

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870736

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体阻害剤が腫瘍壊死因子の誘導する肺障害を増悪する機序の解明

研究課題名(英文) The potential mechanisms of EGFR-TKI induced lung injury in mice model

研究代表者

山岡 利光 (Yamaoka, Toshimitsu)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号：40384359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR は上皮性悪性腫瘍のみではなく正常肺組織でも発現しており、細胞・組織の恒常性維持という役割を担っている。肺癌治療薬として用いられるEGFR 阻害剤の急性肺障害が大きな問題となっているが、EGFR 阻害剤の正常肺組織に及ぼす影響や肺障害におけるTNF-EGFR シグナルの関与については、これまで明らかにされていない。本研究では、TNF により誘導されるEGFR 受容体のトランス活性化シグナルに焦点を当て、肺組織に特異的にTNFを高発現するSPC-TNFマウスとEGFR発現が生来低下しているEgfr-velマウスを用いて炎症性肺疾患の病態や急性増悪に及ぼす影響を明らかにする。

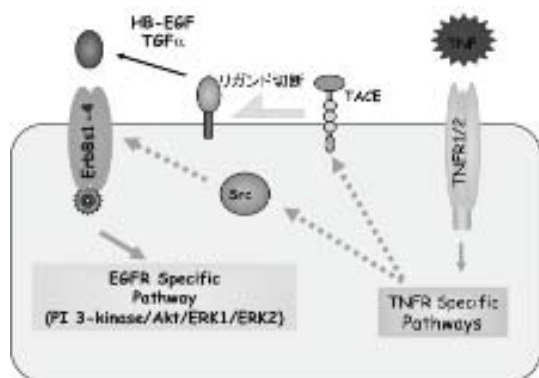
研究成果の概要(英文)：Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and other ErbB receptors; ErbB2-4, through cytokine and growth factor stimulation, are up-regulated in lung emphysema, pulmonary fibrosis and lung cancer, suggesting that the activation of ErbB receptors is response to emphysema, fibrosis and cancer in humans. TNF is a major inflammatory cytokine with many biological properties including both anti- and pro-apoptotic signaling pathways. However, the molecular switch, which determines TNF regulation of these two different functions, is not well characterized. We previously reported that EGFR and ErbB2 were transactivated by TNF via SRC kinase activity, which promotes the intestinal epithelial cell survival response to TNF. In this study, we elucidate the hypothesis that EGFR/ErbBs activity regulates TNF-mediated bronchial epithelial cell survival and inhibition of EGFR tyrosine kinase activity increase bronchial epithelial cell apoptosis, then finally fibrosing lung tissues in SP-C/TNF tg mice.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：上皮成長因子受容体阻害剤 腫瘍壊死因子 肺障害

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth factor Receptor: EGFR) とそのファミリー受容体である ErbB2 (HER2)が、炎症性サイトカインであり強力なアポトーシス誘導能を有する腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor: TNF) から間接的に活性化 (トランス活性化: 下図参照) を受けることにより、上皮細胞をアポトーシスから保護していることを報告した (Yamaoka et al. PNAS 2008)。EGFR は、その過剰発現や過剰な活性化が発癌との関連が報告され、多く癌種で治療標的とされている。一方で、正常組織においては、炎症などによる組織損傷から細胞を保護し再生させる役割を担っていると考えられる。



炎症性サイトカインである TNF は、線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生に促進的に作用している (Aggarwal et al. Eur Cytokine 1996)。また抗 TNF 抗体は、ブレオマイシン誘導肺障害マウスモデルで肺線維化に対して抑制効果を有することから (Piguat et al. J Exp Med 1989)、TNF は間質性肺炎の病態発生や進展機序において中心的な役割を担っていると考えられる。急性肺障害の発症においては、肺組織におけるアポトーシス誘導の重要性が指摘されているが、疾患の発症・増悪の分子機構については、十分な理解が進んでいない。さらに、EGFR 阻害剤の致死的有害事象である急性肺障害は、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を服用した患者の 5 から 6% に発生することが報告されており、この機序の解明と治療戦略の確立が強く望まれている。現在までに、ブレオマイシンの誘導する肺線維症マウスモデルにおいて、EGFR 阻害剤が、熱ショックタンパク質 70 (HSP70) の転写を阻害することで肺障害を促進することが報告されている (Namba et al. PLoS One 2011)。さらにナフタレン投与により誘導される肺障害を EGFR 阻害剤が促進することが示されている (Harada et al. Am J Respir Crit Care Med 2011)。しかし、なぜ EGFR 阻害剤が単独で肺がん患者に比較的高率に肺障害を発症するのかについては、十分に明らかにされていない。

