

200720020A

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる
分子病態の解析とその臨床応用

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 立 松 正 衛

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用
..... 1
主任研究者 立松正衛

II. 分担研究報告

1. 消化器がんの発生・進展に関わる分子病態の解析..... 13
立松正衛 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部)
2. 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析 18
瀬戸加大 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部)
3. 胸部腫瘍の分子異常に対する分子標的治療研究 24
関戸好孝 (愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部)
4. ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる
細胞骨格・細胞分裂における分子基盤の検索 29
稲垣昌樹 (愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部)

I. 総括研究報告書

ヒト腫瘍の発生・発育・進展に関わる分子病態の解析とその臨床応用

主任研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨：本研究では (a) 消化器がんの進展・転移の分子病態の解明とその臨床応用、(b)造血器腫瘍および (c) 肺がんなどの難治がんにおける遺伝子異常のがん発生に於ける役割、ならびに (d) がんの浸潤や悪性化における細胞骨格分子の役割の解明を試みている。本年度の主たる成果は以下のごとく得られた。

(a) 胃がんにおける HER family の発現を免疫組織および CISH にて検討し、EGFR は HER2 に比べ頻度は低いものの原発 6%、腹膜転移巣 10%、肝転移巣 11% で高発現が認められること、Cetuximab, gefitinib は EGFR 高発現胃がんに対して in vitro において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さないが、ヌードマウス移植腫瘍に対しては Cetuximab は IL-2 との併用により有意な抗腫瘍効果を示すことを明らかにし、胃がんにおける EGFR の分子標的としての意義を示した。(b) 悪性リンパ腫の病因・病態に関与する遺伝子の単離、及びその診断への応用を図るため、アレイ CGH 法を用いて解析を進めた。胃 MALT リンパ腫について、除菌抵抗性 API2-MALT1 陰性群にはゲノムコピー数の異常が多いこと、眼付属器 MALT リンパ腫には API2-MAT1 キメラ遺伝子認められないかわりに特徴的な 6q23.3 領域の欠失があり、TNFAIP3 遺伝子はその責任遺伝子であることを明らかにした。また、末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL-U)についてもアレイ CGH 解析を行い、PTCL-U の中に ATL とよく似た疾患単位が存在する可能性を示唆した。(c) 胸部悪性腫瘍における病理組織型や遺伝子異常による DNA メチル化異常の違いを MCA アレイ法により網羅的に解析した。メチル化標的遺伝子のうち肺腺がんと中皮腫で多数の遺伝子が共通していた。EGFR 変異 (-) 肺腺がん群で高頻度に DNA メチル化異常の蓄積が認められ、EGFR 遺伝子異常の有無により DNA メチル化の違いが存在することが明らかになった。分子標的薬とがん抑制遺伝子群の機能回復を目指したエピジェネティクス治療薬の併用は、個々の腫瘍の遺伝子・エピジェネティクス異常の情報をもとに検討すべきことが強く示唆された。(d) ケラチン結合蛋白質アルバトロスが細胞間接着装置複合体の構築とラテラル（側面）ドメインの局在化に必要であること、この上皮細胞の極性化現象はアルバトロス/Par3（極性制御分子）複合体によって制御されること、一方、アルバトロスと複合体を形成しない Par3 はアピカル（頂部）ドメイン形成を制御するなど、がん細胞における骨格・細胞間接着の制御機構を明らかにした。またケラチン結合蛋白質トリコプレインを母中心小体の形成因子の一つとして同定し、その機能が微小管の母中心小体への係留であることをノックダウン実験から明らかにした。

分担研究者	所属施設名	職名
立松正衛	愛知県がんセンター研究所	副所長
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	部長
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	部長

A. 研究目的

(a) 胃がん原発、転移症例における HER family 発現を免疫組織学的に解析し、それに基づき HER2 高発現胃がんならびに EGFR 高発現胃がんの増殖・転移機構の解析と分子標的治療の開発を行う。

(b) 造血器腫瘍ではピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫ならびに眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式をアレイ CGH 法で解析し、特徴的ゲノム異常の有無を調べる。また末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式を調べ、分子疾患単位を確立する。

(c) 肺がんでは MCA アレイ法を用いた網羅的解析により胸部悪性腫瘍（肺腺がん と悪性胸膜中皮腫）における病理組織型や遺伝子異常による DNA メチル化などエピジェネティクス異常の違いを明らかにする。

(d) がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究では、上皮性のがんに特異的に発現するケラチンの新規結合蛋白質として同定したトリコプレインおよびアルバトロスが細胞骨格・細胞間接着装置を制御する分子メカニズムを解明し、新しいがん診断・治療の標的と成りうる蛋白質を検索する。

B. 研究方法

(a) 消化器がんの進展・転移における分子病態の解析

(1) 肝転移、腹膜転移を有する胃がん症例の原発巣 131 例と肝転移巣 9 例、腹膜転移巣 73 例における EGFR,HER2 の発現を免疫染色により検討し、さらに CISH (chromogenic in situ hybridization)法により遺伝子増幅の有無を明らかにする。(2) 独自に樹立した HER2 高発現胃がん細胞株 (GLM シリーズ)の in vivo 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Trastuzumab, Gefitinib に対する感受性を明らかにし、その分子基盤に基づき胃がんの転移に対する新しい分子標的治療法を構築する。(3) EGFR 高発現胃がん細胞株 (MKN-28, MKN-74)の in vivo 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Cetuximab, Gefitinib に対する感受性を明らかにし、その分子基盤に基づき EGFR 高発現胃がんに対する新しい分子標的治療法を構築する。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常の解析
(1)ピロリ除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫症例については、API2-MALT1 キメラ遺伝子のあるものを 10 症例、キメラ遺伝子がないものを 10 症例ずつ、除菌療法有効症例も同程度集め、ゲノム異常様式をアレイ CGH 法を用いて調べ、病態に特徴的なゲノム異常様式を見出す。(2) 眼付属器 MALT リンパ腫 24 症例についてアレイ CGH 解析し、特徴的なゲノム異常領域については、contig アレイ CGH グラスを作成し、詳細に検討することで、責任遺伝子を探索する。(3)末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U)症例をこれまでに確立した array CGH 法を用いて解析し、病型特異的なゲノム異常の有無を調べ、臨床病態、免疫病理組織学的解析結果と関連させることで、臨床的に意義のある疾患単位を見出せるかどうかを検定する。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常の解析
胸部悪性腫瘍組織（肺腺がん 17 例、悪性

