;84(3):254-8. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.03.007. Epub 2014 Mar 13.
  10. Ono H, Motoi N, Nagano H, Miyauchi E, Ushijima M, Matsuura M, Okumura S, Nishio M, Hirose T, Inase N, Ishikawa Y. Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness, and clinical relapse in small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2014 Jun;3(3):632-42. doi: 10.1002/cam4.220. Epub 2014 Mar 3.
  11. Hamanaka W, Motoi N, Ishikawa S, Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y. A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy. *Hum Pathol*. 2014 May;45(5):1045-56. doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.001.
  12. Ono H, Motoi N, Nagano H, Miyauchi E, Ushijima M, Matsuura M, Okumura S, Nishio M, Hirose T, Inase N, Ishikawa Y. Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness, and clinical relapse in small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2014 Jun;3(3):632-42. doi: 10.1002/cam4.220. Epub 2014 Mar 3. 2013
  13. Miyai K, Yamamoto S, Iwaya K, Tsuda H, Matsubara O: Allelotyping analysis suggesting a consecutive progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma and then to embryonal carcinoma of the adult testis. *Hum Pathol*. 2013 Oct;44(10):2312-22. doi: 10.1016/j.humpath.2013.05.013. Epub 2013 Aug 9.
  14. Ogawa A, Yamadori I, Matsubara O, Matsubara H. Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy with circulatory failure treated with imatinib. *Intern Med*. 2013;52(17):1927-30.
  15. Kawano Y, Ohyanagi F, Yanagitani N, Kudo K, Horiike A, Tanimoto A, Nishizawa H, Ichikawa A, Sakatani T, Nakatomi K, Hagiwara S, Ninomiya H, Motoi N, Ishikawa Y, Horai T, Nishio M. Pemetrexed and cisplatin for advanced non-squamous non-small cell lung cancer in Japanese patients: phase II study. *Anticancer Res*. 2013 Aug;33(8):3327-33. Erratum in: *Anticancer Res*. 2013 Sep;33(9):4137.
  16. Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T,

- Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2013;3:1911. doi: 10.1038/srep01911.
17. Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiira S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y, Gemma A. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation. *BMC Cancer*. 2013 May 29;13:262. doi: 10.1186/1471-2407-13-262.
  18. Nakazato Y, Maeshima AM, Ishikawa Y, Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, Tomita Y, Minami Y, Asamura H, Tachibana K, Goya T, Noguchi M. Interobserver agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013 Jun;8(6):736-43. doi: 10.1097/JTO.0b013e318288dbd8.
  19. Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S, Ishikawa Y. Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes. *BMC Cancer*. 2013 Jan 5;13:8. doi: 10.1186/1471-2407-13-8.
  20. Nagashima T, Sakao Y, Mun M, Ishikawa Y, Nakagawa K, Masuda M, Okumura S. A clinicopathological study of resected small-sized squamous cell carcinomas of the peripheral lung: prognostic significance of serum carcinoembryonic antigen levels. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;19(5):351-7. Epub 2012 Dec 13.
  21. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 May;137(5):668-84. doi: 10.5858/arpa.2012-0263-RA. Epub 2012 Sep 12.
  22. Isoda K, Kitagaki M, Matsubara O, Kikuchi M, Ohsuzu F, Adachi T. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes spontaneous femoral artery aneurysm formation in mice. *Am J Pathol*. 2012 Mar;180(3):1254-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.028. Epub 2012 Jan 11.
  23. Yamamoto S, Tsuda H, Matsubara O: Loss of ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear-cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations. *Mod Pathol*. 2012 Apr;25(4):615-24. doi: 10.1038/modpathol.2011.189. Epub 2011 Dec 9.
  24. Yamamoto S, Tsuda H, Matsubara O: PIK3CA mutations and loss of ARID1A protein expression are early events in the development of cystic ovarian clear cell adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2012 Jan;460(1):77-87. doi:10.1007/s00428-011-1169-8. Epub 2011 Nov 26.
- 以下省略
- 〔学会発表〕(計13件)  
省略
- 〔図書〕(計6件)  
省略
- 〔産業財産権〕  
なし
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
- 〔その他〕  
ホームページ等 なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
松原 修 (MATSUBARA, Osamu)  
がん研究所病理部・研究員  
研究者番号: 40107248
- (2) 研究分担者  
石川 雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)  
がん研究所病理部・部長  
研究者番号: 80222975