

200809013A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

肺癌移植マウスを用いた遺伝子発現プロファイル  
解析による分子標的薬の皮膚毒性に関する解析

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 谷口一也

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

肺癌移植マウスを用いた遺伝子発現プロファイル  
解析による分子標的薬の皮膚毒性に関する解析

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 谷口一也

平成21(2009)年4月

## 目次

- I. 総括研究報告
  - 肺癌移植マウスを用いた遺伝子発現プロファイル解析による分子標的薬の皮膚毒性に関する解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
  
- II. 分担研究報告
  - 抗癌剤感受性評価系としての移植マウスモデルの確立・・・・・・・・・・ 14
  - 東山聖彦

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

肺癌移植マウスを用いた遺伝子発現プロファイル  
解析による分子標的薬の皮膚毒性に関する解析

研究代表者 谷口 一也 地方独立行政法人大阪府立病院機構  
大阪府立成人病センター研究所 研究員

### 研究要旨

一般的な抗癌剤の皮膚毒性は軽度な静脈炎が主であり発生頻度は低い。これに対し、ゲフィチニブ及びエルロチニブの皮膚毒性は、にきび様の皮疹が6割を超える症例で見られ、グレード3以上の重篤な場合もある。ほとんどの場合は対処療法でコントロール可能であるが、1割の症例では投薬量の減少を余儀なくされ、また、投薬を中止せざるを得ない場合も存在している。近年、これら分子標的薬の各臨床試験の副作用データが解析されたが、皮疹の発生が抗腫瘍効果と相関し、皮疹のグレードが上がると奏効率の向上や生存期間の延長が認められた。しかし、これら分子標的薬の皮疹発生の分子メカニズムは明らかとなっていない。皮疹の分子生物学的原因を探り、副作用を低減できれば治療効果を高めることにつながる。

そこで本研究では分子標的薬の皮疹発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。手法としては、皮疹と抗腫瘍効果の関連性を手がかりに、遺伝子発現プロファイル解析により皮膚毒性に関連する遺伝子群の同定を試みる。また、個々の患者の肺癌組織を直接マウスに移植する組織移植マウスを抗癌剤の奏効性の評価に用いることで複数の分子標的薬の並列解析を行う。

#### 1. 腫瘍移植マウスの確立と分子標的薬の投与

抗癌剤の多剤並列評価が可能な移植マウスモデルの確立を試みた。外科切除標本からヌードマウスに肺組織を移植し、現在までに23例を確立した。シスプラチン及びジェムシタビンの投与を行ったLK001では、シスプラチンの抗腫瘍効果が認められたのに対し、ジェムシタビンの効果は認められなかった。全6例の解析では、1例でシスプラチンの効果が認められなかったが、それ以外の症例では、抗腫瘍効果が認められた。今後これらのマウスモデル系を使い、分子標的薬の投与と皮疹関連遺伝子群の発現解析を行っていく。

#### 2. 肺癌サンプルを用いた遺伝子発現プロファイル解析

ゲフィチニブを投与されたGrade2以上の皮疹を持つ症例と皮疹が確認されなかった症例との比較により皮疹関連遺伝子を同定する。現在それぞれ7症例、計14症例の解析を行っている。

主任研究者

谷口一也

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪

府立成人病センター研究所

研究員

研究分担者

東山聖彦

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪

府立成人病センター

主任部長

#### A. 研究目的

分子標的薬のターゲットとなっている EGFR は Epidermal growth factor (EGF) などの増殖因子が結合する細胞外ドメインと、チロシンキナーゼ部位を有する細胞内ドメインをもつ細胞膜貫通型の受容体である。非活性化状態ではリン酸化を受けにくい一量体として存在しているが、EGF などの増殖因子が結合すると二量体を形成し、細胞内チロシンキナーゼドメインに ATP が結合することで起こる自己リン酸化を経て<sup>(1)</sup>、癌増殖シグナルが核へと伝えられ、その結果、癌細胞の増殖、血管新生、浸潤及び転移の亢進や、アポトーシスの抑制などが起こる<sup>(2)</sup>。非小細胞肺癌などの固形癌では、腫瘍細胞内の EGFR が過剰発現していることが知られており、病期の進行や転移といった癌細胞の活性化に重要な役割を果たすと考えられている<sup>(3,4)</sup>。分子標的薬ゲフィチニブは、細胞内の EGFR チロシンキナーゼ部位に特異的に結合し、ATP の結合を競合的に阻害する。その結果、EGFR の自己リ

ン酸化が抑制され、悪性化に関連するシグナルを遮断することにより抗腫瘍効果を発揮すると考えられている<sup>(5,6)</sup>。ゲフィチニブは一部の患者においてのみ抗腫瘍効果を示したため、患者を区別する因子の同定が望まれていた。これに対し、2004年に非小細胞肺癌における EGFR 遺伝子変異の有無がゲフィチニブの抗腫瘍効果と関連するという報告がなされ<sup>(7,8)</sup>、その後多くの追試が行われた<sup>(9)</sup>。特に、日本を含めアジアでは EGFR 遺伝子変異がゲフィチニブの効果予測因子であるという報告が多くなされており<sup>(10,11)</sup>、効果予測の重要なマーカーとして用いられている。

ゲフィチニブの副作用としては、間質性肺炎が大きな問題の一つとして残されているが、この他に特徴的な副作用は皮膚毒性である。一般的な抗癌剤の皮膚毒性は軽度な静脈炎が主であり発生頻度は低い。これに対し、ゲフィチニブ及びエルロチニブの皮膚毒性は、にきび様の皮疹が6割を超える症例で見られ、グレード3以上の重篤な場合もある。ほとんどの場合は対処療法でコントロール可能であるが、1割の症例では投薬量の減少を余儀なくされ、また、投薬を中止せざるを得ない場合も存在している。近年、これら分子標的薬の各臨床試験の副作用データが解析されたが、皮疹の発生が抗腫瘍効果と相関し、皮疹のグレードが上がると奏効率の向上や生存期間の延長が認められた<sup>(12,13)</sup>。また、血管新生阻害薬ベバシズマブに関しても皮疹と抗腫瘍効果の関連が報告されている<sup>(14)</sup>。しかし、これら分子標的薬の皮疹発生の分子メカニズムは明らかとなっていない。皮疹の分子生物学的原因を探り、副作用を低減できれば治療効果を高めることにつな

る。

そこで本研究では分子標的薬の皮疹発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。炎症を起こした皮膚や血液を用いたこれまでの解析では分子メカニズムの解明には至っていない。そこで、皮疹と抗腫瘍効果の関連性を手がかりに、遺伝子発現プロファイル解析により皮膚毒性に関連する遺伝子群の同定を試みることにした。また、個々の患者の肺癌組織を直接マウスに移植する組織移植マウスを抗癌剤の奏効性の評価に用いることで複数の分子標的薬の並列解析を行う。

分子標的薬のみならず、他の抗癌剤においても皮膚毒性の発生メカニズムは明らかにされていない。特に分子標的薬において皮膚毒性は重大な副作用であり、この発生メカニズムを明らかにし、皮膚毒性の軽減法を探ることは有用性が高く、直接的に医療に役立つ。また、多くの新規抗癌剤は分子標的薬であり、その皮膚毒性が予測できれば患者ごとに異なる抗癌剤を投与するなど個別化医療の充実に繋がる。本研究にも用いる組織移植マウスは、分子標的薬の評価系に有用であることが明らかとなっており、抗腫瘍効果と副作用を同時に予測することで適切な抗癌剤の選択が可能になると考えられる。さらに、同定した遺伝子群から皮膚毒性の安全性マーカーを同定することができれば、創薬の前臨床段階での皮膚毒性に関するスクリーニングと危険度の予測が可能になる。このことが、研究課題でもある創薬の効率的な実施に繋がり、結果的に国民に大きな利益をもたらすものと考えられる。

## B. 研究方法

### B-1: 肺癌組織移植マウスの作製

外科手術後の肺癌組織を約 125mm<sup>3</sup> に切り分け、ヌードマウスの皮下 2 箇所に移植した。増殖が認められた移植片を継代移植するとともに、原発巣の組織との比較を HE 染色により行った。

### B-2: マウスモデルに対する抗癌剤の投与

マウスでの継代を行いながら繰り返し分子標的薬の投与を行い、治療前の腫瘍と治療後の腫瘍についてペアで分子生物学的なプロファイルを作製する。シスプラチン (5mg/kg once a week for 4 weeks) およびジェムシタピン (10mg/kg once a week for 4 weeks) による抗癌剤治療を行った。コントロールとしては、抗癌剤非投与症例を用いた。また、肺癌培養細胞株 PC14 をヌードマウスに皮下投与し、シスプラチンによる同様の解析を行った。

### B-3: 肺癌症例の遺伝子発現プロファイル解析

ゲフィチニブ投与症例において Grade2 以上の皮疹を持つ 7 症例と皮疹が確認されなかった 7 症例を用い、発現プロファイル解析により比較する。アジレント社の 44K の DNA チップ(プローブ数 41,100)を用い、1 color 法により解析を行った。この結果をもとに皮疹関連候補遺伝子を同定する。

### B-4: 倫理面への配慮

本研究では、非小細胞肺癌組織を用いて研究を行う。組織を用いる際は、法令に基づいて設置された大阪府立成人病センター倫理

審査委員会において承認を受け、その利用方法を遵守する。また、患者個人に対し主治医もしくはインフォームド・コンセント担当者が説明を行ない、遺伝子解析研究に対する署名、捺印を文書にて頂いている。臨床情報に関しては、大阪府立成人病センター内で匿名化され、その扱いに関しては、センター内の規定に従って扱う。

実験動物に関しては、動物実験等の実施に関する基本指針に基づき設置された大阪府立成人病センター内の動物実験委員会の規定に基づき実験を行う。

## C. 研究結果

### C-1: 肺癌組織移植マウスの作製

外科切除標本から Xenografted マウスモデルの作製を行った。現在までに 23 例を確立した。原発巣の肺癌 20 例、及び転移性大腸癌 3 例である。確立した移植マウスは継代可能であり、症例数としては問題ないと考えている。現在、得られたマウスの腫瘍と外科切除標本に関して、P53、ki67、TTF1、Chomogranin A、CD56、Synaptophysin の抗体を用い、免疫組織学的手法により、その病理学的な性質が保存されているかどうかについて検討している。

C-2: マウスモデルに対する抗癌剤の投与  
C-1 で得られたマウスモデルのうち安定して腫瘍を生成する 6 症例について、シスプラチンの投与を 4 週間行った。この結果、シスプラチンを投与しないコントロール群に比べ、腫瘍の増殖が抑えられていた (図 1~図 5)。しかし、治療効果の評価が難しい 1 例もみられた (図 6)。また、培養細胞 PC14 を

用いた比較実験では、シスプラチンに対する抗腫瘍効果が認められなかった (図 7)。また、継続して投与を行った腫瘍がシスプラチンに対して抵抗性を持つことが確認されている。現在、シスプラチン投与、非投与の 2 症例 (4 サンプル) に関して発現プロファイル解析を行っており、マウスモデルの抗癌剤評価系の確立のための解析を進めている。

また、新規分子標的薬ベバシズマブ及びバンダニブを 3 症例から作製された移植マウスに 1 ヶ月投与したところ、いずれの場合もコントロールに比べ腫瘍増殖が抑えられており、評価が可能であった。

### C-3: 肺癌症例の遺伝子発現プロファイル解析

ゲフィニチブを投与された Grade2 以上の皮疹を持つ症例と皮疹が確認されなかった症例との比較により皮疹関連遺伝子を同定する。現在それぞれ 7 症例、計 14 症例の解析を行っているところである。

## D. 考察・結論

皮疹と抗癌剤の治療効果との関連性は 2001 年に Saltz らにより大腸癌におけるセツキシマブとイリノテカンを用いた第二相臨床試験の解析結果で提唱された<sup>(15)</sup>。その後多くの臨床試験でも関連性が指摘され、非小細胞肺癌の第二相、第三相に限っても、少なくとも 8 報の報告がなされている<sup>(16-23)</sup>。また、分子標的薬単独のみならず、併用化学療法でも報告されている。2 つの大規模なエルロチニブとの併用化学療法では、皮疹の有無でのサブセット解析で皮疹が存在した場合に生存期間の延長が認められている<sup>(20,21)</sup>。同様の報告はセツキシマブでも報告

されている<sup>(22~25)</sup>。これらの報告からもわかるように、皮疹が起これば必ず抗腫瘍効果が得られるわけではないが、皮疹の発生やグレードは抗腫瘍効果の有力な指標であると言える。

皮疹の発生機序としては、EGFRが皮膚、毛包、爪の増殖や分化に関与しているため、活性化EGFRが著しく減少すると角化異常が起これば、毛包の炎症、皮膚の乾燥、皮膚炎及び爪囲炎が生じると考えられている<sup>(27)</sup>。表皮基底細胞に発現しているEGFRが阻害されると乾燥肌になり、脂腺細胞のEGFRが阻害されれば脂漏性皮膚炎に、外毛根鞘細胞のEGFRが阻害されればざ瘡様皮疹に、爪母細胞のEGFRが阻害されれば爪囲炎や陥入爪になる。また、近年、EGFRのポリモルフィズムが抗腫瘍効果や皮疹の発生に関連していることが示唆された。AmadorらはEGFRのexon1内のCAリピートが<sup>(28)</sup>、Liuらは、216塩基部位のSNP(G/T)が<sup>(29)</sup>エルロチニブやゲフィチニブの抗腫瘍効果及び皮疹の発生に関連していることを報告している。

しかしながら、腫瘍縮小効果と皮疹発生との分子生物学的な関係は不明である。分子標的薬の腫瘍縮小はEGFRの遺伝子変異や遺伝子増殖との関連性が示されているが、これらの遺伝子変異は体細胞性変異であるため、正常皮膚にはこれらの変異は認められない。また、EGFRの遺伝子変異とエルロチニブの副作用との間に関連性は認められなかった<sup>(30)</sup>。

我々は、これらの背景に基づき、遺伝子発現プロファイル解析を行い、皮疹関連遺伝子の同定を行う。同定した遺伝子群は、追加症例を用いてReal Time PCRによる発現解析

を行うが、さらに、分子標的薬の投与によりそれらの遺伝子がどのように変動するのかを移植マウスモデルを用いて解析する。そのために抗癌剤の多剤並列評価が可能な移植マウスモデルを確立した。シスプラチンとジェムシタビンの投与を行ったLK001では、シスプラチンの抗腫瘍効果が認められたのに対し、ジェムシタビンの効果は認められなかった。全6例の解析では、1例でシスプラチンの効果が認められなかったが、それ以外の症例では、抗腫瘍効果が認められた。また、培養細胞株PC14を用いた解析においてはシスプラチンの抗腫瘍効果が認められなかった。今後これらのマウスモデル系を使い、分子標的薬の投与と皮疹関連遺伝子群の発現解析を行っていく。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

特になし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし



H. 研究協力者

岡見次郎 大阪府立成人病センター・  
呼吸器外科

I. 参考文献

1. Cohen S, et al. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation of activity. *J Biol Chem.* 1980;255:4834-4842.

2. Ciardiello F, et al. The role of EGFR inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2004;16,130-135.

3. Sordella R, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science.* 2004; 305,1163-1167.

4. Rusch V, et al. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res.* 1993;53,2379-2385.

5. Ciardiello F, et al. The role of EGFR inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2004;16,130-135.

6. Janne P.A, et al. Outcomes of patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib (ZD1839, "Iressa") on an expanded access study. *Lung*

*Cancer.* 2004;44,221-230

7. Lynch T.J, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129-2139.

8. Paez J.G, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304(5676),1497-1500.

9. Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;May 10;23(14):3235-42.

10. Mitsudomi T, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol.* 2005;Apr 10;23(11):2513-20.

11. Tokumo M., et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2005;11,1167-1173.

12. Pérez-Soler R, et al. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol.* 2005;Aug 1;23(22):5235-46.

13. Wacker B, et al. Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. *Clin Cancer Res.* 2007;Jul 1;13(13):3913-21.
14. Gotlib V, et al. Skin rash secondary to bevacizumab in a patient with advanced colorectal cancer and relation to response. *Anticancer Drugs.* 2006;Nov;17(10):1227-9.
15. Saltz L, et al. Acne-like rash predicts response in patients treated with cetuximab (IMC-C225) plus irinotecan (CPT-11) in CPT-11 refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). *Clin Cancer Res.* 2001;7:3766s. Abstract 559.
16. Soulieres D, et al. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2004;22:77-85.
17. Kris MG, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2003;290:2149-2158.
18. Fukuoka M, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:2237-2246.
19. Hanna N, et al. Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:5253-5258.
20. Herbst RS, et al. TRIBUTE: phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23:5892-5899.
21. Gatzemeier U, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol.* 2007; 25:1545-1552.
22. Giaccone G, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol.* 2004;22:777-784.
23. Herbst RS, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J*

Clin Oncol. 2004;22:785-794.

24. Saltz L, et al. Cetuximab (IMC-C225) plus irinotecan (CPT-11) is active in CPT-11-refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). Proc Am Soc Clin Oncol. 2001;20:2a. Abstract 7.

25. Abbruzzese JL, et al. Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab (IMC-C225) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. Proc Am Soc Clin Oncol. 2001;20:130a. Abstract 518.

26. Burtneß B, et al. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. J Clin Oncol. 2005; 23:8646-8654.

27. 清原祥夫 日本呼吸器学会雑誌, 2008; 46:83.

28. Amador ML, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor inhibitors. Cancer Res. 2004;64:9139-9143.

29. Liu G, et al. Epidermal growth factor receptor polymorphisms and clinical

outcomes in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib.

Pharmacogenomics J. 2008 Apr;8(2):129-38.

30. Fujiwara Y, et al. Relationship between epidermal growth factor receptor mutations and the severity of adverse events by gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2006;52:99-103.

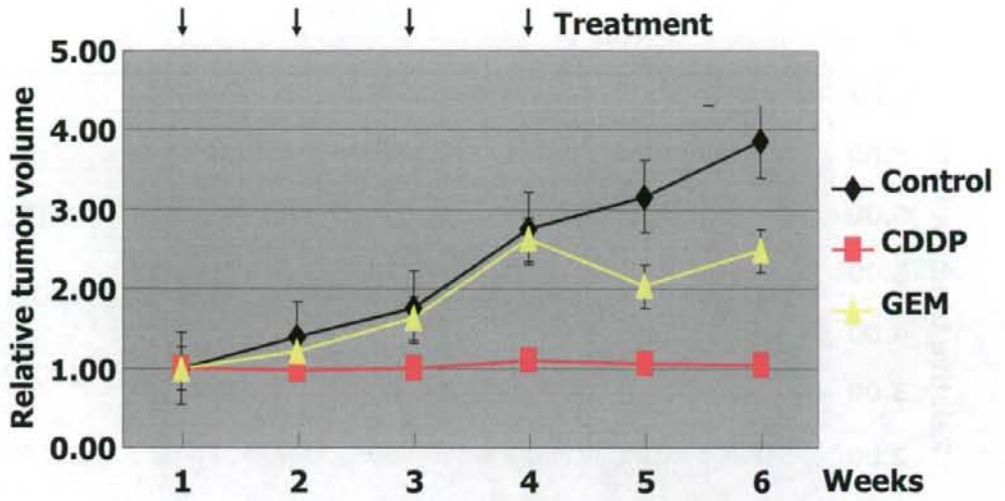


图 1 : LK001P2

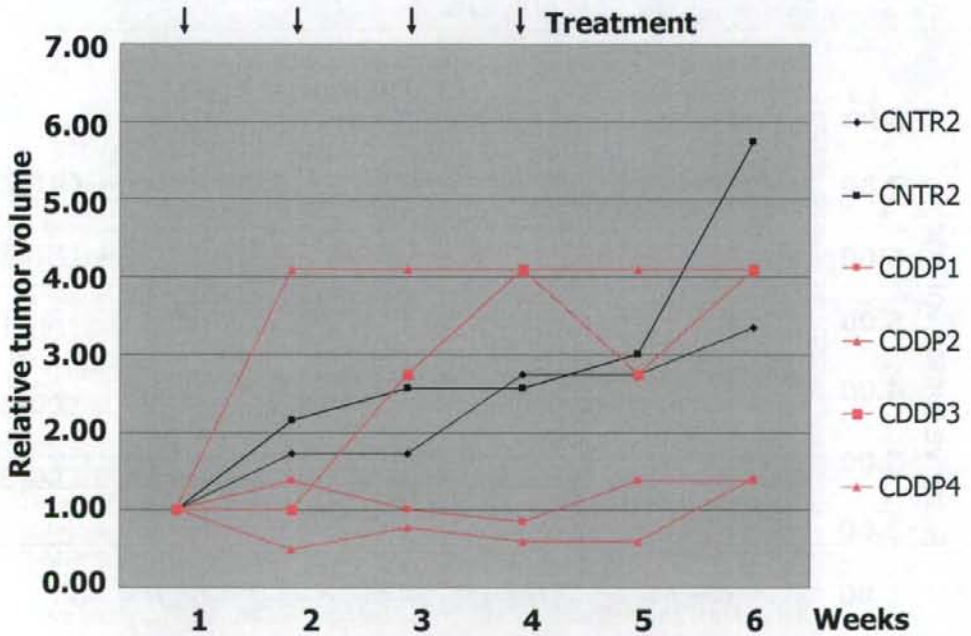


图 2 : LK002P2

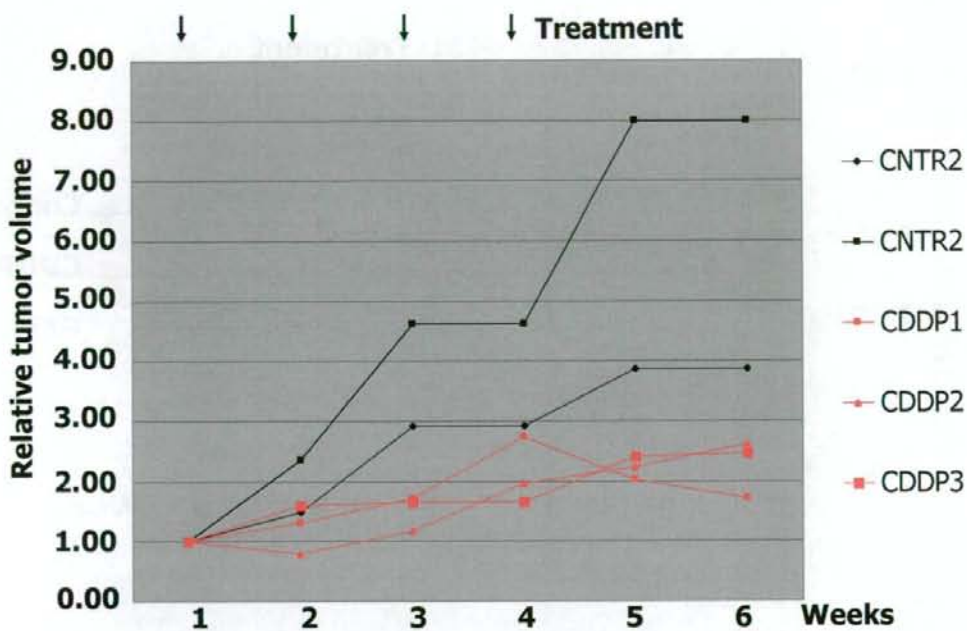


Figure 3 : LK003P1

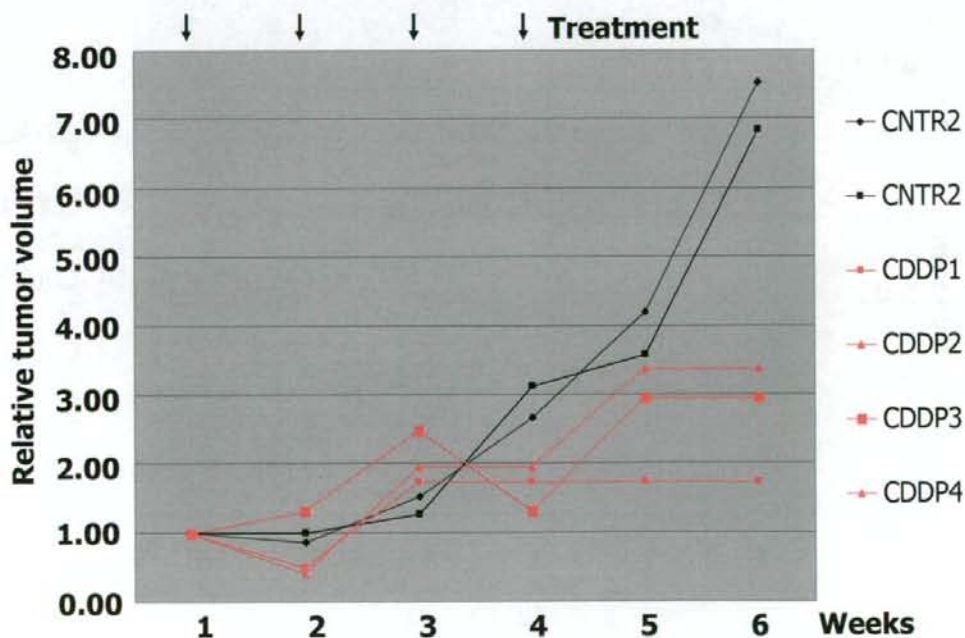


Figure 4 : LK004P1

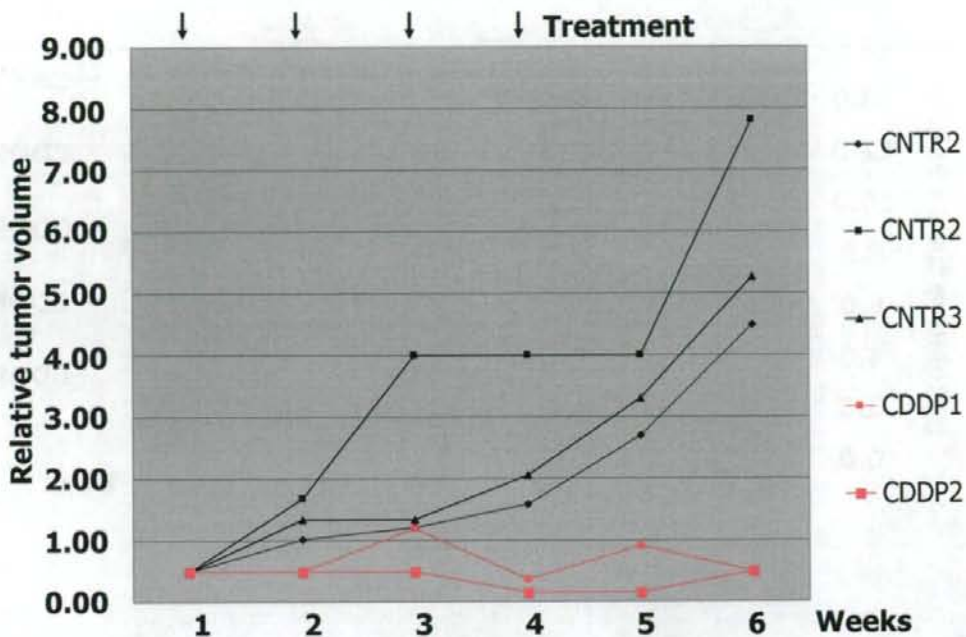


图 5 : LK005P1

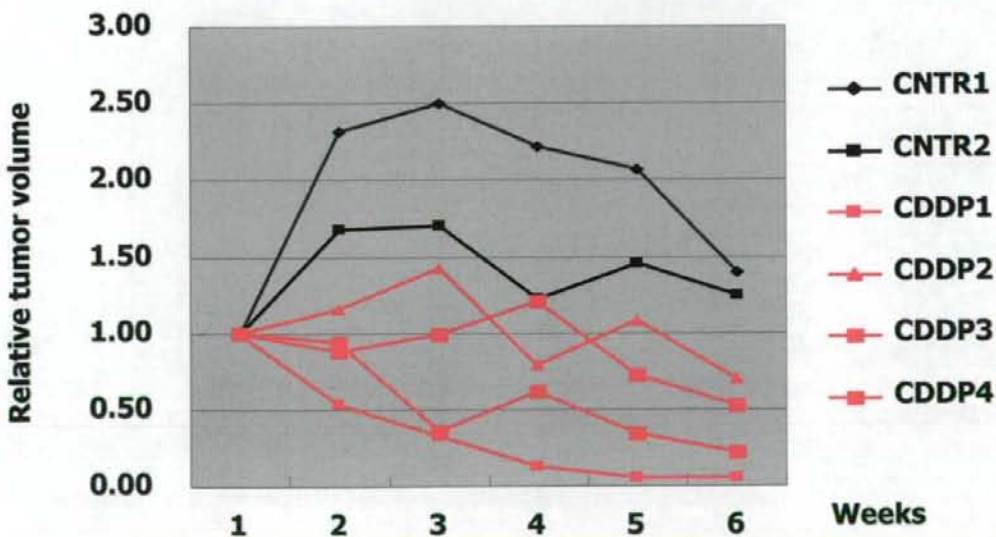


图 6 : LK006P1

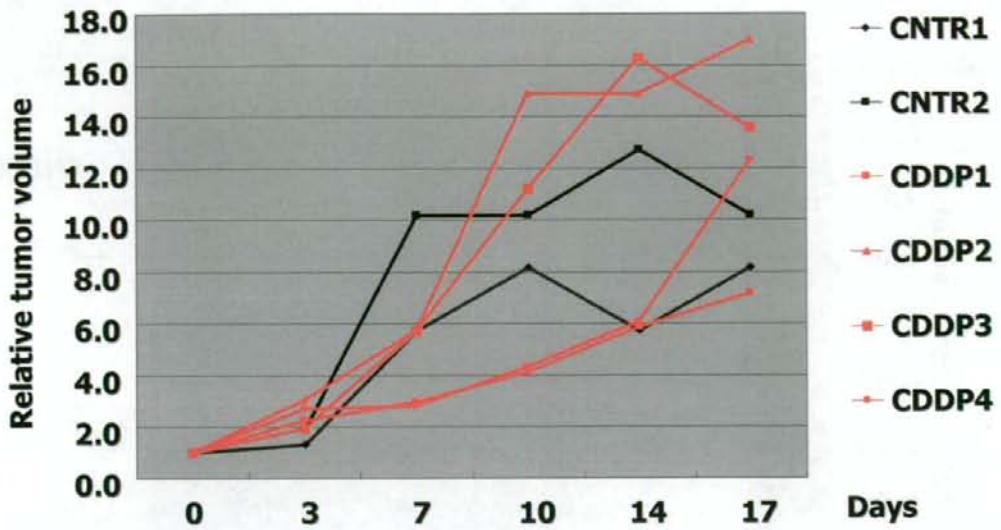


图 7 : PC14

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

抗癌剤感受性評価系としての移植マウスモデルの確立

分担研究者 東山 聖彦 地方独立行政法人大阪府立病院機構  
大阪府立成人病センター 主任部長

研究要旨

近年、多くの分子標的薬が開発され、癌薬物治療の選択肢は増えているが、重要なことは個々の患者にとって最も有効な薬剤を予知し、無効な薬剤投与を回避することと考えられる。これまでさまざまなアプローチから癌薬物治療の効果予測に関する研究がなされてきたが、いずれも十分に満足できるレベルに達していない。これまでの研究で、肺癌切除材料を *Xenografted* マウスに移植し、安定した生着結果を得てきた。そこで本研究の目的は、*Xenografted* マウスモデルにおける抗癌剤感受性試験により肺癌薬物治療の効果予測のバイオマーカーを探索することである。

今回用いるこの *Xenografted* マウスモデルでは、第一に個々の患者から得られた腫瘍をマウスに再現し治療効果を評価するため、腫瘍の個体差を考慮に入れた治療効果予測が可能である。次いで、個体ごとの癌細胞を *In vitro* 培養系を経ずに *in vivo* で継代するため、培養液（FBS など）や培養室（高 CO<sub>2</sub> 下培養）による修飾がない。第三に、治療効果を評価するにあたり、画像検査などの間接的な方法によらず、実験動物においてより直接的に測定できる。最後に、本研究では通常困難である治療後のサンプルを含めて解析できる。

46 症例の腫瘍組織を約 125mm<sup>3</sup> に切り分け、免疫不全マウスに移植し患者ごとに *Xenografted* マウスモデルを作製した。全 46 症例中 23 症例（50%）で移植モデルが確立された。次に、HE 染色を行い、組織学的に検討したところ、腺癌は腺腔構造を有し、また扁平上皮癌は層状構造と部分的な壊死部分を含んでおり、外科切除標本と比べて相同性が観察された。培養細胞系と比較しても腫瘍組織の組織像や腫瘍細胞の多様性を保持していることが確認された。

これらのマウスモデルを用いた抗癌剤評価が可能であることが確かめられたため、分子標的薬の投与を行い、腫瘍縮小効果及び皮疹関連遺伝子の遺伝子発現を解析する。



## A. 研究目的

肺癌は我が国におけるがん死亡原因の第1位(19%)を占める。手術適応外症例が全体の3分の2を占め、手術例の約半数が血行・リンパ節再発などによって死亡する。これまで術後再発例や非切除例に対してはプラチナ製剤を含む化学療法が行われてきたが、その奏功率は約30%に過ぎず、一方副作用は必発する。多数の新規抗癌剤が開発され癌薬物治療の選択肢は増えているが、重要なことは個々の患者にとって最も有効な薬剤を予知し、無効な薬剤投与を回避することと考えられる。これまでさまざまなアプローチから癌薬物治療の効果予測に関する研究がなされてきたが、いずれも十分に満足できるレベルに達していない。これまでの研究で、肺癌切除材料をXenograftedマウスに移植し、安定した生着結果を得てきた。そこで本研究の目的は、Xenograftedマウスモデルにおける抗癌剤感受性試験により肺癌薬物治療の効果予測のバイオマーカーを探索することである。

癌薬物治療の効果予測を目的とした研究は、現在まで多く報告されている。しかしその多くは、外科切除標本における分子生物学的な解析と臨床的な治療効果の関連を検討することにより、あるいは樹立され不活化された癌細胞株の腫瘍をマウスで作製し治療効果を解析することによりなされている。今回用いるこのXenograftedマウスモデルは、これらの既存の研究とは異なる新しい方法であり、次のような利点があると考えられる。第一に個々の患者から得られた腫瘍をマウスに再現し治療効果を評価するため、腫瘍の個体差を考慮に入れた治療効果予測が可能で

ある。同じ疾患の同じ組織型でも癌薬物治療に対する効果は必ずしも一様ではないことから、本研究ではより正確な治療効果予測が期待され、患者さんごとにオーダーメイドな治療法を選択することが可能になる。次いで、個体ごとの癌細胞をIn vitro培養系を経ずにin vivoで継代するため、培養液(FBSなど)や培養室(高CO<sub>2</sub>下培養)による修飾がない。実際のヒト腫瘍組織は高度なHeterogeneityを有するので、モノクローナルに増殖する細胞株を用いた動物モデルの解析と比べて、より生体内の腫瘍に近い状態で治療効果を検証することができる。第三に、治療効果を評価するにあたり、画像検査などの間接的な方法によらず、実験動物においてより直接的に測定できる点である。画像検査による腫瘍縮小効果が必ずしも正確に病理学的な殺腫瘍細胞の効果を反映していないことはしばしば経験されるが、本研究では個々の腫瘍の治療効果をより正確に評価することが可能と考えられる。最後に、本研究では通常困難である治療後のサンプルを含めて解析できるという点である。治療前後のサンプルを比較することにより現在までは知られていなかった新たなバイオマーカーが同定される可能性がある。以上より、本研究により今までの臨床サンプルや細胞株を用いた研究では得られなかった新しい知見が得られることが大いに期待される。

## B. 研究方法

### B-1: 移植マウスモデルの確立

2007年1月から2008年6月までに得られた46症例の腫瘍組織を約125mm<sup>3</sup>に切り分け、免疫不全マウスに移植し患者ごとに

Xenograftedマウスモデルを作製した。増殖が認められた移植片を継代移植するとともに、原発巣の組織との比較をHE染色により行った。

#### B-2: 倫理面への配慮

本研究では、非小細胞肺癌組織を用いて研究を行う。組織を用いる際は、法令に基づいて設置された大阪府立成人病センター倫理審査委員会において承認を受け、その利用方法を遵守する。また、患者個人に対し主治医もしくはインフォームド・コンセント担当者もしくは説明を行ない、遺伝子解析研究に対する署名、捺印を文書にて頂いている。臨床情報に関しては、大阪府立成人病センター内で匿名化され、その扱いに関しては、センター内の規定に従って扱う。

実験動物に関しては、動物実験等の実施に関する基本指針に基づき設置された大阪府立成人病センター内の動物実験委員会の規定に基づき実験を行う。

#### C. 研究結果

全 46 症例中 23 症例 (50%) で移植モデルが確立された。その内訳は、原発巣の肺癌から 20 症例 (20/43)、転移性大腸癌から 3 症例 (3/3) である。また、組織型別では、扁平上皮癌が 9 例 (9/15)、小細胞癌が 2 例 (2/2)、多形細胞癌が 3 例 (3/3)、腺癌が 6 例 (6/23) であった。確立した移植マウスは継代可能であり、症例数としては問題ないと考えている。HE 染色を行い、組織学的に検討したところ、腺癌は腺腔構造を有し、また扁平上皮癌は層状構造と部分的な壊死部分を含んでおり、外科切除標本と比べて相同性が観察された。

扁平上皮癌の外科切除腫瘍及び移植マウ

スから得られた腫瘍とはよく似た組織像であった (図 1)。また、肺腺癌の外科切除腫瘍及び移植マウスから得られた腫瘍もよく似た組織像であった (図 2)。一方、肺腺癌の培養細胞株 PC14 をマウスに移植した腫瘍では、外科切除腫瘍とは異なる組織像を示していた (図 2-C)。また、小細胞癌及び転移性大腸癌でも外科切除腫瘍と同様の組織像を示していた (図 3, 4)。また、腺癌の症例においては、移植マウスにおける腫瘍で組織内の組織像の多様性が認められた (図 5)。さらに、腎臓及び肝臓への浸潤像も確認された (図 6)。

Nude マウスと SCID マウスとの比較では、移植マウスの作製効率に差は認められなかった (表 1)。また、年齢や術後の移植までの時間に関しても作製効率に差は認められなかった (表 1)。

#### D. 考察・結論

外科切除腫瘍を直接マウスに移植するモデルマウスを確立した。培養細胞系よりも腫瘍組織の組織像や腫瘍細胞の多様性を保持していることが確認された。また、扁平上皮癌に比べ、腺癌の成功率が悪かったが、Nude マウス及び SCID マウスともに同じ傾向であり、腫瘍細胞の性質による違いであると考えられる。

これらのマウスモデルを用いた抗癌剤評価が可能であることが確かめられたため (総括研究報告参照)、分子標的薬の投与を行い、腫瘍縮小効果及び皮疹関連遺伝子の遺伝子発現を解析する。

E. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

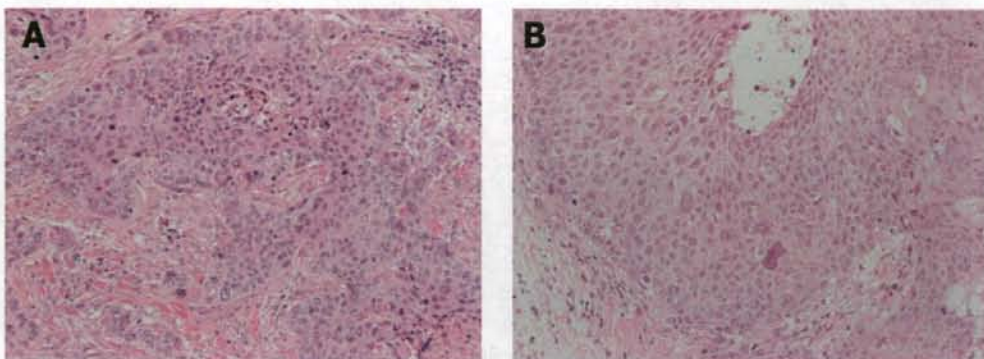
F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

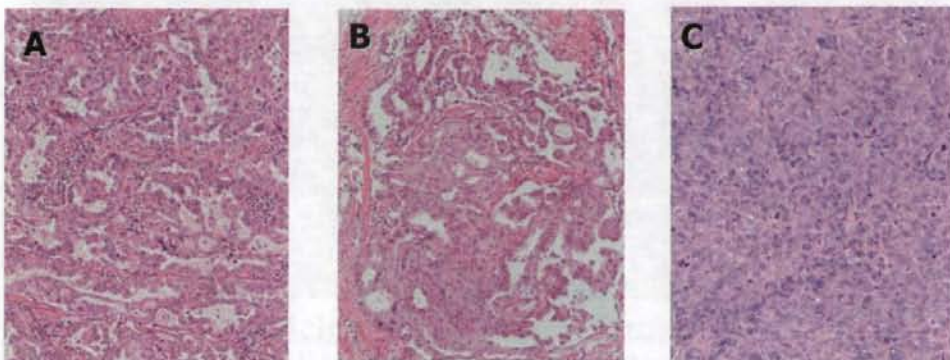
特になし

2. 実用新案登録

特になし



**Figure 1. Squamous cell carcinoma histology of surgical (A) and xenograft (B) samples.**



**Figure 2. Adenocarcinoma carcinoma histology of surgical (A), xenograft (B), and xenograft tumor of established cell line (PC-14) samples(C).**