

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791482

研究課題名(和文) 受容体チロシンキナーゼ阻害剤耐性肺癌細胞株の樹立と耐性機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of lung cancer cell line harboring acquired resistance to receptor tyrosine kinase inhibitor

研究代表者

福井 高幸 (Fukui, Takayuki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70463198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：名古屋大学呼吸器外科で治療された胸部悪性腫瘍の切除標本や胸水を用いて初代培養を開始した。2年間で20症例から切除標本を得ることができ、そのうち中皮腫と胸腺腫3症例で細胞株の樹立に成功した。しかし、予定していた2年間の間にEGFR-TKIに対する耐性を獲得した肺癌臨床症例の組織標本を得ることができず、予定していた耐性細胞株の樹立ができなかった。初代培養に成功したのは中皮腫と胸腺腫のみであり、細胞株を用いたEGFRに関連する遺伝子異常の有無の解析を行うことができなかった。しかしながら肺癌以外の胸部悪性腫瘍細胞株は比較的稀であり、免疫染色などを行い細胞株の樹立を確認した。

研究成果の概要(英文)：We started primary culture using surgical specimens or pleural effusions from the patients with malignant tumors treated in Nagoya University. We could get surgical specimens from 20 patients in two years and succeeded in the establishment of the cell lines from a mesothelioma and 3 thymic tumor cases. However, we could not establish a cell line harboring acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) which I planned since we could not get the specimens from the patients who were resistant to EGFR-TKI. Thus, we could not analyze any gene alterations associated with the EGFR gene using those cell lines. However, several cell lines from mesothelioma and thymoma were successfully primary cultured and established. The cell lines from thoracic malignant tumors except the lung cancer were relatively rare and we performed immunostaining or the graft making with the mouse and confirmed the establishment of the cell lines.

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：細胞株 肺癌 中皮腫 胸腺腫

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性腫瘍の増殖・転移の鍵となる分子を標的とした分子標的治療の研究はめざましい進歩を遂げている。肺癌に関しては日本人の約 40-50% に上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子の活性化型変異が認められ、変異を有する症例では高率に EGFR チロシンキナーゼを阻害する薬剤 (EGFR-TKI) が有効であることがわかり、各癌細胞の多様性により個々の症例に対応した治療を選択できるテーラーメイド治療の幕開けとなった。また従来、染色体転座による切断点遺伝子の脱制御は肺癌では報告が無かったが、2007 年に肺癌で EML4 と受容体チロシンキナーゼ ALK の融合遺伝子が「形質転換を誘導する癌遺伝子」として同定された。すでに肺腺癌の 3-5% の割合でこの ALK 融合遺伝子を有する症例が存在することがわかっている。

このような受容体チロシンキナーゼ異常を伴う肺癌症例に対する治療に関しては EGFR 変異陽性例に対しては Gefitinib, Erlotinib が臨床応用されており、EML4-ALK 融合遺伝子陽性例に対しては MET, ALK 阻害剤である Crizotinib の有効性が現在証明されつつある。しかし、臨床上の大きな問題として、TKI 治療にて初期には奏効したほとんどすべての症例が、後には抵抗性となることがわかっている。奏効している期間は症例によって異なるが、中央値は 6 ヶ月程度である。このような耐性のある症例の一部には TKI 感受性のある遺伝子変異に加えて、コドン 790 のスレオニンからメチオニンへの変異 (T790M) が二次的に加わっているという報告がされている。T790M 変異による耐性獲得機序としては、EGFR の Gefitinib 結合部位の変異により Gefitinib への親和性が変化するためと考えられている。それ以外には MET 遺伝子の増幅と肝細胞増殖因子(HGF)の過剰発現などがある。

2. 研究の目的

上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異陽性肺癌のチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対する耐性獲得機序に関しては、まだその全容が明らかとなつたわけではない。また近い将来臨床応用が期待される Crizotinib に対しても EGFR-TKI と同様に一定の奏効期間の後に耐性を獲得する可能性が高いと考えられる。そこで、受容体チロシンキナーゼ異常を伴う肺癌症例あるいは、TKI 治療後に耐性となった肺癌症例の検体から細胞株を樹立し、これを利用して耐性獲得機序などを解析することにより、TKI 治療に抵抗性となった肺癌をふくむ胸部悪性腫瘍に対する治療戦略を立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)耐性細胞株の樹立

対象は当初、Gefitinib または Erlotinib を投与して一旦奏効が得られたものの獲得

耐性をきたした EGFR 遺伝子変異肺癌を有する患者、または、Crizotinib を投与して一旦奏効が得られたものの獲得耐性をきたした EML4-ALK 転座肺癌を有する患者とした。診断、または治療目的で得られた胸水や生検検体が余った場合、患者本人の同意を以て得た上で細胞株を樹立する予定とした。しかし、初年度は EGFR-TKI に対する耐性を獲得した肺癌症例の切除標本を得ることができず、耐性細胞株の樹立ができなかった。そこで、まずは胸部悪性腫瘍由来の細胞株の樹立にとりかかった。名古屋大学呼吸器外科で治療(手術)された胸部悪性腫瘍の切除標本あるいは胸水を用いて液体培地を用いた初代培養を開始した。

次年度も引き続き症例の集積、初代培養を継続し耐性獲得した細胞株の樹立を目指し、また樹立に成功した細胞株をもちいて EGFR に関係する遺伝子異常の有無の解析を行う予定を立てた。

(2) 胸腺上皮性腫瘍由来細胞株樹立の試み

胸膜播種を有する IVa 期あるいは再発例などの進行胸腺腫や胸腺癌に対しては集学的治療が行われるものの、治療成績は未だ十分とは言えない。上記腫瘍に対する治療戦略確立のために生物学的特性の解明が望まれるが、基礎研究に有用な胸腺腫細胞株は世界でわずかに 3 細胞株 (type AB、type B1、type C 各 1 株) が報告されているのみである。そこで、当科で手術を施行した胸腺上皮性腫瘍患者から腫瘍組織、胸水を採取し初代培養を開始した。培養液は RPMI または DMEM にウシ胎児血清(FBS) 1-10% と抗生剤を加えたものを用い、37°C、5% CO₂ 下で静置培養した。培養液は 3-4 日ごとに更新し、位相差顕微鏡により細胞の状態を毎日観察、60-90% コンフルエントの時点で継代し、以降 75cm² フラスコ内で継代培養した。

4. 研究成果

(1)平成 24 年度

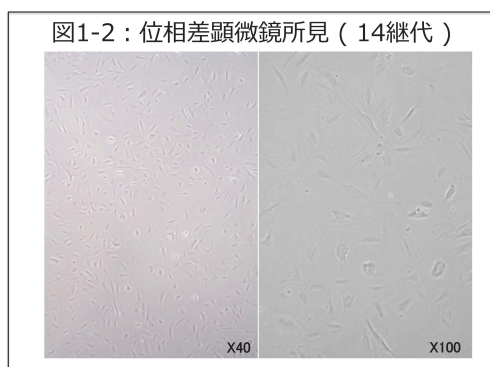
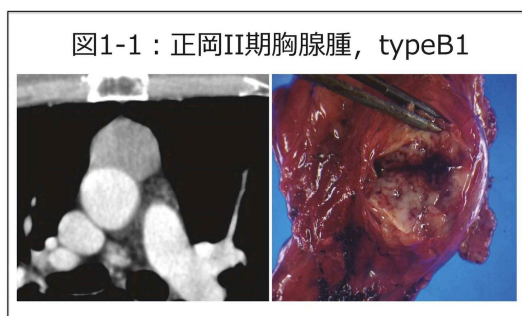
(当年度より研究代表者の勤務先が愛知県がんセンターから名古屋大学医学部附属病院に異動となった。これに伴い、研究体制(指導、研究設備)も大きく変化し、特に研究室は大幅な縮小となった。研究継続のためまず環境整備から開始し細胞培養を開始するために 5、6 ヶ月を要した)

平成 24 年度から細胞株の樹立に取りかかった。名古屋大学呼吸器外科で治療された胸部悪性腫瘍の切除標本あるいは胸水を用いて従来の培養法あるいは新しく開発された細胞培養法である CTOS 法を用いて微量な検体から細胞株樹立を試みる予定であったが、CTOS 法は物品の整備が間に合わず、従来の液体培地を用いた初代培養を開始した。約 1 年間で胸部悪性腫瘍 6 症例から切除標本を得ることができ、そのうち中皮腫と胸腺腫それぞれ 1 症例ずつで細胞株の樹立に成功した。ま

た現在も継代し続けている細胞もある。しかし、当施設において予定していた EGFR-TKI に対する耐性を獲得した肺癌臨床症例の組織標本を得ることができず、予定していた耐性細胞株の樹立ができなかった。

(2)平成 25 年度

引き続き細胞株樹立に向けた初代培養を継続した。当年度で 14 症例、合わせて 20 症例の手術検体を獲得し、培養を開始した。初代培養に成功したのは中皮腫と胸腺腫のみであり、細胞株を用いた EGFR に関連する遺伝子異常の有無の解析を行うことができなかった。しかしながら肺癌以外の胸部悪性腫瘍細胞株は比較的稀であり、免疫染色やマウスでの移植片作成などを行い細胞株の樹立を確認した。(図 1)



(3) 胸腺上皮性腫瘍由来細胞株樹立の試み

2012 年 9 月から 2013 年 12 月までに 20 例の胸腺上皮性腫瘍検体を得た。組織型は A : 1 例、AB : 3 例、B1 : 4 例、B2 : 6 例、B3 : 2 例、C : 4 例であった(表 1)。開始当初は細胞培養が困難であったため、培養液および様々な FBS 濃度を検討した結果 DMEM + 10% FBS において最も活発な腫瘍細胞の増殖を認めため同条件下で培養することとした。これまでに 10 代以上の継代培養を 4 検体(AB : 1 例、B1 : 2 例、C : 1 例)で施行し得た。安定して培養を継続しているものとしては 2 例あり、type C 由来の 1 例においては術後 4 か月で

12 代まで培養し、倍加時間は約 48 時間であった。(図 2) B1 由来の 1 例では術後 9 か月で 23 代まで培養し、倍加時間は約 60 時間。免疫染色では原発巣、培養細胞とも AE1/AE3(陽性)、CD3(弱陽性)、CD20(陰性)でタンパク発現パターンが類似していた。(図 3)

全 20 例の培養継代数を図 4 に示す。初期の頃は 5 代程度で細胞が死滅することが多かったものの、培養液の選択や FBS 至適濃度を探索することで徐々に安定した培養が可能になった。

表1：培養した検体の組織型

	組織型 (WHO)				
	A	AB	B1	B2	B3
腫瘍組織	2	3	5	7	
腫瘍組織 および 胸水細胞				1	2
計	2	3	5	8	2

図 2：増殖曲線

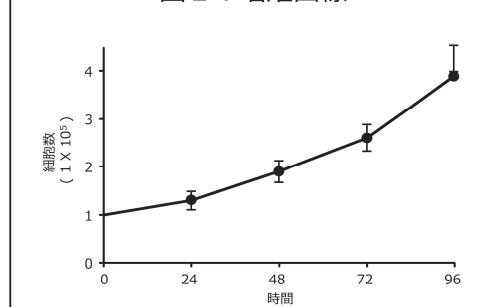
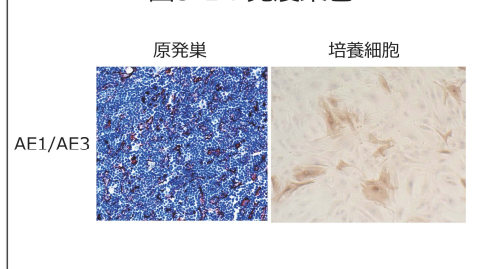
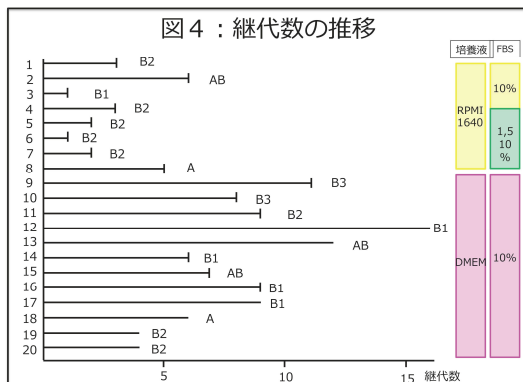
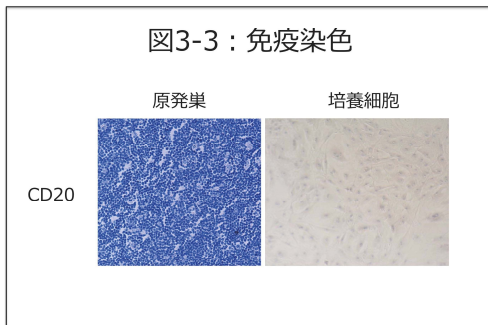
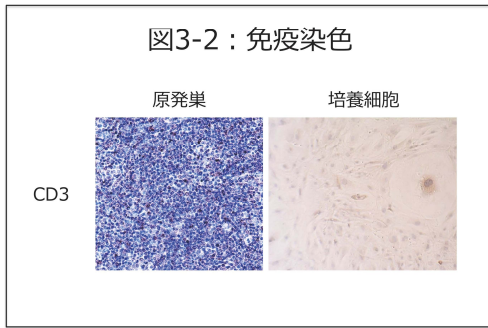


