

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890041

研究課題名(和文) 分子標的薬使用を目指した肺がんのRET過剰発現・スプライシング異常の検査法の確立

研究課題名(英文) RET overexpression on lung cancer

研究代表者

春原 光宏 (Sunohara, Mitsuhiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00637697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：今回、チロシンキナーゼの一種であるRETを過剰発現している肺癌では予後が悪いことが示された。これは、mRNAの発現だけでなく、容易に検査可能な病理組織の免疫組織化学的検査によってしめされている。現在RETの融合遺伝子変異に対して臨床試験が行われているRETの阻害剤が、このようなRET過剰発現の肺癌においても効果が見られる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：RET protooncogene (RET) was a receptor type tyrosine kinase and this point mutation is famous for a cause of the medullary carcinoma of the thyroid. We demonstrated that RET-overexpression was a poor prognostic factor in lung cancer. This was confirmed by using quantitative RT-PCR of the surgically resected samples and using immunohistochemistry assay (IHC) of the pathological specimen. Now, some tyrosine kinases targeting RET was under clinical trial for the lung cancers harboring fusion genes of RET. We suggested that such tyrosine kinases may have some effect on the lung cancers with RET-overexpression.

研究分野：病態検査学

科研費の分科・細目：研究スタートアップ支援

キーワード：RET 肺癌 チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) RET - KIF5b の融合遺伝子は肺がんの約 5% においてがん遺伝子として作用しており、これが分子標的薬のターゲットとなることが示されている。

(2) しかしながら RET の過剰発現は予備実験にて肺がん全体の約 30% にみとめられた。

(3) また RET のスプライシング異常と考えられる mRNA が RACE 法で検出された。

2. 研究の目的

RET の過剰発現及び異常スプライシングによるタンパクが肺がんの予後に与える影響を調べるとともに、これが RET 阻害薬によって阻害されるのかを検討する。合わせてこの過剰発現などを臨床応用が可能な免疫組織学的染色などにて区別可能かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 予備実験で認められた RET の過剰発現を有する肺がんの臨床情報を検討する。

(2) RET を過剰発現あるいは siRNA にて knock down させた細胞株で、RET 及び EGFR 阻害薬である Vandetanib の IC50 を、3 種の肺腺がん細胞株 (A549, NCI-H23, NCI-H1650) を用いて検討する。測定には WST-8 を用いる。

(3) 予備実験で認められた cDNA レベルでの過剰発現以外に免疫組織学的染色にて同様な予後の変化が出るかを検討する。

4. 研究成果

(1)

過剰発現を認めた臨床検体 81 例を検討すると下記のような結果を認めた。

RET overexpression(+)		RET overexpression(-)
24 cases (29.6%)		57 cases (70.4%)
63.2 y.o.	Age	67.0 y.o.
66.7%	Male	68.4%
45.8%	Brinkman Index>200	66.1%
30.4±3.3 mm	Tumor size	33.4±2.8 mm
33.3%	LN metastasis	38.6%
87.5%	Adenocarcinoma	77.2%
58.3%	EGFR mutation**	24.6%

(2) RET を lenti virus を用いて過剰発現させて Vandetanib および EGFR 阻害薬である Gefitinib の IC50 の比を検討した。RET の過剰発現を起こすことによる relative resistance を検討すると、Gefitinib の IC50 は A549 では 1.34 倍、NCI-H23 では 1.85 倍、NCI-H1650 では 1.01 倍と差はあるもののいずれも Gefitinib が効きにくくなっていた。

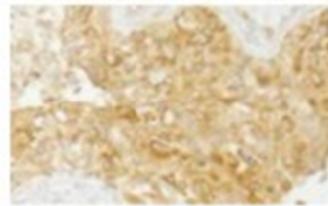
一方 RET, EGFR, VEGF のマルチキナーゼインヒビターである Vandetanib においては A549 では 0.759 倍、NCI-H23 では 1.61 倍、NCI-H1650 では 0.76 倍と Gefitinib の効きにくさを軽減させる効果が認められた。

(3) Web サイトにての比較検討を行い、Novocastra™ mouse mAb NCL-RET (Leica microsystems, Germany) を用いて検討を行った。免疫組織学的染色では数のように比較的良好な染色を得た。一部肺がんにおいては染色性が均一ではなかったため、その場合には最も強い染色部位を用いて解析を行った。

Overexpression (-)



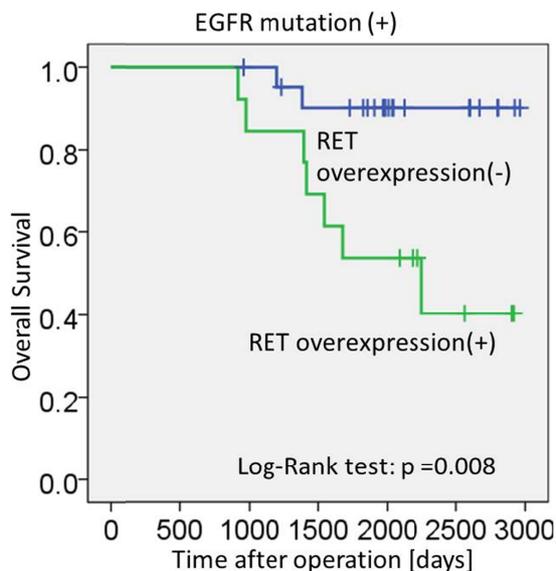
Overexpression (+)



結果下表のように組織系により大きく過剰発現の頻度が異なることとなった。すなわち、adenocarcinoma, LCNEC, pleomorphic carcinoma では 26-28% にみられるのに比べ、squamous cell carcinoma では 8% 程度、また小細胞がんにおいては過剰発現を認める癌は見られなかった。

組織型	N	過剰発現	%
adenocarcinoma	142	37	26
squamous cell carcinoma	152	12	7.9
LCNEC	7	2	28
Pleomorphic carcinoma	7	2	28
small cell	6	0	0

EGFR 変異陽性例に対して予後を検討したところ、RET の過剰発現群は有意に予後が不良であった。



上記結果について海外学会での発表を行うとともに、その所属学会の学会誌にて英文発表を行っている。現在追加実験を行い査読のある英文誌への投稿を準備しているところである。

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 2 件)

Sunohara M, Morita S, Kawakami M, Watanabe K, Kage H, Amano Y, Ishikawa

R, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, and Takai D. Abstract B22: Can lung cancer with overexpression of RET-proto oncogene be a good candidate for vandetanib treatment? Clin Cancer Res 20:B22, 2014 (査読なし)

M. Sunohara, M. Kawakami, K. Watanabe, S. Morita, H. Kage, Y. Amano, M. Fukayama, T. Nagase, N. Ohishi, D. Takai Vandetanib Can Overcome the Acquired Resistance to Gefitinib Due to RET Overexpression in Lung Cancer, Eur.J.Cancer. Suppl16:95, 2012. (査読なし)

〔学会発表〕(計 2 件)

AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. 2012 Sunohara M, Kawakami M, Watanabe K, Morita S, Kage H, Amano Y, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D Vandetanib can overcome the acquired resistance to gefitinib due to RET overexpression in lung cancer.

AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer2014 Sunohara M, Morita S, Kawakami M, Watanabe K, Kage H, Amano Y, Ishikawa R, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, and Takai D. Abstract B22: Can lung cancer with overexpression of RET-proto oncogene be a good candidate for vandetanib treatment?

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kokyuki.umin.jp/>

(現在業績については更新中)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

春原 光宏 (SUNOHARA, Mitsuhiro)

東京大学医学部附属病院呼吸器内科・助教

研究者番号：

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし