

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659399

研究課題名(和文)EGFR(上皮成長因子受容体)遺伝子変異陽性肺癌の分子遺伝学的発生母地の解明

研究課題名(英文)Familial pathogenesis of lung cancer with the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation

研究代表者

菊地 利明(Kikuchi, Toshiaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：10280926

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異陽性肺癌は、その発癌機構に遺伝学的背景が示唆されている。最近われわれは、2家系6名の家族内発癌症例を経験し、その遺伝学的背景を再認識させられた。そこで本研究では、この遺伝学的背景を明らかにするために、患者末梢血DNAを用いて、家族例6名のエクソーム解析を行った。その結果、肺癌患者に共通する原因候補遺伝子変異の中から、当該蛋白質の三次元構造に変化を及ぼす変異を見つけた。さらに、この変異により当該蛋白質の機能は低下しており、この遺伝子変異が、EGFR遺伝子変異陽性肺癌の遺伝学的背景になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文): Lung cancer is globally the leading cause of cancer death with the estimated number of the annual deaths as around 1.4 million. Cigarette smoking is a predominant etiological factor of lung carcinogenesis. Further attention has been paid to a growing number of lung carcinomas occurring in never-smokers, suggesting a biologically different disease with a genetic susceptibility. In this regard, the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation is more frequent in lung adenocarcinomas of never smokers. In this study, we acquired two 2-generational pedigrees containing more than 2 family members affected with lung adenocarcinoma with EGFR gene mutations, and performed exome capture and sequencing of whole-blood DNA. A de novo mutation was identified in lung cancer patients, but was not in two control subjects. The mutation alters the amino acid sequence, and confers dominant-negative activity that potentially underlies the pathogenesis of EGFR-mutated lung adenocarcinoma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：家族性癌

1. 研究開始当初の背景

われわれの臨床試験 (N Engl J Med. 2010;362:2380-8) も一助となり、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌は、EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬によって制御可能な癌と捉えられるようになった。そして治療の観点から、EGFR 遺伝子変異が疑われる肺癌を効率的に見つけ出すことが望まれ、「腺癌、アジア系人種、女性、非喫煙者」という患者像が浮かび上がってきた。このことは EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の発生母地として、何らかの遺伝学的背景があることを示唆している。

この遺伝学的背景を再認識させられる症例を、最近われわれは相次いで経験した (J Thorac Oncol. 2008;3:311-3)。まずは、7人の兄弟姉妹のうち、4人の姉妹に肺癌が発症している家系で、うち3人の肺癌細胞で EGFR 遺伝子変異を確認している (図1)。点変異と欠失変異の二種類の遺伝子変異が姉妹内で混在していたことは、EGFR 遺伝子変異そのものが遺伝しているわけではなく、発癌を導く遺伝学的背景が家系内に伝承されていることを示唆している。

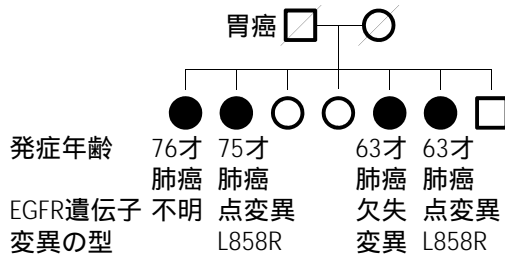


図1. EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の家族例 1

続いて経験したのは、母娘の家族内発症例で、いずれも EGFR 遺伝子に点変異を有する肺癌であった (図2)。娘の発症年齢が43才と若年性肺癌であったことから、発癌の原因に遺伝学的背景が推察された。

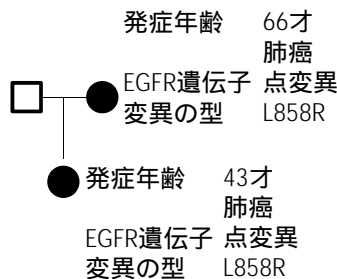


図2. EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の家族例 2

2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者の末梢血 DNA を用いて、家族例 6 名にはエクソーム解析 (全エクソンのシーケンシング) を、孤発例には全ゲノム関連解析 (GWAS、genome-wide

association study) をそれぞれ行い、合わせて EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の原因遺伝子異常を明らかにする。

原因遺伝子異常が判明すれば、末梢血 DNA でその有無を調べることによって、肺癌疑い患者の中から容易に EGFR 遺伝子変異陽性肺癌をスクリーニングできるようになる。また、その若年発症者には検診を徹底することによって、肺癌発症を早期診断できるようになることが期待される。

将来的には、「なぜ EGFR 遺伝子変異陽性肺癌が腺癌、アジア系人種、女性、非喫煙者に多いのか」といった分子病態の解明につながり、それに基づく革新的な治療の構築や、効果的な発癌予防戦略の確立にもつながる。

3. 研究の方法

(1) 家族内集積 6 症例のエクソーム解析<全エクソンのシーケンシング>

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌が集積している二家系の患者 6 人および健常者 2 人のエクソーム解析を行う。今回用いる高速シーケンサー (SOLiD 4 システム、Applied Biosystems 社) では 1 回のランニングで 8 検体を解析可能なため、肺癌患者 6 検体と合わせて、解析する健常者のコントロール数は 2 検体とする。

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌 6 人の末梢血は、東北大学倫理委員会で承認されている研究計画に基づいて採血し、その DNA を抽出する。続いて、SureSelect Human All Exon 50 Mb キット (Agilent 社) を用いて、抽出した末梢血 DNA からエクソン部分のみを捕捉し濃縮する。本キットを用いることによって、ヒト全エクソンの 99.86% (総塩基長 50 Mb) を解析することになる。

患者 6 人健常者 2 人、計 8 人のエクソーム検体の調製後に、次世代型高速シーケンサー SOLiD4 システムで塩基配列の決定を行う。塩基配列の読取およびそのデータ整理は、東北大学大学院医学系研究科 (細胞増殖制御分野) と共同で行う。

遺伝子機能に変化を与える変異 (ミスセンス、ナンセンス、スプライス異常、挿入欠失) の中から、dbSNP と 1000 Genomes Project で既知の変異を除外し、それぞれの肺癌集積家系内に共通するが健常者 2 例には認められない変異を探し出す。

(2) 孤発例における全ゲノム関連解析<SNP 解析と CNV 解析による GWAS>

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の孤発例の末梢血 DNA を用いて、一塩基多型 (SNP、single nucleotide polymorphism) と構造多型 (CNV、copy number variation) から全ゲノム関連解析 (GWAS、genome-wide association study) を行う。末梢血 DNA を末端標識した DNA 断片を、Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetix 社) とハイブリダイズすることにより解析する。このアレイによって、90 万ヶ所の SNP と 94 万ヶ所の CNV を解析する。

なお、当該研究機関には解析用の専用機器がないため、AROS Applied Biotechnology 社(デンマーク)にて解析を行う。本解析に供するために、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌症例を集積し、225名の末梢血DNAを採取保存している。

(3)同定遺伝子変異の機能評価<EGFR シグナルへの影響評価>

(1)と(2)から同定された変異遺伝子 cDNA を CMVpr(サイトメガロウイルス プロモーター)下に発現するベクターを構築し、ヒト肺癌細胞株 NCI-H1299 (EGFR 遺伝子変異なし)へ遺伝子導入する。EGFR シグナルの活性化亢進を、EGFR リン酸化 Tyr845 (あるいはリン酸化 Tyr992 またはリン酸化 Tyr1068)に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより確認する。

4 . 研究成果

患者 6 人健常者 2 人、計 8 人の末梢血 DNA から、エクソン部分のみを捕捉し、さらに濃縮することによってエクソーム解析を行った。塩基配列は SOLiD4 システムの超高速シーケンサーを用いて決定した。その結果、二つの肺癌集積家系に共通する 175 個の原因候補遺伝子変異を同定した。

そして、孤発例における全ゲノム関連解析のデータなどを参考に、48 個の候補遺伝子変異を選定することができた。

次に、当初の研究計画通り、候補遺伝子変異の機能を調べるために、同定した変異遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを製作した。これを用いて、変異遺伝子を発現する肺癌細胞株 (H1299) を樹立した。この細胞株を用いて解析を進めた結果、この遺伝子変異によって、当該蛋白質のアミノ酸置換が起こり、三次元構造に変化を来すことがわかった。さらに、この三次元構造の変化によって、当該蛋白質の機能は低下していることも明らかになった。以上より、今回のエクソーム解析で同定した遺伝子変異が、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の原因遺伝子異常になりうると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Shibahara I, Saito R, Zhang R, Chonan M, Shoji T, Kanamori M, Sonoda Y, Kumabe T, Kanehira M, Kikuchi T, So T, Watanabe T, Takahashi H, Iwabuchi E, Tanaka Y, Shibahara Y, Sasano H, Ishii N, Tominaga T. OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: a clue for successful immunotherapy. *Mol Cancer*, 査読有、Vol.14, No.1, 2015, pp.41、DOI:10.1186/s12943-015-0307-3.

Ono M, Ohkouchi S, Kanehira M, Tode N, Kobayashi M, Ebina M, Nukiwa T, Irokawa T, Ogawa H, Akaike T, Okada Y, Kurosawa H, Kikuchi T, Ichinose M. Mesenchymal stem cells correct inappropriate epithelial-mesenchyme relation in pulmonary fibrosis using stanniocalcin-1. *Mol Ther*, 査読有、Vol.23, No.3, 2015, pp.549-60、DOI:10.1038/mt.2014.217.