図3-1：免疫染色





(4) マウスでの腫瘍組織形成実験

ヌードマウス (KSN/Slc) の左側腹部皮下に胸腺腫細胞株を注入し腫瘍形成能の確認およびゼノグラフトモデルの確立を試みる。また、腹腔にも注入し皮下と同様に腫瘍形成能の評価、臨床上も問題となる播種モデルの確立を試みる。

過去の報告では SCID マウス皮下に投与した場合で胸腺腫では 1×10^7 注入した場合で腫瘍組織が形成されるまでの期間は 100-150 日と報告されており、本研究でも同等から倍程度の日数を予測して実験を施行した。

経過：10代以上継代できた細胞株 2 株を用いて 2 匹ずつ計 4 匹のマウスに上記の通り皮下、腹腔に細胞を注入した。最も長いもので現在まで 5 ヶ月程度 (約 150 日) 経過しているが、これまで腫瘍の形成は確認できていない。胸腺腫は臨床においても増大が緩徐であるのと同様に、in vivo での増殖速度が遅いことが考えられ、今後も胸腺腫組織形成についての検討が必要であると考えられる。

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 5 件)

Kawaguchi K, Taniguchi T, Usami N, Fukui T, Ishiguro F, Nakamura S, Yokoi K. FDG PET/CT is useful for detecting infiltration to the port site in patients with malignant pleural mesothelioma. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2014 62:157-162, 査読有り

DOI:10.1007/s11748-013-0345-y

Fukui T, Taniguchi T, Kawaguchi K, Yokoi K. Spontaneous regression of thymic epithelial tumours. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013 18:399-401, 査読有り

DOI:10.1093/icvts/ivt496

Fukui T, Yatabe Y, Kobayashi Y, Tomizawa K, Ito S, Hatooka S, Matsuo K, Mitsudomi T. Clinicoradiologic characteristics of patients with lung adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion oncogene. Lung Cancer. 2012 77:319-325, 査読有り

DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.03.013

(学会発表)(計 10 件)

石黒太志、谷口哲郎、宇佐美範恭、川口晃司、福井高幸、中村彰太、尾関直樹、加藤毅人、山谷千尋、横井香平。胸腺腫細胞株樹立の試み 第 33 回日本胸腺研究会 2014 年 2 月 8 日、東京大学(東京都文京区)

T. Fukui, Y. Sakao, T. Taniguchi, N. Usami, K. Kawaguchi, F. Ishiguro, S. Nakamura, K. Yokoi. A Comparison of Clinicopathologic Features and Survival Outcomes between the Lung Cancer Patients with Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma: Stage I Disease of Squamous Cell Carcinoma is there? 15th World Conference on Lung Cancer. 2013 年 10 月 28 日, Sydney, Australia

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 高幸 (FUKUI TAKAYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：70463198

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし