

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462130

研究課題名(和文) EGFRカスケードと5-FU代謝酵素のクロストーク解明による肺癌治療の個別化戦略

研究課題名(英文) Epidermal growth factor signals regulate dihydropyrimidine dehydrogenase expression in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer

研究代表者

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：80284686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NSCLCにおいてEGFR変異の有無が5-FU系抗癌剤の効果に関連するといわれている。今回、細胞株実験でEGFR変異株において5-FU代謝酵素(DPD)およびその転写因子(Sp1)のmRNA/タンパク発現が増加し、EGFR-TKIおよびSp1 inhibitorでDPD/Sp1の発現は抑制された。EGFR-TKIはEGFR変異株のみで因子を抑制した。元来5-FUはEGFR変異株で効きにくい傾向にあったが、EGFR-TKIの併用でcell viabilityの抑制が可能であった。EGFR-Sp1-DPDのクロストークが存在し、DPD発現はEGFR変異ステータスによって調整されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that EGFR mutation status is associated with 5-FU sensitivity in non-small-cell lung cancer (NSCLC). However, the relationship between EGFR mutation status and DPD, a 5-FU degrading enzyme, is unknown. In EGFR mutated cell, EGF treatment induced up-regulation of both Sp1 and DPD. EGFR-TKI and mithramycin A, a specific Sp-1 inhibitor, suppressed them. EGFR-TKI inhibited DPD protein expression only in EGFR-mutated cell lines. FU treatment decreased the level of cell viability more in gefitinib-treated EGFR-TKI sensitive cell lines. Further, combination treatment of FU and mithramycin A suppressed cell viability even in a gefitinib resistant cell line. The EGFR signal cascade regulates DPD expression via Sp1 in EGFR mutant cells. These results might be a step towards new therapies targeting Sp1 and DPD in NSCLC with different EGFR mutant status.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：非小細胞肺癌 Sp1 DPD EGFR

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) のリン酸化酵素阻害剤 (EGFR-TKI) は、非小細胞肺癌 (Non-Small-Cell Lung Cancer; NSCLC) におけるキードラッグであり、EGFR 変異を持つ NSCLC に効果がある。一方、代謝拮抗剤である 5-fluorouracil (5-FU) も NSCLC に対して有効な薬剤の一つである。Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) は 5-FU に変性をきたす代謝酵素の一つであり、その発現が高いほど 5-FU 系抗癌剤の効果が抑制される。われわれはこれまでの研究において、NSCLC の術後補助療法として 5-FU を内服した臨床症例を解析し、EGFR 変異と DPD 発現に関連性があることを示した。また、細胞株実験において、EGFR 変異を有する細胞株で DPD が高発現する傾向を認めた。しかし、EGFR 変異と DPD 発現を関連付ける詳細なメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

今回 EGFR カスケード、DPD 遺伝子の恒常的な発現を調整する転写因子の一つである Specificity protein 1 (Sp1) に注目し、DPD 発現との関連について細胞株を用いて検討した。

3. 研究の方法

対象

EGFR 変異形式の異なる 5 つの NSCLC 細胞株を使用した (EGFR 変異株 (PC9, HCC827; exon19 E746-A75Q EGFR-TKI 感受性) H1975; exon21 L858R, T790M (EGFR-TKI 耐性)、EGFR 野生株 (H1437, H1299 (EGFR-TKI 抵抗性))。

方法

(1) EGFR カスケードと DPD のクロストーク解明

EGFR カスケードの activator として EGF を使用した。inhibitor は、カスケードの上流を抑制する EGFR-TKI と下流で転写因子を抑制する mithramycin A を使用した。上記薬剤を投与した細胞から RNA を抽出し定量的 PCR 法で Sp1 / DPD の mRNA 発現を評価した。また、細胞からタンパクを抽出し Sp1 / DPD とその上流に存在する因子 (Extracellular signal-regulated kinase; ERK) のリン酸化および発現を Western blot 法にて評価した。

(2) EGFR 変異の有無における EGFR カスケード反応性の相違

EGFR 変異株 / 野生株 (PC9, HCC827, H1975 / H1437, H1299) のそれぞれに薬剤投与を行った後、EGFR カスケード内のシグナルリン酸化、および Sp1 / DPD の発現を Western blot 法にて評価した。

(3) NSCLC 細胞株に対する薬剤併用投与の

影響と有効性

各細胞株に対し 5-FU 単剤、5-FU + inhibitor (EGFR-TKI・mithramycin A) の併用投与を行い cell viability を WST-1 cell proliferation assay system を用いて評価した。

4. 研究成果

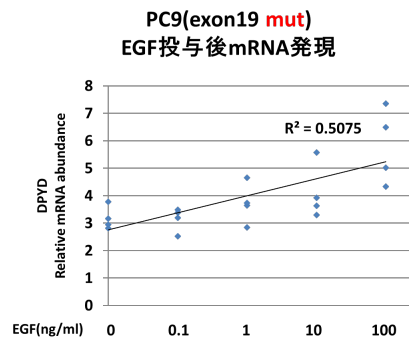
・カスケードの検索では、PC9 で EGF 投与により Sp1 / DPD のタンパク発現が濃度依存性に増加し、EGFR-TKI・mithramycin A 投与により発現が抑制された。また、上記 inhibitor 投与により Sp1 の転写活性が抑制された。

・EGFR 変異形式の異なる NSCLC 細胞株において、EGF 投与は EGFR 変異株のみで DPD の mRNA 発現を増加させた。

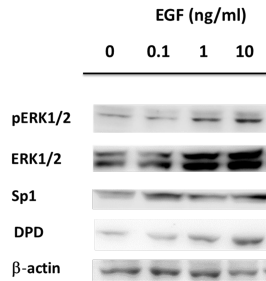
・EGFR-TKI・mithramycin A 投与は、EGFR 野生株と比較し EGFR 変異株において有意にアポトーシスを誘導し、Sp1 / DPD のタンパク発現を抑制していた。

・5-FU 投与は EGFR 変異株と比較し、DPD 発現の低い EGFR 野生株において有意に細胞増殖を抑制した。

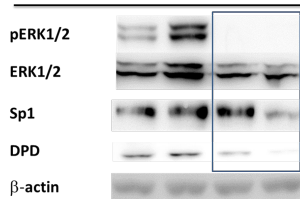
・5-FU に対して抵抗性を示す EGFR 変異株においては、5-FU と EGFR-TKI・mithramycin A の併用投与を行うことで、著明な細胞増殖抑制効果をもたらした。本研究において EGFR シグナルカスケードが転写因子 Sp1 を介して DPD の発現に関与していることが明らかとなった。また、EGFR 野生株と比較し変異株において DPD のタンパク発現が高く、EGFR 変異を有する患者が 5-FU に抵抗性を示す過去の報告を支持するものであった。上記カスケードは主に EGFR 変異株において発現し、野生型では殆ど活性化されていないものと考えられた。これらの結果から、EGFR 野生型の患者には 5-FU 単独治療、EGFR 変異型の患者には 5-FU+EGFR-TKI、EGFR-TKI に耐性 (T790M) を有する患者には 5-FU+mithramycin A の治療が有効と考えられる。本研究は、5-FU を用いた NSCLC 患者治療の個別化を考えるうえで有用と思われた。



PC9(exon19 mut)
EGF投与後protein発現

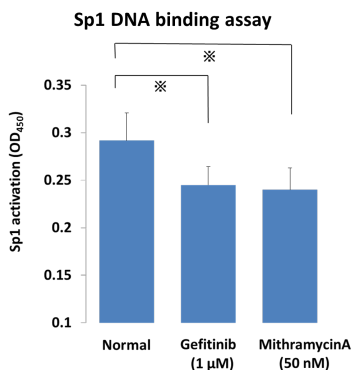
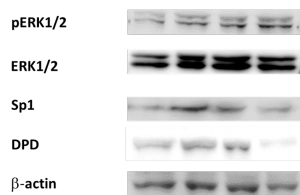


PC9(exon19 mut) Gefitinib投与
EGF (10 ng/ml) - + + +
Gefitinib (1 μM) - - + +
(time after treatment with gefitinib) 12 h 24 h

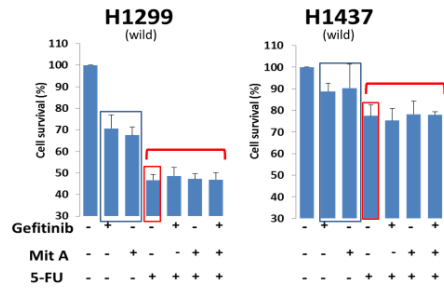


PC9(exon19 mut) MithramycinA投与

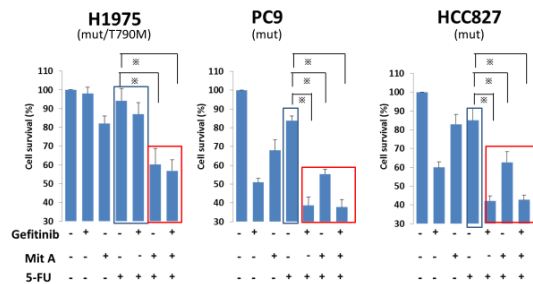
EGF (10 ng/ml) - + + +
Mithramycin A (50 nM) - - + +
(time after medication) 12 h 24 h



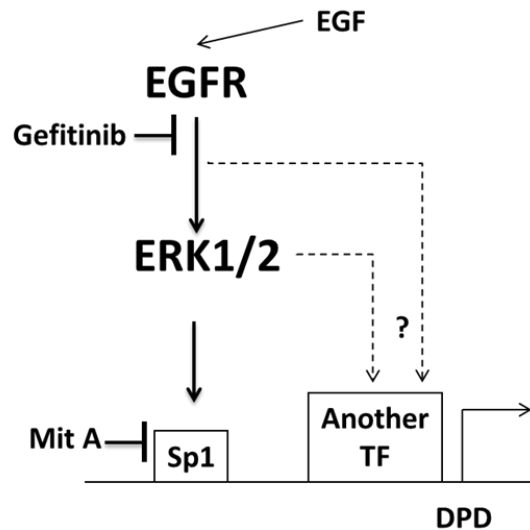
薬剂併用投与 (EGFR wild)



薬剂併用投与 (EGFR mut)



<Mutant type>



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1件)
Tetsuro Tominaga, Tomoshi Tsuchiya,
Koji Mochinaga, Junichi Arai, Naoya

Yamasaki, Keitaro Matsumoto, Takuro Miyazaki, Toshiya Nagasaki, Atsushi Nanashima, Kazuhiro Tsukamoto, Takeshi Nagayasu: Epidermal growth factor signals regulate dihydropyrimidine dehydrogenase expression in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. BMC cancer 16(1): 354, 2016 (査読有り)
〔学会発表〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授

研究者番号：80284686

(2) 研究分担者

土谷 智史 (TUCHIYA, Tomoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
准教授

研究者番号：30437884

日高 重和 (HIDAKA, Shigekazu)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
准教授

研究者番号：30380885

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし