

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462174

研究課題名(和文) CDDP + VNRによる肺癌術後補助化学療法の治療効果に関する分子マーカーの検討

研究課題名(英文) The analysis of predictive markers for the efficacy of cisplatin and vinorelbine regimens as postoperative adjuvant chemotherapy of lung cancer

研究代表者

園部 誠 (SONOBE, Makoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00432378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌細胞株のVNR耐性株を作成し、最大100倍濃度でのIC50を示す細胞株群と親株とのトランスクリプトーム解析を行い、ABCB1遺伝子やECM-integrin-Src経路の有意な増幅を確認した。実際にこれら細胞株を用いて、VNR耐性における主要な耐性機序は、ABCB1の亢進であることを確認し、さらにFocal Adhesion PathwayとVRB耐性の関連についても、解析をすすめ、両者の活性化により、高度耐性化していることが確認された。ABCB1やSrcを単独もしくは、複合的に阻害することにより、高度耐性化を克服することができることが示された。

研究成果の概要(英文)：Vinorelbine(VNR)-resistant lung cancer cell line has been made by step-by-step dose escalation method. Whole transcriptome was compared between the parental and the VNR-resistant lines using cDNA microarray. The comparison showed the significant increase of expression of ABCB1 transporter gene and extracellular matrix-integrin-Src pathway genes. The activation of ABCB1, multi-drug resistant, transporter was confirmed to be one of the main acquired resistant mechanisms. Furthermore, the association of focal adhesion pathways with VNR-resistant mechanism was analyzed. Both mechanisms synergistically affected on VNR resistance of lung cancer cells, and their concomitant inhibition overcame the resistance. Clinical significance of the molecular expression of both pathways did not seen in the adjuvant settings of resected lung cancer patients. Our results were presented in some international or domestic conferences, and then, now prepared for being published.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：分子マーカー 補助化学療法

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌において根治切除は治癒を得るのに最も確実な方法である。しかし完全切除された原発性肺癌においても、およそ30%の例で再発を認める。特に病理病期II期、III期においては60%の例で再発を認める。再発率低下による治療成績の向上のため、術後補助化学療法がおこなわれてきた。近年、海外にて複数の無作為比較試験 (Arriagada et al. 2004, Winton et al. 2005, Douillard et al. 2006) およびそのメタアナリシスが行われ、シスプラチンをベースとした化学療法 (Pignon et al. 2008)、特にシスプラチン + ビノレルピン (Douillard et al. 2010) による化学療法が生存率を有意に改善させることが示された。それに基づき、現時点では完全切除病理病期II期、III期非小細胞肺癌の術後に術後補助療法を行うことは本邦のガイドライン (日本肺癌学会編、EBMの手法による肺癌診療ガイドライン) にも記載されている。また、シスプラチンベースの術後補助化学療法の治療効果を予測する分子マーカーとして、腫瘍組織の ERCC1 (Claussen et al. 2006) や、p53 関連の遺伝子発現 (Zhu et al. 2010) の発現が示唆されている。しかし本邦では病理病期II期、III期非小細胞肺癌に対する手術単独群をコントロール群とした術後補助化学療法の信頼できる無作為比較試験に乏しい (Ohta et al. 1993, Wada et al. 1996)。また、シスプラチン + ビノレルピン対シスプラチン + ペメトレキセドの術後補助化学療法の比較試験 (JIPANG 試験、当施設も参加)、および上皮成長因子受容体遺伝子変異陽性例を対象としたシスプラチン + ビノレルピン対ゲフィチニブの術後補助化学療法の比較試験 (WJOG6410L) はいずれも端緒についたばかりであり、その結果が出るのはおよそ8年先である。したがって本邦患者におい

て無作為比較試験に参加した患者を対象としてシスプラチンをベースとした術後補助化学療法の治療効果を予測する分子マーカーの検索が可能になるのはまだ先のこととなる。

2. 研究の目的

白金系抗癌薬やピンカアルカロイド系抗癌薬の感受性、耐性に関連すると考えられる遺伝子を同定し、これら遺伝子発現と、無再発生存率やその他の臨床データとの関連を検索する。治療効果の予測に関連する有用なマーカーの探索により、今後の非小細胞肺癌治療の個別化を目指した。

3. 研究の方法

肺癌細胞株でビノレルピン耐性株を作成し、親株との遺伝子発現の比較を行うことで、ビノレルピン耐性に影響を及ぼす分子およびその経路を予測する。細胞株を用いた *in vitro* での実験により、予測された分子およびその経路の耐性化に与える影響を確認する。

当施設で完全切除II期、III期非小細胞肺癌に対するシスプラチン + ビノレルピンによる術後補助化学療法の phase II 試験に参加した患者の腫瘍組織を使用し、完全切除II期、III期非小細胞肺癌に対するシスプラチン + ビノレルピンによる術後補助化学療法を受けた患者、および過去の同病期の患者から得ている腫瘍組織を用い、白金系抗癌薬やピンカアルカロイド系抗癌薬の感受性、あるいは耐性に関連すると考えられる遺伝子発現・遺伝子変異を計測する。これら遺伝子発現・遺伝子変異の結果と、無再発生存率、他の臨床病理学的データとの関連を検索し、臨床的に有用な治療感受性遺伝子あるいは耐性遺伝子を見出す。これを分子マーカーとし、この分子マーカーに基づいて層別化した術後補助化学療法の phase II 試験を計画した。

4. 研究成果

VRB 耐性における主要な耐性機序は ABCB1 の亢進であることは既に報告されているが、ECM-Integrin-Src 経路である Focal Adhesion Pathway と VRB 耐性の関連について詳細に検討した。まず ABCB1 阻害により H1299 や A549VNR 耐性株の耐性を克服することを示した。また A549 VNR 耐性株に対し siRNA を用いて Src, Fyn, ILK, ITGB3 それぞれのノックダウンを行い、特に Fyn のノックダウンによる耐性の克服がみられた。一方で ABCB1 と Src family kinase 阻害剤である Saracatinib の有効性が認められ、VRB 耐性における Focal Adhesion Pathway の関わりは示唆された。しかし、術後補助療法に CDDP と VNR を併用した肺癌切除例の原発巣に対するこれら経路の免疫染色においては、発現の多寡による無再発期間や生存期間に有意な影響がみられなかった。今後はさらに多角的な視点からの耐性機序解明および予後および効果予測マーカーの発見が求められる。

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 31 件)

- 1) Sonobe M, Date H, Wada H, Okubo K, Hamakawa H, Teramukai S, Matsumura A, Nakagawa T, Sumitomo SI, 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;146:788-95.
- 2) Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, Tsuruyama T, Travis WD, Date H, Haga H. Validation of the IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification for Prognosis and Association with EGFR and KRAS Gene Mutations: Analysis of 440 Japanese Patients. *J Thorac Oncol*. 2013;8:52-61. PubMed PMID: 23242438.
- 3) 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*. 2012 Dec 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23242819.
- 4) 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 Feb 28. doi:pii: S0003-4975(13)00116-1. 10.1016/j.athoracsur.2013.01.012. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23453740.
- 5) Morimura Y, Chen F, Sonobe M, Date H. Inspiratory and expiratory computed tomographic volumetry for lung volume reduction surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013 Mar 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23460599.
- 6) Fujimoto M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Koyanagi I, Aini W, Tsuruyama T, Date H, Haga H. Stromal plasma cells expressing immunoglobulin G4 subclass in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2013 Mar 1. doi:pii:S0046-8177(13)00016-6. 10.1016/j.humpath.2013.01.002. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23465276.
- 7) Sumiyoshi S, Yoshizawa A, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Tsuruyama T, Date H, Haga H. Pulmonary adenocarcinomas with micropapillary component significantly correlate with recurrence, but can be well controlled with EGFR tyrosine kinase inhibitors in the early stages. *Lung Cancer*. 2013 Apr 27. doi:pii:S0169-5002(13)00150-5. 10.1016/j.lungcan.2013.04.003. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23632273.
- 8) Ikeda M, Sonobe M, Bando T, Date H. Reconstruction of recurrent diaphragmatic eventration with an elongated polytetrafluoroethylene sheet. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013 May 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23644727.
- 9) Fujimoto M, Sumiyoshi S, Yoshizawa A, Sonobe M, Kobayashi M, Moriyoshi K, Kido A, Tanaka C, Koyanagi I, Date H, Haga H. SALL4 immunohistochemistry in non-small-cell lung carcinomas. *Histopathology*. 2014;64:309-11. doi:10.1111/his.12241.
- 10) 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.* 2013 Dec 31. pii: S0022-5223(13)01492-X. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.11.046.
- 11) Sakamoto J, Sonobe M, Kobayashi M, Ishikawa M, Kikuchi R, Nakajima D, Yamada T, Nakayama E, Takahashi T, Sato T, Chen F, Bando T, Date H. Prognostic factors for patients in postoperative brain metastases from surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol.* 2014;19:50-6. doi:10.1007/s10147-012-0503-8.
 - 12) Hamaji M, Omasa M, Chen F, Yamada T, Sato M, Menju T, Sato T, Aoyama A, Sonobe M, Bando T, Date H. Survival and treatments in patients with incompletely resected thymoma *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* December 9, 2013, doi: 10.1177/0218492313516116.
 - 13) Sonobe M, Handa T, Tanizawa K, Sato M, Sato T, Chen F, Omasa M, Bando T, Date H, Mishima M. Videothoracoscopy-assisted surgical lung biopsy for interstitial lung diseases. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2014 Mar 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24623116.
 - 14) Sonobe M, Yamada T, Sato M, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Omasa M, Bando T, Date H. Identification of Subsets of Patients with Favorable Prognosis After Recurrence in Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Mar 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24633668.
 - 15) Sonobe M, Okubo K, Teramukai S, Yanagihara K, Sato M, Sato T, Chen F, Sato K, Fujinaga T, Shoji T, Omasa M, Sakai H, Miyahara R, Bando T, Date H. Phase II study of adjuvant vinorelbine and cisplatin in Japanese patients with completely resected stage II and III non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;74:1199-206.
 - 16) Sumiyoshi S, Yoshizawa A, Sonobe M, Kobayashi M, Sato M, Fujimoto M, Tsuruyama T, Date H, Haga H. Non-terminal respiratory unit type lung adenocarcinoma has three distinct subtypes and is associated with poor prognosis. *Lung Cancer.* March 2014; [dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.03.013](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.03.013).
 - 17) Yano M, Yoshida J, Koike T, Kameyama K, Shimamoto A, Nishio W, Yoshimoto K, Utsumi T, Shiina T, Watanabe A, Yamato Y, Watanabe T, Takahashi Y, Sonobe M, Kuroda H, Oda M, Inoue M, Tanahashi M, Adachi H, Saito M, Hayashi M, Otsuka H, Mizobuchi T, Moriya Y, Takahashi M, Nishikawa S, Matsumura Y, Moriyama S, Nishiyama T, Fujii Y; on behalf of the Japanese Association for Chest Surgery. Survival of 1737 lobectomy-tolerable patients who underwent limited resection for cStage IA non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Apr 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24699203.
 - 18) Ikeda M, Bando T, Yamada T, Sato M, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, Date H. Clinical application of ET-Kyoto solution for lung transplantation. *Surg Today.* 2014 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24845738
 - 19) Hamaji M, Omasa M, Chen F, Yamada T, Sato M, Menju T, Sato T, Aoyama A, Sonobe M, Bando T, Date H. Survival and treatments in patients with incompletely resected thymoma. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2013 Dec 9. pii: 0218492313516116. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24887927.
 - 20) Sato M, Aoyama A, Yamada T, Menju T, Chen F, Sato T, Sonobe M, Omasa M, Date H. Thoracoscopic wedge lung resection using virtual-assisted lung mapping. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2014 Jun 12. pii: 0218492314539332. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24928645.
 - 21) Matsuoka T, Sonobe M, Date H. Intraoperative fine-needle aspiration biopsy (FNA) for lung cancer: diagnostic value and risk of pleural dissemination. *Surg Today.* 2014 Sep 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25223625.
 - 22) Ishikawa M, Sonobe M, Imamura N, Sowa T, Shikuma K, Date H. Expression of the GLI family genes is associated with tumor progression in advanced lung adenocarcinoma. *World J Surg Oncol.* 2014. Aug 8;12:253. doi:10.1186/1477-7819-12-253. PubMed PMID: 25103784.
 - 23) Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Uehara T, Fujimoto M, Tsuruyama T, Date H, Haga H. HER2 status in lung adenocarcinoma: A comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations. *Lung Cancer.* 2014 Sep;85(3):373-8. doi:10.1016/j.lungcan.2014.06.007. Epub 2014 Jul 7. PubMed PMID: 25047676.
 - 24) Hamaji M, Kojima F, Omasa M, Sozu T, Sato T, Chen F, Sonobe M, Date H. A meta-analysis of debulking surgery versus

- surgical biopsy for unresectable thymoma. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Jul 11. pii: ezu277. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 25015950.
- 25) Sumiyoshi S, Yoshizawa A, Sonobe M, Kobayashi M, Sato M, Fujimoto M, Tsuruyama T, Date H, Haga H. Non-terminal respiratory unit type lung adenocarcinoma has three distinct subtypes and is associated with poor prognosis. *Lung Cancer.* 2014 Jun;84(3):281-8. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.03.013. Epub 2014 Mar 27. PubMed PMID: 24725383.
- 26) Matsuo Y, Chen F, Hamaji M, Kawaguchi A, Ueki N, Nagata Y, Sonobe M, Morita S, Date H, Hiraoka M. Comparison of long-term survival outcomes between stereotactic body radiotherapy and sublobar resection for stage I non-small-cell lung cancer in patients at high risk for lobectomy: A propensity score matching analysis. *Eur J Cancer.* 2014 Nov;50(17):2932-8. doi: 10.1016/j.ejca.2014.09.006. Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25281527.
- 27) Sato M, Yamada T, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, Date H. Virtual-assisted lung mapping: outcome of 100 consecutive cases in a single institute. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Dec 24. pii: ezu490. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25539649
- 28) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun.* 2015 Jan 23;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. PubMed PMID: 25615526.
- 29) Ando T, Omasa M, Kondo T, Yamada T, Sato M, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Date H. Predictive factors of myasthenic crisis after extended thymectomy for patients with myasthenia gravis†. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015 Jan 24. pii: ezu530. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25618314.
- 30) Kitamura J, Uemura M, Kurozumi M, Sonobe M, Manabe T, Hiai H, Date H, Kinoshita K. Chronic Lung Injury by Constitutive Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase Leads to Focal Mucous Cell Metaplasia and Cancer. *PLoS One.* 2015 Feb 6;10(2):e0117986. doi: 10.1371/journal.pone.0117986. eCollection 2015. PubMed PMID: 25659078.
- 31) Hamaji M, Chen F, Matsuo Y, Kawaguchi A, Morita S, Ueki N, Sonobe M, Nagata Y, Hiraoka M, Date H. Video-Assisted Thoracoscopic Lobectomy Versus Stereotactic Radiotherapy for Stage I Lung Cancer. *Ann Thorac Surg.* 2015 Feb 5. pii: S0003-4975(14)02123-7. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.11.009. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25661580.
- 〔学会発表〕(計5件)
- 1) Hiroshi Date 21st European Conference on General Thoracic Surgery (May 26-29, 2013, Birmingham, England) 5th collaborative symposium on general thoracic surgery: Lung cancer - oligometastatic.
- 2) Hiroshi Date. 15th World Conference on Lung Cancer (October 27-30, 2013, Sydney, Australia) Tuesday's highlights of the day – surgery and staging.
- 3) Hiroshi Date. 94th Annual Meeting of American Association for Thoracic Surgery (April 26-30, Toronto) Long-term results after surgical treatment for 1,763 lung cancer patients with interstitial lung diseases – should it be done? Hiroshi Date, Toshihiko Sato, Satoshi Teramukai, Atsushi Watanabe, Kazuma Kishi, Masahito Ebina, Yukihiro Sugiyama, Haruhiko Kondo, The Japanese Association for Chest Surgery.
- 4) Hiroshi Date. 25th Annual Congress of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons in Aisa (November 12-15, 2015, Cebu, Philippines) Thoracic surgery symposium Surgical treatment for T4 lung

cancer. Hiroshi Date

5)Hiroshi Date, EACTS Academy

The surgical treatment of lung failure

(2015.11.16-18, Windsor UK)

Live lung reconsidered

〔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://www.thoracic-kyoto-u.gr.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

園部 誠 (DATE Hiroshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 60252962

(2)研究分担者

伊達 洋至 (DATE Hiroshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 60252962

(3)連携研究者