胸膜中皮腫 20 例) 由来のゲノム DNA を用いた。肺腺がん 17 例のうち EGFR の変異を伴う症例は 8 例、伴わない症例は 9 例であった。制限酵素 SmaI (メチル化感受性), XmaI (メチル化非感受性)によって作り出した SmaI/XmaI 切断断片 (メチル化されたサイトに囲まれた DNA 断片) をアダプター特異的なプライマーを用い選択的に PCR 増幅した (Methylated CpG island Amplification; MCA 法)。腫瘍組織由来の増幅産物を Cy5、正常組織由来の増幅産物を Cy3 にてラベル化した後、我々が MCA-アレイ用にカスタマイズしたアジレント社のプロモーターアレイ (21K) にハイブリダイズさせシグナルを検出した。マイクロアレイの結果をクラスター解析により評価し、肺腺がん、中皮腫それぞれに特異的な DNA メチル化標的遺伝子を検討した。また、肺腺がんの EGFR 変異の有無と DNA メチル化との関連について解析を行った。

(d) がん細胞の増殖・浸潤にかかわる細胞骨格の研究

(1) アルバトロス、Par3 については、レトロウイルスを用いた RNA 干渉法の系で shRNA を A549 細胞に導入し、それぞれの発現が減弱した細胞を作成した。その状態で、各種細胞間接着装置の構成蛋白質および極性マーカーの局在変化を観察した。(2) トリコプレイン、ニナインについては siRNA を用いた RNA 干渉法を HeLa 細胞に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色を行った。また両者の結合については、イーストハイブリッド法およびタグ免疫沈降法で検討した。(3) ケラチンについては、ケラチン欠損上皮細胞 (SW13) にケラチンを発現させ、トリコプレインのイムノブロット、免疫染色および RT-PCR を行った。またケラチン 8 の siRNA を用いた RNA 干渉法を T24 細胞に対して行い、その発現を減弱さ

せた。

(倫理面への配慮)

実験に用いた患者検体は愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会および名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て実験に使用した。また遺伝子組換え実験に関しては遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。またレトロウイルス等を用いた実験は愛知県がんセンターの遺伝子研究倫理審査委員会で承認されたプロトコールに基づき、指定を受けた研究領域のみで使用しており、ヒトへの感染防御等十分な対策をとった。

C. 研究結果

(a) 消化器がんの進展・転移における分子病態の解析

(1) 胃がん原発、転移症例における HER family 発現の免疫組織学的解析

EGFR, HER2 の発現を免疫染色、CISH 法により検討したところ、HER2 高発現 (原発 31%、腹膜転移 17%、肝転移 66%) は EGFR 高発現 (原発 6%、腹膜転移 10%、肝転移 11%) に比べ肝転移症例において有意に高かった。また CISH 法により HER2 高発現肝転移巣における HER2 遺伝子増幅を検討したところ、6 例中 3 例で増幅が認められ HER2 が胃がん肝転移に対する有望な分子標的であることを確認した。さらに胃がんの原発巣と肝転移巣における HER2 高発現の一致率を検討したところ、見かけ上の一致率は 100% で、しかも Cohen の κ 係数は 1 と完全に一致しており、分子標的治療の適応判定に際しては原発巣切除標本での判定が可能であることも判明した。一方、原発巣と腹膜転移巣での EGFR 高発現の見かけ上の一致率は 87.1%、 κ 係数は 0.12 で、有意な一致はなく、また腹膜転移巣で EGFR の発現した症

例は予後不良であったことから、分子標的治療の適応判定に際しては腹膜転移巣の免疫染色標本を用いた治療適応の判定が必要であることが示唆された。

(2) HER2 高発現胃癌に対する増殖・転移機構の解析と分子標的治療法の開発

肝転移巣から独自に樹立した HER2 高発現胃癌細胞株 3 株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) および既存の肝転移巣由来胃癌細胞株 NCI-N87 では HER family 下流のシグナル伝達経路として PI3K/Akt 経路が恒常的に活性化されており、HER2 高発現胃癌細胞株はその生存を HER2 過剰発現によって活性化された PI3K/Akt 経路に依存している事を明らかにしてきた (oncogene addiction)。

これら HER2 高発現胃癌細胞株に対する Trastuzumab 感受性を調べたところ、in vitro において軽〜中等度の増殖抑制とアポトーシス誘導および Akt のリン酸化抑制が認められた。またヌードマウス腹腔内接種による腹膜転移に対しては抗体単独で顕著な転移抑制が認められた。ヒト末梢血単核球およびマウス脾臓細胞を Effector 細胞として Trastuzumab による抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を ⁵¹Cr release assay により検討したところ、HER2 低発現胃癌細胞に比べて、HER2 高発現胃癌細胞では ADCC 活性が高い傾向が認められた。以上のことから腹膜転移に対する抗腫瘍効果には HER2 高発現胃癌細胞の生存に必須な PI3K/Akt 経路の抑制と抗体依存性細胞障害 (ADCC) の両者が関与する可能性が示唆された。

3) EGFR 高発現胃癌に対する分子標的治療

次に EGFR 標的薬である Cetuximab, gefitinib の EGFR 高発現細胞株 MKN-28 (遺伝子変異、増幅を伴わない) に対する抗腫瘍効果を検討した。両者とも Erk1/2 のリン酸化は軽度に抑制するものの、in vitro

において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかった。一方、in vivo においては Cetuximab のみがヌードマウス皮下移植腫瘍および腹膜転移に対し有意な抗腫瘍効果を示し、これは IL-2 によって増強され、抗アジアロ GM-1 抗体により抑制された。ヒト健康人末梢血単核細胞を effector 細胞として Cetuximab による抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を検討したところ、有意な ADCC 活性を認め、これも IL-2 によって増強された。以上のことから Cetuximab は遺伝子変異、増幅を伴わない EGFR 高発現胃癌細胞に対し一定の抗腫瘍効果を示し、これには主として ADCC が関与すること明らかにした。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1) ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明

ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫症例は、全体の約 30% を占める。その半数には、API2-MALT1 キメラ遺伝子が存在することをこれまでに報告してきたが、キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗性の MALT リンパ腫については、特徴が明らかではなかった。そこで、API2-MALT1 陽性症例を 10 症例、キメラ遺伝子陰性症例 10 症例、比較対象として除菌療法有効症例 9 症例について、ゲノム異常様式をアレイ CGH 法を用いて調べた。アレイ CGH 法の検出感度は、X 染色体をマーカーにして、種々の割合で混合した DNA を用いて、検出限界を検討した。その結果、20% の腫瘍成分があれば、1 コピーのゲノムコピー数の以上を検出することができることが明らかとなった。その検出限界レベルで、胃 MALT リンパ腫症例をアレイ CGH 解析したところ、API2-MALT1 キメラ遺伝子を有する群には、ゲノムコピー数の変化はほとんど認められなかった。キメラ遺伝

子陰性除菌療法抵抗群では、10 症例中 7 症例にゲノムコピー数の異常が認められた。除菌療法反応症例では、9 症例中 1 症例にのみゲノムコピー数の異常を認めた。キメラ遺伝子陰性除菌療法抵抗症例群のゲノムコピー数異常頻度は有意差が認められた($p=0.02$)。

(2) 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式の解析

眼付属器 MALT リンパ腫 24 症例についてアレイ CGH 解析したところ、24 症例中 9 例において、6q23.3 領域の欠失が認められた。この欠失は、胃 MALT リンパ腫、肺 MALT リンパ腫、節性 MZBCL(MALT リンパ腫と同じ分化段階の B 細胞性リンパ腫でリンパ節で増殖する型)において認められず、眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的なゲノム異常であることが判明した。この領域について、約 3 Mb について、連続する BAC クローンを購入し、contig アレイ CGH グラスを作成し、詳細に検討したところ、共通欠失領域を約 600 kb にまで、狭めることができた。その領域には、TNFAIP3, PERP 遺伝子と 4 つの EST が存在していた。そこで、RT-PCR、ついで、Real Time RT-PCR で発現様式を検討したところ、ゲノムの欠失と相関して発現の減弱が認められたものは TNFAIP3 のみであり、この欠失領域の責任遺伝子であることが判明した。

(3) 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析

末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U (Unspecified))51 症例を解析したところ、29 症例に何らかのゲノム異常が認められ、22 症例にはまったくゲノム異常が認められなかった。ゲノム異常の有無と臨床病態とを比較したところ、ゲノム異常のある群は ATL リンパ腫型と同程度に極めて予後が悪く、ゲノム異常のない群は、予後が比較的良好であった。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常と発がんとの関連

胸部悪性腫瘍のうち肺腺がん 17 例、中皮腫 20 例で網羅的 DNA メチル化解析および EGFR 遺伝子変異との比較検討を行った。MCA-アレイ法を用い、制限酵素 XmaI 配列を 2 ヶ所以上プロモーター領域に有する 7702 遺伝子に関して検討を行った。Cy5/Cy3 (腫瘍由来 DNA / 正常組織由来 DNA) 比が 2 以上とすると高い感度・特異度でメチル化陽性遺伝子が検出可能であった。メチル化標的遺伝子数は肺腺がん平均 494 遺伝子、また中皮腫では 377 遺伝子であった。興味深いことに約 70%の DNA メチル化標的遺伝子が両疾患に共通しており高い相関が認められた($R^2=0.82$)。また肺腺がん症例には、高頻度に DNA メチル化が検出される症例が存在し、教師なし法によるクラスター解析で独自のクラスターを形成した。肺腺がん症例では各症例間で同一の遺伝子がメチル化するのに対して、中皮腫では症例間で異なった遺伝子がメチル化していた ($P=0.003$)。肺腺がんを高頻度にメチル化が検出された群は、EGFR 変異を伴わない腫瘍群に属し、変異を伴う腫瘍と比較し DNA メチル化が有意に多数の遺伝子で検出された(683 遺伝子 vs 284 遺伝子、 $P=0.007$) また MCA-アレイにより肺腺がん、中皮腫それぞれで特異的にメチル化する遺伝子が検出され、これらの遺伝子に設計した MSP 法を用いることにより、DNA メチル化の有無で両組織型の鑑別が可能であった。

(d) がんの浸潤や転移に関わる細胞骨格の研究

(1) アルバトロスの細胞内機能の解析

ケラチン結合蛋白質アルバトロスが細胞間接着装置複合体の構築および強固な接着に特異的に必要であることは見出して

いた。今回さらに、ノックダウン細胞では、E-カドヘリン、 β -カテニン、デスモグレイン2のラテラルドメインへの局在化が障害されていた。同時に、Par3の細胞間接着装置複合体への局在化も障害されていた。続いて、Par3とアルバトロスの結合がタグ免疫沈降により示された。さらにPar3ノックダウン細胞ではアルバトロスノックダウンと同様の表現型に加え、Ezrinのアピカルへの局在化が障害された。

(2) トリコプレインの細胞内機能の解析
ケラチン結合蛋白質トリコプレインの細胞内局在については、母中心小体の遠位端に局限していること、また当部位のappendageに微小管を係留させていることがわかっていたが、そのノックダウンにより、同部位からニナインが消失していることが確認された。また、ニナインのノックダウンでも同様の微小管の係留が障害された。トリコプレインとニナインの結合は、イーストハイブリッド法およびタグ免疫沈降法により示された。さらにケラチン欠損上皮細胞にケラチンを発現させ、トリコプレインのイムノブロット、免疫染色およびRT-PCRを行ったところ、そのmRNA量は変わることなく蛋白量が有意に増えた。また、ケラチン8をノックダウンしたT24細胞では、トリコプレインの蛋白量が減少していた。

D. 考察

(a) 消化器がんの進展と転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 胃がん原発、転移症例におけるHER family発現の免疫組織学的解析

今回、原発巣と転移巣におけるHER2発現を検討したところ、陽性率は原発31%、腹膜転移17%、肝転移66%で、肝転移は腹膜転移に比べて高率に陽性であった。さらに原発巣と肝転移巣におけるHER2高発現もよく一致した。これらの事実は

HER2が単なる標的マーカーではなく、血行性転移機構に密接に関連しており、HER2高発現胃がんが肝臓に転移しやすい可能性を示唆している。最近、転移に関与することが知られているCXCR4の発現がHER2によってup-regulateされることが報告されているが、実際、我々の肝転移巣由来HER2高発現胃がん細胞株でもHER2低発現胃がん細胞に比べCXCR4発現が高いことを確認している。一方、EGFR陽性率は原発6%、腹膜転移10%、肝転移11%と転移巣でも低く、また原発巣と転移巣での一致率も低く、EGFRと転移との関連性は低いと考えられる。しかし、腹膜転移巣でEGFRの高発現した症例は予後不良であったこと、動物実験からはCetuximab+IL-2に感受性であったことから腹膜転移に対する新しい分子標的治療の一つになりうる可能性が示唆された。

(2) HER2高発現胃がんに対する新しい分子標的治療法の開発

Trastuzumabは遺伝子増幅を伴うHER2高発現胃がん細胞に対してはin vitroでは軽度〜中等度の増殖抑制、アポトーシス誘導を示し、in vivoの腹膜転移に対しては単独でも顕著な転移抑制効果を有すること、これにHER2のDown regulationを介したPI3K/Aktシグナル伝達経路の抑制と抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の両者が関与する可能性を明らかにした。後者のADCC活性はNK細胞のFcR-III阻害により減弱することからNK細胞を介したものと考えられる。

一方、遺伝子増幅がない腹膜転移由来のHER2高発現胃がん細胞株(NUGC-4)に対して、GefitinibおよびTrastuzumabは単独ではアポトーシスを誘導せず、in vivoの腹膜転移に対しても単独では有意な効果はなく、両者併用で軽度の転移抑制を示すに過ぎなかった。従って、同じくHER2高発現胃がんであっても遺伝子増幅を伴

う肝転移由来細胞と伴わない腹膜転移由来の細胞では全く感受性が異なっていた。この感受性の違いが遺伝子増幅の有無によるものか、それとも転移巣の違いによるものかを明らかにするために現在、CISH法によりHER2高発現腹膜転移症例のHER2遺伝子増幅の有無を検討中である。

HER2高発現進行胃がんに対し、現在、化学療法にTrastuzumabを併用する群としない群で RCT臨床試験が国際共同の大規模な第III相試験 (TOGA study)として進められている。本スタディではFISH陽性を適格要件としているが上記の我々の結果からも合理的な選別と思われ、その結果が待たれるところである。胃がん肝転移の約半分はHER2高発現と考えられ、そのうちかなりの症例がHER2遺伝子増幅を有すると予想されることから、HER2を高発現する胃がん肝転移は胃がんに対する分子標的治療のなかで最も臨床応用に近く、かつ有望な対象と考えられる。今後、予後不良で有効な治療法がほとんどないこの胃がん肝転移に対し、GefitinibやTrastuzumab、さらに新しいHER family標的薬など作用機序の異なる薬剤を組み合わせた新しい分子標的治療法の確立が期待される。

(3) EGFR 高発現胃がんの増殖・転移機構の解析と分子標的治療

Cetuximab, gefitinib とも EGFR 高発現胃がんに対し *in vitro* において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかったにも関わらず、ヌードマウス移植腫瘍に対しては Cetuximab と IL-2 の併用が有意な抗腫瘍効果を示すことから、抗体依存性細胞障害(ADCC)活性が主として Cetuximab の抗腫瘍効果に関与することが明らかとなった。Cetuximab を用いた胃がんに対する分子標的治療法として現在化学療法との併用が臨床試験により検討されているが、IL-2 など NK 細胞を活性化

させるサイトカインとの併用は胃がんに関してはこれまでに報告はなく、EGFR も IL-2 と併用することで HER2 同様に胃がんに対する新しい分子標的治療法となりうる可能性を示した。

(b) 造血器腫瘍における遺伝子異常のがん発生に於ける役割

(1)ピロリ菌除菌療法抵抗性の胃 MALT リンパ腫の分子病態の解明

われわれはこれまで、MALT リンパ腫に特徴的な染色体転座 t(11;18)(q21;q21)を解析し、新規遺伝子 MALT1 を見出した。また、転座の本態が API2-MALT1 キメラ遺伝子を形成することであることも明らかにし、本キメラ遺伝子を有する胃 MALT リンパ腫症例は、ピロリ菌除菌療法抵抗群であることを明らかにした。その後の検索で、除菌療法抵抗群のうち、約半数にはキメラ遺伝子があることが判明した。しかし、キメラ遺伝子のない除菌療法抵抗性群については、その分子基盤が明確ではなかった。

今回の解析で、この群に有意にゲノムコピー数異常が多いことを見出したことは、除菌療法反応性のよいマーカーとなる可能性がある。しかし、現実の診療としては、まず除菌が第一選択であり、実地医療としての意義は少ない。むしろ、これらのゲノム異常から得られる今後の情報は、他の悪性度の高いリンパ腫について考察する上で、重要な手がかりを与え、意義が高い。すなわち、除菌抵抗性の胃 MALT リンパ腫に認められたゲノム異常領域は、リンパ腫の悪性度とはあまり関与せず、むしろ腫瘍化の初期変化である可能性が高い。事実、除菌療法有効症例で、ゲノムコピー数異常の認められる症例が 1 例あり、このゲノム異常は無効症例でも認められた。今後、除菌有効症例数を増やすことで、胃 MALT リンパ

腫におけるゲノムコピー数異常の意義を確立する必要がある。

(2) 眼付属器 MALT リンパ腫のゲノム異常様式の解析

眼付属器 MALT リンパ腫症例 24 症例中 9 例において認められた 6q23.3 領域の欠失は、他の臓器から発症する MALT リンパ腫には認められず、眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的なゲノム異常である。しかし、びまん性大細胞型リンパ腫をはじめ、6q 領域欠失は広く認められる異常である。この領域には少なくとも 3 箇所のゲノム異常領域があると考えられてきたが、今回我々が明らかにした 6q23.3 領域の責任遺伝子 TNFAIP3 は、6q 欠失領域から見出された初めてのがん抑制遺伝子である。この遺伝子が他のリンパ腫においても同様に腫瘍化に関与するかどうかは、重要な問題であり、今後、検討していく必要がある。

(3) 末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常様式の解析

末梢性 T 細胞リンパ腫 (PTCL-U (Unspecified))51 症例を解析したところ、29 症例に何らかのゲノム異常が認められ、22 症例にはまったくゲノム異常が認められなかった。ゲノム異常の有無と臨床病態とを比較したところ、ゲノム異常のある群は ATL リンパ腫型と同程度に極めて予後が悪く、ゲノム異常のない群は、予後が比較的良好であった。また、形態学的には核が多型で、CCR4 陽性である。これらの特徴は ATL リンパ腫型に認められる特徴であり、PTCL-U ゲノム異常型と ATL との意義付けが今後必要となってくる。すなわち、今回の研究が明らかにしたことは、ATL は HTLV1 ウイルスの感染の有無が診断の重要な判定要因となっているが、PTCL-U との違いはウイルスの有無だけであって、疾患としては同一という視点もありうることを示唆する。事実、PTCL-U

ゲノム異常陽性群のゲノム異常様式は、ATL リンパ腫型ときわめてよく似ている。今回の研究結果は、ATL の腫瘍化機構においても重要な示唆を与えるものである。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常の解析

DNA メチル化異常を迅速かつ高感度に網羅的に検出する MCA -アレイ法を用いて肺腺がんの中皮腫を解析し、そのメチル化異常の標的遺伝子、頻度、レベル等に関する比較検討を行った。MCA-アレイ法は、解析する遺伝子のプロモーター領域に SmaI/XmaI 制限酵素サイトが 2 個以上存在することが必要であり、すべての遺伝子プロモーター領域の検討はできないが、7702 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が半定量的かつ多数例を同時に解析できる点で優れていた。解析の結果、肺腺がんの中皮腫では、DNA メチル標的遺伝子が多数共通していた。両疾患は由来の異なる前駆細胞から発生した悪性腫瘍であるが、DNA メチル化により共通のがん関連遺伝子の不活化が関与しており、一般的な悪性形質獲得に関しては比較的共通した発がん経路が関与している可能性も示唆された。また EGFR 変異を伴う症例と比較し、EGFR 変異を伴わない肺腺がん症例で DNA メチル化が多数検出されたことから、DNA メチル化異常の蓄積は EGFR 変異を補完する発がん経路である可能性が示唆された。MCA-アレイ法による解析から胸部腫瘍における病理組織型や遺伝子変異の違いにより特異的にメチル化する遺伝子が複数同定され、合理的な治療戦略の確立のためだけでなく、これらの遺伝子のメチル化異常の違いをもとにした新しい診断法への応用も期待できると考えられた。

(d) がんの浸潤や転移に関わる細胞骨格の研

究

アルバトロスが細胞間接着装置複合体を制御する分子メカニズムについては、まずアルバトロス/Par3 複合体は細胞間接着装置複合体およびラテラルドメインを制御する。一方で、アルバトロスと結合しない Par3 はアピカルドメイン形成を制御することがわかった。トリコプレインが微小管の母中心小体への繫留を制御するメカニズムとしては、ニナインと協調している可能性が示された。また、ケラチンはトリコプレインを安定化し、母中心小体へのトリコプレインの安定供給に働くことがわかった。

今後はアルバトロスについても、ケラチンが及ぼす影響を、ケラチン欠損上皮細胞およびノックダウンの系を用いて検討していく。また、アルバトロスの結合蛋白質をイーストハイブリッド法、免疫沈降法およびプルダウンアッセイなどにより検索・同定していく。トリコプレインについては、それが一次繊毛形成におよぼす影響を検討する。さらに、これらのノックアウトマウスを作成し腫瘍形成能を検討する。それらの結果をもとに、がんにおいて今だ未知な細胞骨格・接着異常の分子メカニズムを明らかにし、将来的には診断・治療に役立てる予定である。

E. 結論

(a) 消化器がんの進展と転移における分子病態の解析と臨床応用

(1) 胃がん症例の原発巣、肝転移巣、腹膜転移巣における HER family の発現を免疫染色、CISH 法により検討し、EGFR,HER2 いずれも分子標的になりうるが、特に HER2 は HER 標的薬の有望な分子標的であることを確認した。

(2) Trastuzumab は遺伝子増幅を伴う HER2 高発現肝転移由来胃がん細胞に対する

強い抗腫瘍効果は HER2 の down regulation を介した PI3K/Akt シグナル伝達経路の抑制と ADCC の両者が関与する可能性を明らかにした。一方、遺伝子増幅を伴わない HER2 高発現腹膜転移由来細胞株では抗腫瘍効果は弱く、遺伝子増幅の有無が Trastuzumab 感受性に強く影響する可能性が示唆された。

(3) EGFR 高発現胃がん細胞に対しては Cetuximab, Gefitinib のうち Cetuximab のみが IL-2 との併用により有意な抗腫瘍効果を示し、これにはシグナル伝達阻害よりも NK 細胞を介した ADCC がより積極的に関与することを明らかにした。

(b) 造血器腫瘍の発生に関わる分子病態の解析

(1) 胃 MALT リンパ腫のうち、除菌抵抗性 API2-MALT1 陰性群にはゲノムコピー数の異常が多いことを明らかにした。

(2) 眼付属器 MALT リンパ腫に特徴的な 6q23.3 領域の欠失を見出し、その責任遺伝子は、TNFAIP3 であることを明らかにした。

(3) 末梢性 T 細胞リンパ腫(PTCL-U)をアレイ CGH 解析、ならびに免疫病理学組織学検討を行い、PTCL-U の中に ATL とよく似た疾患単位が存在する可能性を示唆した。

(c) 肺がんにおけるエピジェネティクス異常の解析

肺腺がんと中皮腫において DNA メチル化標的遺伝子の網羅的解析を行った結果、両者で比較的共通して DNA メチル化の標的となる遺伝子が数多く観察された。肺腺がんでは特に、EGFR 変異を伴わない肺腺がん腫瘍組織で DNA メチル化が多数検出され、DNA メチル化異常の蓄積は肺腺がんにおいて EGFR 変異を補完する発がん経路であることも示唆された。今後、

EGFR 変異のみならず各種の活性型がん遺伝子変異・増幅との比較解析を行い、DNAメチル化異常のレベル・頻度・標的遺伝子との関連の詳細をさらに明らかにするとともに、低分子化合物等による活性型遺伝子変異の抑制とエピジェネティクス治療薬によるがん抑制遺伝子不活化の発現・機能回復の相乗効果を検討し、分子標的治療薬の合理的な併用療法を目指した基礎的な検討が必要であると考えられる。

(d) がんの浸潤や転移に関わる細胞骨格の研究

がん細胞の骨格・細胞間接着を制御するシステムに関して、特異的な構造物を制御する分子の報告はまだ少ない。我々は、アルバトロスおよびトリコプレインが細胞間接着装置複合体および微小管の安定化、つまり特異的な細胞骨格・細胞間接着の制御を行う上での分子メカニズムを明らかにした。またケラチンがそれらの機能を促進している可能性を示唆した。これらの結果は、がんにおいて今だ未知な細胞骨格・接着異常の分子メカニズムのひとつを明らかにし、それにケラチン結合蛋白質およびケラチン自身が関与していることを示すものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 発表論文

1. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, Matsui M, Yatabe Y, Manabe T and Tatematsu M Interleukin-2 potentiation of cetuximab anti-tumor activity for EGFR overexpressing gastric cancer xenografts via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci*, in press.
2. Nakanishi H, Hara H, Ikehara Y, Tatematsu M. Non-invasive and real-time monitoring of molecular targeting therapy for lymph node and peritoneal metastasis in nude mice bearing xenografts of human colorectal cancer cells tagged with GFP and DsRed, *Proceeding of SPIE*, 6449; 644910-1-9, 2007.
3. Hara M, Nakanishi H, Jun Q, Hirai T, Kanemitsu K, Ito S, Mochizuki Y, Kodera Y, Tatematsu M, Yamamura Y and Kato T. Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR. Possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*, 24: 179-89, 2007.
4. Hara M, Hirai T, Nakanishi H, Kanemitsu K, Komori K, Tatematsu M, Kato T. Isolated tumor cell in lateral lymph node has no influences on the prognosis of rectal cancer patients, *Int. J. Colorectal Dis.* 22: 911-917, 2007.
5. Ohashi N, Nakanishi H, Kodera, Y, Mochizuki Y, Ito S, Koike M, Fujiwara M, Yamamura Y, Tatematsu M, Nakao A. Kato T. Intraoperative quantitative detection of CEA mRNA in the peritoneal lavage of gastric cancer patients with transcription reverse-transcription concerted (TRC) method. A comparative study with real-time quantitative RT-PCR. *Anticancer Res.* 27(4C): 2769-2777, 2007.
6. Ohno F., Nakanishi H., Abe A., Seki Y., Kinoshita A. Hasegawa Y., Tatematsu M., Kurita K. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody. An analysis in comparison with angiogenesis. *J. Oral*

- Pathol. Med. 36(5): 281-289, 2007.
7. Karube, K., Guo, Y., Suzumiya, J., Sugita, Y., Nomura, Y., Yamamoto, K., Shimizu, K., Yoshida, S., Komatani, H., Takeshita, M., Kikuchi, M., Nakamura, N., Takasu, O., Arakawa, F., Tagawa, H., Seto, M., Ohshima, K.: CD10(-)MUM1(+) follicular lymphoma lacks BCL2 translocation and shows characteristic biological and clinical features. *Blood*, 109: 3076-3079, 2007.
 8. Tsuzuki, S., Karnan, S., Horibe, K., Matsumoto, K., Kato, K., Inukai, T., Goi, K., Sugita, K., Nakazawa, S., Kasugai, Y., Ueda, R., Seto, M.: Genetic abnormalities involved in t(12;21) TEL-AML1 acute lymphoblastic leukemia: Analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci.*, 98: 698-706 2007.
 9. Taniguchi, T., Karnan, S., Fukui, T., Yokoyama, T., Tagawa, H., Yokoi, K., Ueda, Y., Mitsudomi, T., Horio, Y., Hida, T., Yatabe, Y., Seto, M., Sekido, Y.: Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent non-random chromosomal alteration regions including JUN amplification on 1p32. *Cancer Sci*, 98: 438-446, 2007.
 10. Fukuhara, N., Nakamura, T., Nakagawa, M., Tagawa, H., Takeuchi, I., Yatabe, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Chromosomal imbalances are associated with outcome of *Helicobacter pylori* eradication in t(11;18)(q21;q21) negative gastric malt lymphomas. *Genes Chrom and Cancer*, 46: 784-790, 2007.
 11. Kim, W-S., Honma, K., Karnan, S., Tagawa, H., Kim, Y-D., Oh, Y-L., Seto, M., Ko, Y-H.: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of ocular marginal zone b cell lymphoma: comparison with pulmonary and nodal marginal zone b cell lymphoma. *Genes Chromosomes and Cancer*, 46: 776-783, 2007.
 12. Isaka, T., Nakamura, T., Tajika, M., Kawai, H., Imaoka, H., Okamoto, Y., Aoki, M., Inoue, H., Takahashi, K., Mizuno, N., Sawaki, A., Yamao, K., Seto, M., Yokoi, T., Yatabe, Y., Nakamura, S.: API2-MALT1 chimeric transcript-positive gastroduodenal MALT lymphoma with subsequent development of adenocarcinoma as a collision tumour over a clinical course of 7 years. *Histopathology*, 51:119-123, 2007.
 13. Tagawa, H., Karube, K., Tsuzuki, S., Ohshima, K., Seto, M.: Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci*, 98:1482-1490, 2007.
 14. Tagawa, H., Karube, K., Guo, Y., Takeshita, M., Kikuchi, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Ohshima, K., Seto M.: Trisomy 3 is a specific genomic aberration of t(14;18) negative follicular lymphoma. *Leukemia*, 21: 2549-2551, 2007.
 15. Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Karnan, S., Aizawa, Y., Kim, WS., Kim, YD., Ko, YH., Seto.M.: TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in cular. Adnexal marginal zone B cell lymphoma. *Genes Chrom Cancer*, 47:1-8, 2008.
 16. Nakamura, T., Seto, M., Tajima, M., Kawai, H., Yokoi, T., Yatabe, Y., Nakamura, S.: Clinical features and prognosis of gastric MALT lymphoma with special reference to responsiveness

- to *H. pylori* eradication and API2-MALT1 status. *Am J Gastroenterol*, 103:62-70, 2008.
17. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y: Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res*, 37: 974-983, 2007.
 12. Tanaka H, Yanagisawa K, Shinjo K, Taguchi A, Maeno K, Tomida S, Shimada Y, Osada H, Kosaka T, Matsubara H, Mitsudomi T, Sekido Y, Tanimoto M, Yatabe Y, Takahasih T.: Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. *Cancer Res*, 67: 6007-6011, 2007.
 13. Watanabe Y, Toyota M, Kondo Y, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Sasaki Y, Sekido Y, Hiratsuka H, Shinomura Y, Imai K, Itoh F, Tokino T. PRDM5 identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 13: 4786-94, 2007
 14. Osada H, Tatematsu Y, Tomida S, Yatabe Y, Takeuchi T, Murakami H, Kondo Y, Sekido Y, Takahashi T. Roles of ASH1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res*, 68: 1647-55, 2008.
 15. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer*, in press.
 17. Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B. and Pant. H.C. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp. Cell Res*. 313: 2098-2109, 2007
 18. Tsuno, T., Natsume, A., Katsumata, S., Mizuno, M., Fujita, M., Osawa, H., Nakahara, N., Wakabayashi, T., Satoh, Y., Inagaki, M. and Yoshida, J. Inhibition of Aurora-B function increases formation of multinucleated cells in p53 gene deficient cells and enhances anti-tumor effect of temozolomide in human glioma cells. *J Neurooncol*. 83: 249-258, 2007
 19. Goto, H. and Inagaki, M. Production of a site- and phosphorylation state-specific antibody. *Nature Protocols* 2: 2574-2581, 2007
 20. Li, Z.F., Wu, X., Jiang, Y., Liu, J., Wu, C., Inagaki, M., Izawa, I., Mizisin, A.P., Engvall, E. and Shelton, G.D. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J. Neurol. Sci*. 264: 77-86, 2008
 21. Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A. and Hirotsune, S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J. Cell Biol.* In press

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

消化器がんの発生・発育・進展に関わる分子病態の解析

分担研究者 立松正衛

愛知県がんセンター研究所 副所長

研究要旨： HER family (EGFR,HER2 等)を標的とする胃がんに対する分子標的治療法の抗腫瘍効果とその分子機構を解析し、以下の諸点を明らかにした。

1) 肝転移、腹膜転移を有する胃癌症例の原発巣 131 例と肝転移巣9例、腹膜転移巣 73 例における EGFR,HER2 の発現を免疫染色、CISH 法により検討し、HER2 は原発 31%、腹膜転移 17%、肝転移 66%で高発現、EGFR は原発 6%、腹膜転移 10%、肝転移 11%で高発現を認め、HER family、中でも HER2 が胃癌の有望な分子標的候補で有ることを確認した。2) ヒト化抗 HER2 抗体 Trastuzumab は独自に樹立した HER2 高発現細胞 (GLM-1)に対して軽度～中等度の増殖抑制およびアポトーシス誘導を示し、*in vivo* では殊に腹膜転移に対し単独でも顕著な抗腫瘍効果を示すこと、これに HER2 の down regulation を介した PI3K/Akt 経路の抑制および抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の両者が関与する可能性を明らかにした。3) 抗 EGFR キメラ抗体 Cetuximab ならびに Gefitinib は EGFR 高発現細胞に対して Erk1/2 のリン酸化は軽度に抑制するものの、*in vitro* において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかった。しかしヌードマウス移植腫瘍に対して Cetuximab のみが IL-2 との併用により有意な抗腫瘍効果を示し、これには主として NK 細胞を介した ADCC が関与することを明らかにした。胃癌においては EGFR、HER2 とともに分子標的になりうるが、頻度および効果の点から HER2 がより有効な分子標的である可能性が示唆された。

A. 研究目的

1. 胃がん原発、転移症例における HER family 発現の免疫組織学的解析
2. HER2 高発現胃がんの増殖・転移機構の解析と分子標的治療法の開発
3. EGFR 高発現胃癌に対する分子標的治療法の開発

B. 研究方法

1. 肝転移、腹膜転移を有する胃癌症例の

原発巣 131 例と肝転移巣9例、腹膜転移巣 73 例における EGFR,HER2 の発現を免疫染色により検討し、さらに CISH (chromogenic in situ hybridization)法により遺伝子増幅の有無を明らかにする。

2. 独自に樹立した HER2 高発現胃がん細胞株 (GLM シリーズ)の *in vivo* 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Trastuzumab, Gefitinib に対する感受性を明らかにし、その分子基盤に基づき胃がんの

転移に対する分子標的治療法を構築する。

3. EGFR 高発現胃癌細胞株 (MKN-28, MKN-74)の *in vivo* 皮下腫瘍モデルおよび腹膜転移モデルを用いて Cetuximab, Gefitinib に対する感受性を明らかにし、その分子基盤に基づき EGFR 高発現胃癌に対する分子標的治療法を構築する。

C. 研究結果

(1)胃癌原発、転移症例における HER family 発現の免疫組織学的解析

EGFR,HER2の発現を免疫染色、CISH法により検討したところ、HER2高発現 (原発31%、腹膜転移 17%、肝転移 66%)は EGFR高発現(原発 6 %、腹膜転移 10%、肝転移 11%)に比べ肝転移症例において有意に高かった。またCISH法によりHER2高発現肝転移巣におけるHER2遺伝子増幅を検討したところ、9例中6例で増幅が認められHER2が胃癌肝転移に対する有望な分子標的候補であることを確認した。さらに胃癌の原発巣と肝転移巣におけるHER2高発現の一致率を検討したところ、見かけ上の一致率は100%で、しかもCohenの κ 係数は1と完全に一致しており、分子標的治療の適応判定に際しては原発巣切除標本での判定が可能であることも判明した。一方、原発巣と腹膜転移巣でのEGFR高発現の見かけ上の一致率は87.1%、 κ 係数は0.12で、有意な一致はなく、また腹膜転移巣でEGFRの発現した症例は予後不良であったことから、分子標的治療の適応判定に際しては腹膜転移巣の免疫染色標本を用いた治療適応の判定が必要であることが示唆された。

(2) HER2 高発現胃癌に対する増殖・転移機構の解析と分子標的治療法の開発

肝転移巣から独自に樹立した HER2 高

発現胃癌細胞株 3 株 (GLM-1, GLM-2, GLM-4) および既存の肝転移巣由来胃癌細胞株 NCI-N87 では HER family 下流のシグナル伝達経路として PI3K/Akt 経路が恒常的に活性化されており、HER2 高発現胃癌細胞株はその生存を HER2 過剰発現によって活性化された PI3K/Akt 経路に依存している事を明らかにしてきた (oncogene addiction)。

これら HER2 高発現胃癌細胞株の *in vitro* における Trastuzumab 感受性を調べたところ、軽〜中等度の増殖抑制とアポトーシス誘導および Akt のリン酸化抑制が認められた。またヌードマウス腹腔内接種による腹膜転移に対しては抗体単独でも顕著な転移抑制が認められた。ヒト末梢血単核球およびマウス脾臓細胞を Effector 細胞として Trastuzumab による抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を ⁵¹Cr release assay により検討したところ、HER2 低発現胃癌細胞に比べて、HER2 高発現胃癌細胞では ADCC 活性が高い傾向が認められた。以上のことから腹膜転移に対する抗腫瘍効果には HER2 高発現胃癌細胞の生存に必須な PI3K/Akt 経路の抑制と抗体依存性細胞障害 (ADCC) の両者が関与する可能性が示唆された。

3) EGFR 高発現胃癌に対する分子標的治療

EGFR 標的薬である Cetuximab, gefitinib の EGFR 高発現細胞株 MKN-28 (遺伝子変異、増幅を伴わない) に対する抗腫瘍効果を検討した。両者とも Erk1/2 のリン酸化は軽度に抑制するものの、*in vitro* において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかった。一方、*in vivo* においては Cetuximab のみが IL-2 との併用によってヌードマウス皮下移植腫瘍および腹膜転移に対し有意な抗腫瘍効果を示し、

これは抗アシアロ GM-1 抗体により抑制された。ヒト健常人末梢血単核細胞を effector 細胞として Cetuximab による抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を検討したところ、有意な ADCC 活性を認め、これも増強された。以上のことから Cetuximab は遺伝子変異、増幅を伴わない EGFR 高発現胃癌細胞に対しても有意な抗腫瘍効果を示し、これにはシグナル阻害よりも ADCC がより強く関与する可能性を明らかにした。

D. 考察

(1) (1) 胃がん原発、転移症例における HER family 発現の免疫組織学的解析

今回、原発巣と転移巣におけるHER2発現を検討したところ、陽性率は原発31%、腹膜転移 17%、肝転移 66%で、肝転移は腹膜転移に比べて高率に陽性であった。さらに原発巣と肝転移巣におけるHER2高発現もよく一致した。これらの事実はHER2が単なるマーカーではなく、血行性転移機構に密接に関連しており、HER2高発現胃癌が肝臓に転移しやすい可能性を示唆している。最近、転移に関与することが知られているCXCR4の発現がHER2によって up-regulateされることが報告されているが、実際、我々の肝転移巣由来HER2高発現胃がん細胞株でもHER2低発現胃がん細胞に比べCXCR4発現が高いことを確認している。一方、EGFR陽性率は原発6%、腹膜転移10%、肝転移11%と転移巣でも低く、また原発巣と転移巣での一致率も低く、EGFRと転移との関連性は低いと考えられる。しかし、腹膜転移巣でEGFRの高発現した症例は予後不良であったこと、動物実験からはCetuximab+IL-2に感受性であったことから

腹膜転移に対する新しい分子標的治療の一つになりうる可能性が示唆された。

(2) HER2高発現胃がんの増殖・転移機構の解析と分子標的治療法の開発

Trastuzumabは遺伝子増幅を伴うHER2高発現胃がん細胞に対してはin vitroでは軽度〜中等度の増殖抑制、アポトーシス誘導を示し、in vivoの腹膜転移に対しては単独でも顕著な転移抑制効果を有すること、これにHER2の Down regulationを介したPI3K/Aktシグナル伝達経路の抑制と抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の両者が関与する可能性を明らかにした。後者のADCC活性はNK細胞のFcR-III阻害により減弱することからNK細胞を介したものと考えられる。

一方、遺伝子増幅がない腹膜転移由来のHER2高発現胃がん細胞株 (NUGC-4) に対して、GefitinibおよびTrastuzumabは単独ではアポトーシスを誘導せず、in vivoの腹膜転移に対しても単独では有意な効果はなく、両者併用で軽度の転移抑制を示すに過ぎなかった。従って、同じくHER2高発現胃癌であっても遺伝子増幅を伴う肝転移由来細胞と伴わない腹膜転移由来の細胞では全く感受性が異なっていた。この感受性の違いが遺伝子増幅の有無によるものか、それとも転移巣の違いによるものかを明らかにするために現在、CISH法によりHER2高発現腹膜転移症例のHER2遺伝子増幅の有無を検討中である。

HER2高発現進行胃がんに対し、現在、化学療法にTrastuzumabを併用する群としない群で RCT臨床試験が国際共同の大規模な第III相試験 (TOGA study)として進められている。本スタディではFISH陽性を適格要件としているが上記の我々の結果からも理に適った選別と思われ、その結

果が待たれるところである。胃がん肝転移の約半分はHER2高発現と考えられ、今回のCISHの結果からもわかるように、そのうちかなりの症例がHER2遺伝子増幅を有すると考えられることから、HER2を高発現する胃がん肝転移は胃がんに対する分子標的治療のなかで最も臨床応用に近く、かつ有望な対象と考えられる。今後、予後不良で有効な治療法がほとんどないこの胃がん肝転移に対し、GefitinibやTrastuzumab、さらに新しいHER family標的薬など作用機序の異なる薬剤を組み合わせた新しい分子標的治療法の確立が期待される。

(3) EGFR 高発現胃癌に対する新しい分子標的治療の開発

Cetuximab, gefitinib とも EGFR 高発現胃癌に対し *in vitro* において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかったにも関わらず、ヌードマウス移植腫瘍に対しては Cetuximab と IL-2 の併用が有意な抗腫瘍効果を示すこと、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が主として Cetuximab の抗腫瘍効果に関与することが明らかとなった。Cetuximab を用いた胃がんに対する分子標的治療法として現在化学療法との併用が臨床試験により検討されているが、胃癌に関しては IL-2 など NK 細胞を活性化させるサイトカインとの併用はこれまでに報告はなく、EGFR も HER2 同様に胃癌に対する新しい分子標的治療法となりうる可能性を示した。

E. 結論

(1) 肝転移、腹膜転移を有する胃癌症例の原発巣 131 例と肝転移巣 9 例、腹膜転移巣 73 例における EGFR,HER2 など HER family の発現を免疫染色、CISH 法

により検討し、HER2 陽性は原発 31%、腹膜転移 17%、肝転移 66%、一方、EGFR 陽性は原発 6%、腹膜転移 10%、肝転移 11%であり、EGFR,HER2 いずれも分子標的になりうるが、特に HER2 は HER 標的薬の有望な分子標的候補であることを確認した。

(2) Trastuzumab は遺伝子増幅を伴う HER2 高発現肝転移由来胃がん細胞に対して *in vivo* で強い抗腫瘍効果を有し、これが HER2 の down regulation を介した PI3K/Akt シグナル伝達経路の抑制および抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) の両者に起因する可能性を明らかにした。一方、遺伝子増幅を伴わない HER2 高発現腹膜転移由来細胞株では抗腫瘍効果は弱く、遺伝子増幅の有無が Trastuzumab 感受性に強く影響する可能性が示唆された。

(3) Cetuximab, gefitinib は EGFR 高発現胃癌細胞に対して Erk1/2 のリン酸化を軽度しか抑制せず、*in vitro* において有意な増殖抑制およびアポトーシス誘導を示さなかったが、*in vivo* では IL-2 との併用により Cetuximab のみが有意な抗腫瘍効果を示し、これにはシグナル伝達阻害よりも NK 細胞を介した ADCC がより積極的に関与することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, Matsui M, Yatabe Y, Manabe T and Tatematsu M Interleukin-2 potentiation of cetuximab anti-