Nihei M, Okazaki T, Ebihara S, Kobayashi M, Niu K, Gui P, Tamai T, Nukiwa T, Yamaya M, Kikuchi T, Nagatomi R, Ebihara T, Ichinose M. Chronic inflammation, lymphangiogenesis, and effect of an anti-VEGFR therapy in a mouse model and in human patients with aspiration pneumonia. *J Pathol*, 査読有、Vol.235, No.4, 2015, pp.632-45、DOI:10.1002/path.4473.

Kanehira M, Kikuchi T, Santoso A, Tode N, Hirano T, Ohkouchi S, Tamada T, Sugiura H, Harigae H, Ichinose M. Human marrow stromal cells downsize the stem cell fraction of lung cancers by fibroblast growth factor 10. *Mol Cell Biol*, 査読有、Vol.34, No.15, 2014, pp.2848-56、DOI:10.1128/MCB.00871-13.

Okuyama K, Dobashi K, Miyasaka T, Yamazaki N, Kikuchi T, Sora I, Takayanagi M, Kita H, Ohno I. The involvement of glucocorticoids in psychological stress-induced exacerbations of experimental allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 査読有、Vol.163, No.4, 2014, pp.297-306、DOI:10.1159/000360577.

Jan Treda C, Fukuhara T, Suzuki T, Nakamura A, Zaini J, Kikuchi T, Ebina M, Nukiwa T. Secretory leukocyte protease inhibitor modulates urethane-induced lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 査読有、Vol.35, No.4, 2014, pp.896-904、DOI:10.1093/carcin/bgt382.

Kikuchi T, Kobashi Y, Hirano T, Tode N, Santoso A, Tamada T, Fujimura S, Mitsuhashi Y, Honda Y, Nukiwa T, Kaku M, Watanabe A, Ichinose M. *Mycobacterium avium* genotype is associated with the therapeutic response to lung infection. *Clin Microbiol Infect*, 査読有、Vol.20, No.3, 2014, pp.256-62、DOI:10.1111/1469-0691.12285.

Muramatsu S, Tamada T, Nara M, Murakami K, Kikuchi T, Kanehira M, Maruyama Y, Ebina M, Nukiwa T, Ichinose M. Flagellin/TLR5 signaling potentiates airway serous secretion from swine tracheal submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 査読有、Vol.305, No.11, 2013, pp.L819-30、DOI:10.1152/ajplung.00053.2013.

Fuse K, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Iida Y, Nukiwa T, Watanabe A. Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*, 査読有、Vol.19, No.1, 2013, pp.82-8、DOI:10.1007/s10156-012-0457-9.

Okuyama K, Suenaga M, Furuiki S, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Contribution of CD4+ T cells and dendritic cells to female-dominant antigen-induced T helper type 2 cytokine production by bronchial lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 査読有、Vol.161, No.Suppl 2, 2013, pp.58-65、DOI:10.1159/000350426.

菊地利明、遺伝子治療の回顧と展望、*Antisense*, 査読無、Vol.16, 2012, pp.15-24.

Okuyama K, Kashimura T, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Higher sensitivity of male CD4+ T cells to suppressive effects of CD8+ T cells on IL-5 production compared to female CD4+ T cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 査読有、Vol.158, No.Suppl 1, 2012, pp.35-41、DOI:10.1159/000337759.

Kanehira M, Kikuchi T, Ohkouchi S, Shibahara T, Tode N, Santoso A, Daito H, Ohta H, Tamada T, Nukiwa T. Targeting lysophosphatidic acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells. *PLoS One*, 査読有、Vol.7, No.2, 2012, pp.e32185、DOI:10.1371/journal.pone.0032185.

Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi T, Saijo Y, Nukiwa T, Prockop DJ. Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1. *Mol*

Ther, 査読有、Vol.20, No.2, 2012, pp.417-23、DOI:10.1038/mt.2011.259.

[学会発表](計17件)

T. Kikuchi. Pulmonary stem cell, 19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, 2014年11月14日、Bali(インドネシア).

菊地利明. 生物学的製剤と感染症対策 非結核性抗酸菌症、第88回日本感染症学会学術講演会・第62回日本化学療法学会総会合同学会、2014年6月18日、ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市).

A. Santoso, T. Kikuchi, T. Nukiwa, M. Ichinose. A factor affecting bronchiolar progenitor cell kinetics, International Conference of American Thoracic Society and American Lung Association, 2014年5月20日、San Diego(米国).

菊地利明. 非結核性抗酸菌症の治療、第89回日本結核病学会総会、2014年5月9日、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市).

菊地利明. 呼吸器疾患の宿主免疫応答の解析: 感染症とアレルギーのクロストーク、第54回日本呼吸器学会学術講演会、2014年4月26日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市).

菊地利明. レジオネラ症、日本臨床微生物学会震災感染症シンポジウム、2013年11月10日、TKP 仙台勾当台カンファレンスセンター(宮城県・仙台市).

T. Kikuchi, Y. Kobashi, A. Watanabe, M. Ichinose. Genotyping *Mycobacterium avium* has a clinical potential to predict therapeutic responses of the lung infection, European Respiratory Society Annual Congress 2013, 2013年9月10日、Barcelona(スペイン).

T. Kikuchi. Translational medicine in mycobacterial disease, 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合同学会、2013年6月6日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

N. Tode, T. Kikuchi, T. Shibahara, A. Santoso, M. Kanehira, M. Ichinose. Whole-exome sequencing of familial non-small cell lung cancer patients with the epidermal growth factor receptor gene mutations, International Conference of American Thoracic Society

and American Lung Association、2013年5月21日、Philadelphia(米国)。

菊地利明、榊原智博、玉田勉、小橋吉博、福原達朗、大河内眞也、貫和敏博、渡辺彰、一ノ瀬正和。多型縦列反復配列(VNTR)を用いた菌ゲノム解析による非結核性抗酸菌症の治療反応性予測、第110回日本内科学会講演会、2013年4月12日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)。

A. Santoso, T. Kikuchi, M. Ichinose. The role of bronchiolar stem cells in lung inflammation、CREST Workshop on Inflammation and Autoimmunity、2012年11月15日、加齢医学研究所スマート・エイジング国際共同研究センター(宮城県・仙台市)。

菊地利明。遺伝子治療の回顧と展望、第22回アンチセンスシンポジウム 第12回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム 合同シンポジウム、2012年9月25日、仙台市民会館(宮城県・仙台市)。

東出直樹、菊地利明、榊原智博、福原達朗、大河内眞也、岡崎達馬、井上彰、貫和敏博。EGFR 遺伝子変異を伴う肺腺癌患者におけるエクソーム解析、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)。

菊地利明。両側肺野に多発結節影を呈した若年女性の一例、RISE Seminar 2012、2012年6月9日、六本木アカデミーヒルズ(東京都・港区)。

N. Tode, T. Kikuchi, T. Shibahara, H. Daito, A. Santoso, T. Tamada, S. Ohkouchi, M. Ebina, T. Nukiwa. Innate immunity mediated by natural killer T cells is required for the development of hot tub lung in mice、International Conference of American Thoracic Society and American Lung Association、2012年5月22日、San Francisco(米国)。

東出直樹、菊地利明、柴原泰三、海老名雅仁、貫和敏博。EGFR 遺伝子変異を伴う肺腺癌患者における遺伝学的機序の解析、第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012年4月22日、神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)。

柴原泰三、菊地利明、東出直樹、海老名雅仁、貫和敏博。Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) の活性酸素への影響、第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012年4月22日、神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)。

〔図書〕(計5件)

西巻雄司、菊地利明。南江堂、呼吸器疾患最新の治療 2013-2015、2013、282-5。

菊地利明。アトムス、結核ハンドブック、2014、213-26。

菊地利明。文光堂、イラスト呼吸器内科、2014、8-9、20-1。

菊地利明。医学書院、非結核性抗酸菌症診療マニュアル、2015、2-14。

菊地利明。中外医学社、Annual Review 2015 呼吸器、2015、190-4。

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：リゾリン脂質シグナル制御による幹細胞の維持増殖培養法

発明者：菊地利明、兼平雅彦、貫和敏博

権利者：東北大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/82979

出願年月日：2012年12月19日

国内外の別：国外

名称：新規抗ヒト OX40 リガンド抗体、及びこれを含む抗インフルエンザ薬

発明者：菊地利明、平野泰三、一ノ瀬正和、石井直人、田中勇悦

権利者：東北大学、琉球大学

種類：特許

番号：特願 2014-135062

出願年月日：2014年6月30日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.rm.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 利明 (KIKUCHI, Toshiaki)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10280926

(2) 連携研究者

松原 洋一 (MATSUBARA, Yoichi)

国立成育医療研究センター・所長

研究者番号：00209602

井上 彰 (INOUE, Akira)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：7 0 3 6 1 0 8 7

榊原 智博 (SAKAKIBARA, Tomohiro)
東北労災病院・副部長
研究者番号：8 0 4 2 2 1 1 1

(3)研究協力者

東出 直樹 (TODE, Naoki)
東北大学・病院・医員

平野 泰三 (HIRANO, Taizou)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講
師