

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462202

研究課題名(和文) EML4-ALK、EGFR-TKI耐性の分子機構の解明と低侵襲診断技術の確立

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism for EML4-ALK/ EGFR-TKI resistance and establishment of less invasive diagnosis.

研究代表者

浦本 秀隆 (URAMOTO, Hidetaka)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90389445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌が悪性腫瘍の死亡率第1位である理由はその治療抵抗性にある。分子標的治療の開発によりある特定の集団に対して一定の効果があることが示されたが、当初奏効してもほぼ全症例で病態は再び進行する。本研究では臨床検体を用いて薬剤耐性の分子標的機構を解明するとともに、低侵襲診断技術の確立と臨床応用を目的とする。基礎検討の結果、MED12の分子標的薬剤への寄与が確認され、臨床検体89例における検索では92%の発現が確認された。また、低侵襲診断技術のために循環腫瘍細胞(CTC)に着目した。CellSearchに代わるCTC-Chipの検討では全血で約85%の腫瘍細胞捕捉率が得られ今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the leading cause of cancer deaths, which is mainly caused by its resistance to conventional treatment modalities. In fact, some targeting agents are very active to specific population of patients, but most patients who had once responded to these agents finally experience disease progression. The aim of the current study is to reveal biological mechanism of drug resistance using clinical materials, and to develop and establish clinically useful modalities to detect drug resistance. In the study, we identified MED12 as an important molecule associated with resistance to some targeting agents, and documented positive expression of MED12 in 92% of 89 lung cancer tissues. In addition, we have developed a novel detection system of circulating tumor cell (CTC). The CTC-chip system, an alternative of the CellSearch system, has provided sensitive efficiency of 85% in capturing tumor cells spiked in the blood, and can be potentially useful for clinical use.

研究分野：胸部外科学

キーワード：EML4-ALK EGFR-TKI 耐性 診断 循環腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

肺癌の死亡数は1960年以降年代とともに増加し、1998年には悪性腫瘍の中で第1位となった。今後、更に増加の一途をたどりその死亡数は20年後には現在の2倍になると予測されている。現在行われている肺癌の治療としては外科治療、化学療法、放射線治療などがあるが、それらを組み合わせた集学的治療をもってしても治療成績は悪く、いわゆる難治性癌である。最近、driver oncogenic mutation に関する知見は最近急速に蓄積されている。(Uramoto H, et al. Br J Cancer. 2007;96:857-63, Uramoto H, et al. Lung Cancer. 51:71-7, 2006. Uramoto H, et al. Anticancer Res. 32:3785-90.2012)。上記の知見は臨床の効果に直帰し、感受性バイオマーカーによる選別が直接、肺癌患者の個別化医療に繋がった。しかし、EM4-ALK および EGFR に対する TKI はたとえ、当初奏効しても完全寛解になることは極めてまれであり、ほぼ全症例で病態は進行する (Uramoto H, et al. Int J Clin Oncol. 2006;11:487-91, Uramoto H, et al. Lung Cancer. 2011;76:129-30)。さらに現時点ではそのような耐性関連分子をどの時期にどのような方法で測定すべきか、またその耐性バイオマーカーによってどのような治療戦略を企てるか、について明確な指針は存在しない。

2. 研究の目的

肺癌において個別化治療を行なう上で、EGFR 遺伝子変異は TKI の投与対象の選択基準となり、肺癌の個別化治療が確立しつつあることを過去に報告してきた。また耐性化の意義 (Uramoto H, et al. Int J Clin Oncol. 2006;11:487-91) さらに初期耐性に関する新規遺伝子変異の同定を報告した (Uramoto H, et al. Anticancer Res. 2007 27:2297-303) また外科教室に属するため手術標本を用いて EGFR-TKI 耐性関連遺伝子の発現とその生物学的意義 (Onitsuka T, Uramoto H, et al. J Thorac Oncol. 2010;5:591-6)、及び様々な耐性分子 profile を報告してきた (Onitsuka T, Uramoto H, et al. Lung Cancer 2010;68:198-203, Uramoto H, et al. Lung Cancer 2011;73:361-5. 2012 年度: 日本呼吸器外科学会 学会賞受賞)。さらに九州大学創薬腫瘍科学講座 小野真弓教授との共同研究にて PTEN の発現低下その上流の転写因子 EGR-1 の発現欠失が EGFR-TKI 獲得耐性に重要な意味を持つことを報告した (Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, Nakashima K, Kage M, Uramoto H, et al. Cancer Res 2010;70:8715-25)。さらに多施設より EGFR-TKI 前後の組織がそろった症例を集積し、耐性関連分子の予後に与える影響を報告した (Uramoto H, et al. Lung Cancer. 2011;76:129-30, Uramoto H, et al. Anticancer Res. 32:3785-90.2012)。また、最

近我々はオランダの National cancer institute の Bernard 博士と共同研究により MED12 が TGF signaling の上流にあり、EGFR-TKI 及び EM4-ALK-TKI のみならず、MEK や B-raf の阻害薬に対しても寄与することを世界で初めて見出した (Huang S, Hölzel M, Knijnenburg T, Andreas Schlicker A, McDermott U, Garnett M, Grenrum W, Sun C, Prahallad A, Floris H. Groenendij K, Mittempergher L, Nijkamp W, ten Dijke P, Uramoto H, et al. Cell 2012;151:937-50)。しかし、これらの遺伝子異常で分子標的治療薬に対する耐性の分子機構の全貌を捉えているとは考えていない。したがって包括的に調査には後述するようにそれに適した手法が必要であろうし、現在のような侵襲的生検を避け、そのスムーズな臨床応用のためにも可能な限り、患者に負担をかけないように低侵襲診断技術の確立を目指さねばならない。

3. 研究の方法

(1) Tissue micro array を利用し、EM4-ALK 及び EGFR 獲得耐性症例の群間の耐性関連遺伝子の比較を行う。これにより包括的な薬剤耐性関連分子のピックアップが可能となる。

(2) 肺癌細胞株を用いて上記発見分子の検証を in vitro で行う。

(3) 後方視的に EM4-ALK 及び EGFR-TKI 耐性遺伝子異常による生存期間の解析を多施設共同研究として行う。

(4) 進行、再発肺腺癌に対する EGFR-TKI 耐性症例の S-1+EGFR-TKI 療法の第 II 相試験を実行する。主要評価に無増悪生存期間、副次的評価に奏効率、全生存期間、有害事象の他、耐性関連遺伝子の発現と治療効果の関連を含む。つまり、獲得耐性時の生検材料のみならず、比較的観便に採取できる末梢血液検体を必須とした protocol であり、translational research を目指す (UMIN 臨床試験登録 000006433)。

4. 研究成果

(1-2) micro array の内的妥当性のために、術後再発症例と非再発症例の比較を施行した。具体的には2005-11年の内に、当科で手術を施行した肺癌668例から、多発肺癌、重複癌235例、不完全切除もしくは非治療切除の38例、胸腔内洗浄細胞診陽性、偽陽性20例、CEA C E A 2.5以上:112例、縮小手術21例を除いた242例から進行癌にもかかわらず、術後無再発の症例と早期癌にもかかわらず、術後再発症例を選別して、micro array (3D-Gene™ RNA extraction reagent obtained from a liquid sample kit (Toray Industries) を施行し、4倍以上の上昇があった93の遺伝子群を同定した。さらに A925LPE3 (EML4-ALK ヒト肺癌の骨転移、脳転移のイメージングモデル作成に利用した細胞

胞株: Cancer Sci. 2015;106:244-52) と A925L の細胞株を用いて同様の方法にて 4 倍以上の上昇があった 18 の遺伝子群を同定した。上記の方法にて得られた遺伝子群の重なりから TMPRSS4 という分子に焦点をあてて、その後の研究を進めた。161 人の臨床サンプルを用いた data では 93 (57.8%) に TMPRSS4 の高発現を認め、その発現はリンパ節転移と有意に相関していた。さらに術後再発とも相関があった ($p < 0.001$) (Anticancer Res. 2016;36:121-7)。これらの事象を踏まえ、EM4-ALK 及び EGFR 獲得耐性症例の群間の耐性関連遺伝子の比較をさらに行う予定である。

(3-4)