そこで我々は、肺組織特異的に TNF を高

発現し肺の気腫化と緩徐な線維化を示す SPC-TNF トランスジェニックマウス (以下、SPC-TNF マウス) (Miyazaki et al J Clin Invest. 1995) を用いて、EGFR 阻害剤投与により肺障害が増悪されるかを検討した。その結果、EGFR-TKI, gefitinib が、SPC-TNF マウスの肺障害を著しく増悪させる事を見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、SPC-TNF マウスに、EGFR の発現が生来に低下した *Egfr*^{Vel/J} マウスを交配する事で、双方の特質を有する TNF/*Egfr* マウスを作成し、その形質を明らかにする事で肺障害に及ぼす TNF と EGFR の役割を明らかにする事を目的とした。

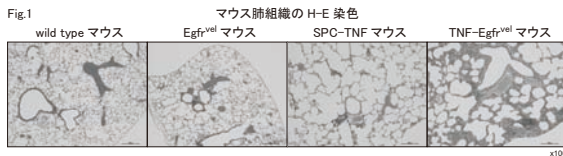
3. 研究の方法

本研究計画では、肺障害発症の分子機序を明らかにし、発症危険因子の同定や発症した際の治療戦略を確立するために、(1)EGFR 阻害剤を SPC/TNF トランスジェニックマウスに投与することにより生じる肺障害の分子生物学的機序を解明する。(2)新規肺障害マウスモデルを作成し、肺障害の進展機序を検討する。本研究では、EGFR-TKI の非特異的な作用を排除した解析を行う事を目的として SPC-TNF マウスと *Egfr*^{wa2} マウスの 2 種の遺伝子操作動物を用い、交配し双方の形質を発現したマウスを作成する。これにより、SPC-TNF マウスでは、EGFR-TKI による肺障害を薬学的見地から解析する事ができる。一方、TNF *Egfr*^{wa2} マウスでは、EGFR-TKI の非特異的な作用を排除した解析を行う事が出来る。新規肺障害モデルマウスの作製において、当初は、SPC-TNF マウスと *Egfr*^{wa2} マウスを交配させる予定であったが、*Egfr*^{wa2} マウスが、Jackson 研究所で発育不良のために入手困難となり、入手可能なマウスとして、*Egfr*^{vel1}/*J* マウスを使用した。

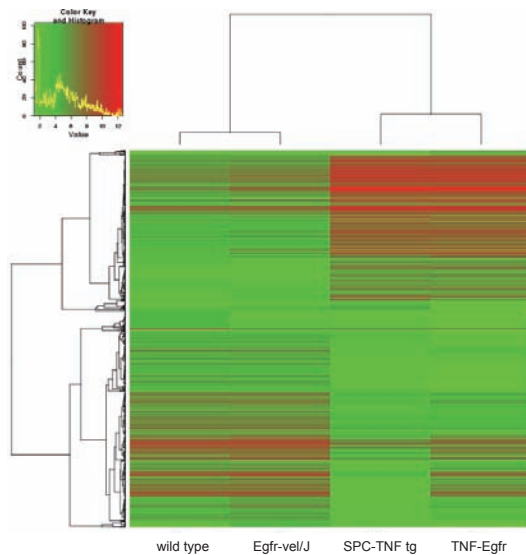
4. 研究成果

肺組織特異的に TNF を高発現し慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 様の病理所見を示す SPC-TNF マウスに生来 EGFR の発現が低下している *Egfr*^{vel1} マウスを交配させることにより、肺組織で TNF が高発現し、かつ EGFR の発現が抑制された新規肺障害モデルマウス (TNF-*Egfr*^{vel1} マウス) を作製した。このマウスの肺を摘出し、ホルマリン固定後、パラフィンに包埋し薄切片を H-E 染色した。その結果、このマウスでは、SPC-TNF マウスで観察される COPD 様病理所見である肺胞隔壁の破壊と末梢気道壁の肥厚に加えて、肺胞中隔への著しいリンパ球やマクロファージの浸潤を認めた。慢性炎症の持続は癌の発生との関連が報告されているが、この新規肺障害モデルマウス (TNF-*Egfr*^{vel1} マウス) では、腫瘍の発生は観察されなかった。(組織像は、以下を参照)

Fig.1



EGFR は上皮性悪性腫瘍のみではなく正常肺組織でも発現しており、細胞・組織の恒常性維持という役割を担っている。肺がん治療薬として用いられる EGFR 阻害剤の急性肺障害が大きな問題となっているが、EGFR 阻害剤の正常肺組織に及ぼす影響や肺障害における TNF-EGFR シグナルの関与については、これまで明らかにされていない。われわれは、本研究において、TNF-Egfr^{ve1} マウスにおける著しい肺障害の発生機序を検討する目的で、野生型、SPC-TNF、Egfr^{ve1}、TNF-Egfr^{ve1} のそれぞれから肺組織を摘出し、肺組織から RNA を抽出し、RNA 発現アレーを施行した（以下図参照）。現在、これらの情報から肺障害に寄与する事が想定される因子の抽出を施行している。



さらにこれらの本研究では、TNF により誘導される EGFR 受容体のトランス活性化シグナルに焦点を当て、炎症性肺疾患の病態や急性増悪に及ぼす影響を明らかにする。本研究により、EGFR 阻害剤の正常肺組織に及ぼす影響と肺障害を誘導する分子機構が明らかになると期待される。さらに、特発性間質性肺炎、肺線維症といった難治性慢性炎症性肺疾患の治療指針に重要な示唆を与える結果が得られるものと考えられる。

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 2 件）

- ① Hirose T, Fujita K, Kusumoto S, Oki Y, Murata Y, Sugiyama T, Ishida H, Shirai T, Nakashima M, Yamaoka T, Okuda K, Ohmori T, Sasaki Y. Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016. 93:69-76. doi:10.1016/j.lungcan.2016.01.005. 査読 有
- ② Yoko Toba-Ichihashi, Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, Motoi Ohba. Up-regulation of Syndecan-4 contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2016. 5:1-7. doi:10.1016/j.bbrep.2015.11.021 査読 有

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 岸野 康成, 村田 泰規, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 白井 崇生, 濱田 和幸, 山岡 利光, 片岡 大輔, 山本 滋, 大西 司, 大森 亨, 佐々木 康綱, 門倉 光隆, 相良 博典. 肺癌患者における COPD の有無による合併症・併存症の比較検討. 第 56 回日本肺癌学会学術集会. (2015.11 横浜)
- ② 廣瀬 敬, 藤田 健一, 大木 康成, 村田 泰則, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 石田 博雄, 白井 崇生, 中嶋 賢尚, 山岡 利光, 奥田 健太郎, 大森 亨, 佐々木 康綱, 田村 厚久, 大田 健. 進行非小細胞肺癌における EGFR-TKI による薬剤性肺障害と薬物動態および薬理遺伝子多型の関連性の検討. 第 56 回日本肺癌学会学術集会. (2015.11 横浜)
- ③ 廣瀬 敬, 藤田 健一, 楠本 壮二郎, 白井 崇生, 村田 泰則, 大木 康成, 杉山 智英, 石田 博雄, 中嶋 賢尚, 山岡 利光, 佐々木 康綱, 田村 厚久, 大田 健. 非小細胞肺癌 分子標的治療 非小細胞肺癌に対する gefitinib の有効性、毒性と薬物動態、薬理遺伝学的検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会. (2015.4 東京)
- ④ 廣瀬 敬, 藤田 健一, 楠本 壮二郎, 白井 崇生, 村田 泰則, 大木 康成, 杉山 智英, 石田 博雄, 中嶋 賢尚, 山岡 利光, 奥田 健太郎, 大西 司, 大森 亨, 佐々木 康綱, 田村 厚久, 大田 健. 非小細胞肺癌に対する gefitinib の毒性に影響を与える薬物動態、薬理遺伝学的検討. 第 55 回日本肺癌学会学術集会. (2014.10 京都)
- ⑤ 山岡 利光, 大森 亨, 大木 康成, 村田 泰規, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 白井 崇生, 廣瀬 敬, 大西 司, 佐々木 康綱. MET 高発現を示す EGFR-TKI 耐性 PC-9 細胞における MET 阻害剤耐性機序の検討. 第 55 回日本肺癌学会学術集会. (2014.10 京都)

⑥ 鈴木 俊宏, 永澤 生久子, 山岡 利光, 大森 亨, 西尾 和人, 小山 清隆, 小笠原 裕樹. ゲフィチニブ耐性細胞におけるキナーゼシグナルと miR-205 の関係. 第 73 回 日本癌学会学術総会. (2014.9 横浜)

⑦ 大場 基, 外谷 衣都子, 山岡 利光, 大森 亨, 佐々木 康綱. EGFR、MET の膜輸送を介した PKC η による肺腺癌細胞の増殖制御. 第 73 回 日本癌学会学術総会. (2014.9 横浜)

⑧ 山岡 利光, 大森 亨, 大木 康成, 村田 泰規, 楠本 壮二郎, 石田 博雄, 白井 崇生, 廣瀬 敬, 大西 司, 佐々木 康綱. SP-C/TNF トランスジェニックマウスモデルにおける EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による肺組織のアポトーシス誘導機構の検討. 第 73 回 日本癌学会学術総会. (2014.9 横浜)

⑨ 外谷 衣都子, 大場 基, 山岡 利光, 大森 亨, 佐々木 康綱. 非小細胞肺癌細胞における PKC η の E-cadherin 及び Integrin β 1 の局在制御. 第 73 回 日本癌学会学術総会. (2014.9 横浜)

[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://www10.showa-u.ac.jp/~molonco/index/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 利光 (YAMAOKA TOSHIMITSU)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号：40384359

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：