研究の一部として進行、再発非小細胞肺癌 (主に腺癌) に対する EGFR-TKI 耐性症例の S-1+EGFR-TKI 療法の第 II 相試験を計画し (UMIN 登録 000006433)、既に症例登録が蓄積されている。

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 28 件)

1. Yoshida T, Song L, Bai Y, Kinose F, Li J, Ohaegbulam KC, Muñoz-Antonia T, Qu X, Eschrich S, Uramoto H, Tanaka F, Nasarre P, Gemmill RM, Roche J, Drabkin HA, Haura EB. ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. PLoS One. 2016 Jan 20;11(1):e0147344. doi: 10.1371/journal.pone.0147344. eCollection 2016. 査読有
2. Chikaishi Y, Uramoto H, Koyanagi Y, Yamada S, Yano S, Tanaka F. TMPRSS4 Expression as a Marker of Recurrence in Patients with Lung Cancer. Anticancer Res. 2016;36:121-7. 査読有
3. Yokouchi H, Ishida T, Yamazaki S, Kikuchi H, Oizumi S, Uramoto H, Tanaka F, Harada M, Akie K, Sugaya F, Fujita Y, Fukuhara T, Takamura K, Kojima T, Harada T, Higuchi M, Matsuura Y, Honjo O, Minami Y, Watanabe N, Nishihara H, Suzuki H, Dosaka-Akita H, Isobe H, Nishimura M, Munakata M. Prognostic impact of clinical variables on surgically resected small-cell lung cancer: Results of a retrospective multicenter analysis (FIGHT002A and HOT1301A). Lung Cancer. 2015; S0169-5002(15)30079-9. Lung Cancer. 2015 Dec;90(3):548-53. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.010. Epub 2015 Oct 14. 査読有
4. Uramoto H, Kinoshita H. Careful diagnosis of aortic invasion in patients with lung cancer using modern diagnostic imaging. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(5):2105-3. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(5):2105-3. No abstract available. DOI : 10.7314/APJCP.2015.16.5.2105 査読有
5. Uramoto H, Okumura M, Endo S, Tanaka F, Yokomise H, Masuda M. The 30-day mortality and hospital mortality after chest surgery described in the annual reports published by the Japanese Association for Thoracic and Cardiovascular Surgery. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2015;63(5):279-83. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2015 May;63(5):279-83. doi: 10.1007/s11748-015-0524-0. Epub 2015 Feb 6. 査読有
6. Uramoto H, Nozu S, Nakajima Y, Kinoshita H. Possibility of determining the degree of adhesion of the lymph node to the pulmonary artery preoperatively. J Cardiothorac Surg. 2015 Jul 25;10:101 doi: 10.1186/s13019-015-0310-1. Open access 5 ページ 査読有
7. Uramoto H, Kinoshita H, Nakajima Y, Akiyama H. Easy Diagnosis of Aortic Invasion in Patients with Lung Cancer Using Cine Magnetic Resonance Imaging. Case Rep Oncol. 2015;8(2):308-11. doi: 10.1159/000438823. eCollection 2015 May-Aug. 査読有
8. Uramoto H, Yamada S, Nakajima Y, Kinoshita H. Comment on 'Simultaneous Stapling of Pulmonary Vein and Bronchus in Video-Assisted Thoracic Surgery Lobectomy'. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2015 Sep 22. doi: 10.5761/atcs.lte.15-00224 査読有
9. Uramoto H, Nakajima Y, Ohtaki K, Kinoshita H. Intraoperative ultrasound elastography has little diagnostic benefit for deeper tumours of the lung. Eur J Cardiothorac Surg. 2016 May;49(5):1538-9. doi: 10.1093/ejcts/ezv340. Epub 2015 Sep 28 査読有
10. Nanjo S, Nakagawa T, Takeuchi S, Kita K, Fukuda K, Nakada M, Uehara H, Nishihara H, Hara E, Uramoto H, Tanaka F, Yano S. In vivo imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a

- novel human EML4-ALK lung cancer cell line. *Cancer Sci.* 2015;106(3):244-52. doi: 10.1111/cas.12600. Epub 2015 Feb 17. 査読有
11. Kinoshita, Nakajima Y, Uramoto H, Anomalous pulmonary arterial supply to the pulmonary vein of the right lung: An extremely exceptional case of arterial vein fistulae. *Ann Thorac Surg.* 2015;100(5):1913. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.07.021. No abstract available. 査読有
 12. Zheng X, Zhou AX, Rouhi P, Uramoto H, Borén J, Cao Y, Pereira T, Akyürek LM, Poellinger L. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:2560-5. 査読有
 13. Kawatsu Y, Kitada S, Uramoto H, Zhi L, Takeda T, Kimura T, Horie S, Tanaka F, Sasaguri Y, Izumi H, Kohno K, Yamada S. The combination of strong expression of ZNF143 and high MIB-1 labelling index independently predicts shorter disease-specific survival in lung adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2014;110(10):2583-92. 査読有
 14. Uramoto H, Tanaka F. What is an appropriate material to use with a covering technique to prevent the recurrence of spontaneous pneumothorax? *J Cardiothorac Surg.* 2014;9(1):74. 査読有
 15. Uramoto H, Nakanishi R, Uchiyama A, Inoue M, Sugaya M, Iwata T, Ebi N, Hanagiri T, Tanaka F. A phase II trial of adjuvant chemotherapy with tri-weekly carboplatin plus docetaxel in patients with completely resected non-small cell lung cancer. *World Journal of Respirology.* 2014; 4: 1-7. 査読有
 16. Uramoto H, Shimokawa H, Tanaka F. Postoperative bleeding after surgery in patients with lung cancer. *Anticancer Res.* 2014;34:981-4. 査読有
 17. Uramoto H, Tanaka F. Salvage thoracic surgery in patients with primary lung cancer. *Lung cancer.* 2014;84(2):151-5 査読有
 18. Uramoto H, Tanaka F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC. *Translational Lung Cancer Research.* 2014 Aug;3(4):242-9. 査読有
 19. Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Ichiki Y, Tanaka F. Factors predicting the surgical outcome in patients with T3/4 lung cancer. *Surg Today.* 2014;44(12):2249-54. 査読有
 20. Iwanami T, Uramoto H, Nakagawa M, Shimokawa H, Yamada S, Kohno K, Tanaka F. Clinical Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Markers in Malignant Pleural Mesothelioma. *Oncology.* 2014;86:109-116. 査読有
 21. Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Yamada S, Tanaka F. An EGFR-GEP100-Arf6 axis affects the prognosis of lung adenocarcinoma. *Oncology.* 2014;86:263-70. 査読有
 22. Chikaishi Y, Uramoto H, Oka S, Nagata S, Shimokawa H, So T, Yamada S, Hanagiri T, Mukae H, Tanaka F. Discrepancy between the Clinical Image and Pathological Findings of Non-Small Cell Lung Cancer Harboring an Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutation That Was Surgically Resected after Gefitinib Treatment. *Case Rep Oncol* 2014;7:126–131 査読有
 23. Suda K, Mizuuchi H, Murakami I, Uramoto H, Tanaka F, Sato K, Takemoto T, Iwasaki T, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. CRKL amplification is rare as a mechanism for acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancers with epidermal growth factor receptor mutation. *Lung Cancer.* 2014;85(2):147-51. 査読有
 24. Kanda R, Kawahara A, Watari K, Murakami Y, Sonoda K, Maeda M, Fujita H, Kage M, Uramoto H, Costa C, Kuwano M, Ono M. Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrinβ1/Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer Res* 2013;73:6243-53. 査読有
 25. Uramoto H, Yamada S, Tanaka F. Angiogenesis of Lung Cancer Utilizes Existing Blood Vessels Rather than Developing New Vessels Using Signals from Carcinogenesis. *2013 Anticancer Res.*;33:1913-6. 査読有
 26. Uramoto H, Tanaka F. Comment on “Association of EGFR mutation or ALK rearrangement with expression of DNA repair and synthesis genes in never-smoker women with pulmonary adenocarcinoma.” *Cancer.* 2013 119:2660 査読有
 27. Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Yasuda M, Chikaishi Y, Oka S, Shimokawa H, Nagata Y, Nakagawa M, Uramoto H, So T, Yamada S, Tanaka F. Serum Level of Osteopontin

as a Prognostic Factor in Patients Who Underwent Surgical Resection for Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2013;14:288-94. 査読有

28. Takenaka M, Uramoto H, Shimokawa H, So T, Hanagiri T, Aoki T, Tanaka F. Discriminative features of thin-slice CT for peripheral intrapulmonary lymph nodes. Asian J Surg. 2013;36:69-73. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Yoneda K, Chikaishi Y, Kawashima E, So T, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F: Capture of EpCAM-negative circulating tumor cells (CTCs) with a “Universal CTC-Chip”. American Association for Cancer Research. Philadelphia 2015 AACR Annual Meeting 2015, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania(USA).2015.4.18-22
2. 浦本秀隆: 症例提示: 化学放射線療法後救済手術が実施された肺腺癌の一例. 第 56 回日本肺癌学会学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市). 2015.11.26-28
3. 浦本秀隆: 症例提示: 左上葉管状切除、2 連続型気管支再建術及び肺動脈合併切除、再建を施行した左肺癌の 1 切除例. 第 56 回日本肺癌学会学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2015.11.26-28
4. 浦本秀隆: 症例に学ぶ最新診断・治療テクニック 特別シンポジウム: ハンズオン+症例提示. 第 56 回日本肺癌学会学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2015.11.26-28
5. 浦本秀隆, 竹中 賢、岡壮一、近石泰弘、平井文子、岩浪崇嗣、永田 好香、下川秀彦、宗 知子、花桐武志、田中文啓: ドライバー癌遺伝子変異耐性に関する分子機構と外科医の役割(シンポジウム: 肺癌の個別化医療時代における外科医の役割). 第 114 回日本外科学会総会 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府・京都市) 2014.4.3-4
6. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Hirai A, Iwanami T, Yoneda K, Shimokawa H, Nagata Y, Uramoto H, Ohnaga T, Tanaka F: Comparison of Cell Search with polymeric microfluidic devices for CTC isolation using EpCAM-negative tumor cell lines of malignant pleural mesothelioma. American Association for Cancer Research. San Diego(USA). 2014.4.5-9

7. 浦本秀隆、竹中 賢、近石泰弘、岡 壮一、平井文子、岩浪崇嗣、下川秀彦、宗知子、田中文啓: 原発性肺癌に対する救済手術. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会 福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル&ホール (福岡県・福岡市) 2014.9.30-10.3
8. 浦本秀隆、近石泰弘、米田和恵、宗知子、山田壮亮、田中文啓. 悪性胸膜中皮腫に対する低侵襲診断技術の確立. 第 32 回産業医科大学学会. 産業医科大学 ラマツイーニホール(福岡県・北九州市) 2014.10.4
9. 浦本秀隆、横内浩、西原広史、原田眞雄、山崎成夫、秋江研志、菊池 創、菅谷文子、藤田結花、高村圭、小島哲弥、原田敏之、樋口光徳、本庄 統、南 幸範、渡部直己、石田 卓、鈴木弘行、西村正治、棟方 充: 分子発現及び遺伝子変異プロファイリングによる小細胞肺癌切除例の臨床病理解析 (FIGHT002B 及び HOT1301B). 第 108 回 第 55 回日本肺癌学会学術集会 国立京都国際会館 (京都府・京都市) 2014.11.14-16
10. 浦本秀隆: IB 期 非小細胞肺癌: 外科治療 vs 重粒子線治療. 第 53 回日本肺癌学会九州支部学術集会、第 36 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会 (シンポジウム). 沖縄市町村自治会館 (沖縄県・那覇市) 2013.2.22
11. Chikaishi Y, So T, Oka S, Takenaka M, Nakagawa M, Shimokawa H, Iwata T, Nagata Y, Uramoto H, Hanagiri T, Ohnaga T, Tanaka F: Development of detecting systems for circulating tumor cells in malignant pleural mesothelioma patients. American Association for Cancer Research. Washington(USA) 2013.4.6-10
12. 浦本秀隆: 「融合遺伝子がもたらす新しいがん治療」TGF 経路による ALK 阻害剤耐性. 第 72 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム): パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2013.10.3-5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦本 秀隆 (URAMOTO, Hidetaka)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 9 0 3 8 9 4 4 5

(2) 研究分担者

宗 知子 (SO, Tomoko)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号: 0 0 3 4 1 5 2 9

田中 文啓 (TANAKA, Fumihiro)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283673