

2010/00/3A

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22年度

総括研究報告書

研究代表者 谷口一也

平成23（2011）年5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22年度

総括研究報告書

研究代表者 谷口一也

平成23(2011)年5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
 - 谷口一也

- 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・・・・・・・・・・ 19
 - 岡見次郎

- III. 研究成果の一覧及び別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

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関連し、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27例を確立した。この系を用いて抗癌剤の評価を行い、シスプラチンの耐性腫瘍を得て解析を行った。

2. 肺癌サンプルを用いた遺伝子発現プロファイル解析

ゲフィチニブ投与症例、15症例（grade0 7, grade2 8）を用いて約41000遺伝子の解析が可能なDNAチップによる遺伝子発現解析を行った結果、 $p < 0.001$ の30遺伝子を同定した。これらのうち6遺伝子は2倍以上の差であった。これらの遺伝子の解析を今後行っていく。

3. 血漿中のctDNA（circulating tumor DNA）の検出によるT790M変異の解析

高感度遺伝子変異検出技術であるBEAMingを用いてctDNA（circulating tumor DNA）の検出とT790M耐性変異の検出に成功した。また、T790M（+）かつ皮疹のgrade2以上の群とそれ以外の群とでは $P = 0.003$ と有意に前者の予後（PFS）が良好であった。

主任研究者

谷ロー也

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

岡見次郎

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

副部長

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⁽¹⁾、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⁽²⁾。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^(3,4)。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^(5,6)。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^(7,8)、その後多くの追試が行われた⁽⁹⁾。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^(10,11)、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^(12,13)。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⁽¹⁴⁾。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。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とした。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。

また、ゲフィチニブに効果のある EGFR に変異を持つ症例において、EGFR 耐性変異である T790M の有無で治療後の生存期間や無増悪生存期間に差があることが報告された⁽¹⁵⁾。皮疹の grade と治療効果に関連があることはこれまで述べたように報告されているが、T790M と皮疹の grade に関連があるのかについては明らかでない。そこで、担癌患者の血液中に存在する ctDNA (circulating tumor DNA) を解析することで T790M の有無を測定し、T790M の有無と皮疹の grade の関連を調べた。

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 125mm³ 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。シスプラチンおよびジェムシタビン、アバスチンによる抗癌剤治療を行った。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 8 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した。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した。

B-4 : 血漿中の ctDNA (circulating tumor DNA) の検出による T790M 耐性変異の解析

BEAMing (beads, emulsions, amplification, magnetics) はオイルエマルジョン中で PCR 反応を行い1個のナノ粒子に1分子由来の PCR 産物を固定した後、当該部位の正常及び変異塩基を異なった蛍光色素で標識・検出する方法である。血漿中のように正常配列が多数存在する場合でも、1/10000の感度で解析が可能であり、T790M 及び EGFR 活性化変異の検出手法として確立した(図1,2)。この手法を用い、ゲフィチニブまたはエルロチニブ耐性患者23症例から全血5mlを採取し、遠心の後上澄みの血漿を回収、DNAを抽出して測定に用いた。

BEAMingの測定結果と皮疹のgradeを比較検証した。

B-5 : 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60症例試みたところ、27例確立された。肺腺癌(8/30症例)よりも肺扁平上皮癌(13/24症例)の成功率が高かった。その他の臨床因子に特徴的な差は見られなかった(表1)。

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、シスプラチンに加え、ジェムシタビン、アバスタチンの投与を行ったところ、3剤の抗腫瘍効果の評価が可能であった(図8)。この場合は、シスプラチンの効果が一番期待される。

C-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。15症例(grade0 7, grade2 8)を用いた解析の結果、 $p < 0.001$ の30遺伝子を同定

した。これらのうち6遺伝子は2倍以上の差であった。

また、30遺伝子のうち遺伝子名が確認できる遺伝子は18遺伝子であり、そのうち15遺伝子はgrade2で発現量が高くなっていた

(表2)。現在これらの遺伝子上のSNP及び遺伝子異常を肺腺癌40例の癌部、非癌部を用いて次世代シーケンサーによる配列解析を行っている(表3)。Agilent社のsureselectを用い、30遺伝子のエクソン部位のみをDNAから抽出し、Illumina社のGAiixによる解析を行っている。

C-4: 血漿中のctDNA (circulating tumor DNA) の検出によるT790M耐性変異の解析

1) 測定精度の評価

BEAMingの感度について評価するためT790M mutant-type 100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0%のtemplate DNAを用いてBEAMingを行った。それぞれ10回ずつ測定し、その測定係数から標準偏差を算出することでBEAMingにおける定量性を評価した。その結果、0.01%と微小な変異を検出する時でも高い定量性を保ち測定が可能であることが明らかとなった。

2) 血漿中のctDNAの定量的測定

L858Rの点変異、exon19の失欠変異などの検出を行い、EGFR変異を持つ肺癌患者の血漿中から72% (31/43例)の割合で検出できた。また、ゲフィチニブまたはエルロチニブ耐性患者の43% (10/23例)からT790Mが検出された。耐性患者の約半数でT790Mが検出されることが予測されることから、T790Mを持つほとんどの患者で検出が可能であったと考えられる。また、耐性変異と活性化変異の定量解析の結果から耐性

変異アレルの存在割合が計算でき、13%~94%と広く分布していた。13%と94%では耐性細胞の割合が大きく異なっていると考えられる。

3) 臨床指標との関連解析

血漿中のctDNA量と皮疹のgradeには相関は無かった($p=0.67$:相関係数)。今回解析したctDNA量は皮疹発生時ではなく、薬剤耐性が生じた後であったため、今後は皮疹発生時のctDNA量を測定していく。

次に、T790Mの有無と皮疹のgradeでは、 $P=0.076$ (カイ二乗検定)であった。有意差はなかったが、予想とは異なりT790Mのない群で皮疹のgradeが高かった。

この結果を受けて、T790Mの存在と皮疹のgradeが高い群はそれぞれ独立して予後に関連していると考え、T790M (+)かつ皮疹のgrade2以上の群とそれ以外の群とで、ゲフィチニブ投与後のPFSを解析すると、 $P=0.003$ (Log Rank test)と有意に前者の予後がよかった(図9)。

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⁽¹⁶⁾。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^(17~26)。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^(21,22)。同様の報告はセツキシマブでも報告されて

いる^(23~26)。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り、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⁽²⁸⁾。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。臨床では対処療法、投薬量の減量により皮疹を多くの場合はコントロールできるようになってきた。しかし、日焼け止めが皮疹の発生に関連が無いことが明らかにされるなど⁽²⁹⁾ 対処療法には限界があり、また投薬量の減量により治療効果が最大限に得られていないと考えられる。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⁽³⁰⁾、Liu らは、216 塩基部位の SNP(G/T)が⁽³¹⁾ 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

⁽³²⁾。

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った。同定された 30 遺伝子に関しては、癌部及び非癌部のシーケンスを全エクソンにわたり解析しており、変異及び SNP の解析を行い、皮疹との関連を明らかにしていきたい。

また、発現プロファイル解析により同定された 30 遺伝子の抗癌剤投与時の変動を移植マウスモデルにより解析する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。

血漿中の ctDNA を用いた解析では、ctDNA の検出および定量化に成功した。本解析に用いた 23 症例では皮疹単独ではゲフィチニブ投与後の PFS に有意差はなかったが T790M (+) かつ皮疹 grade2 以上の群とそれ以外の群とでは有意に前者の予後がよかった。また、皮疹の grade2 以上の群に 3 年以上の効果がみられた症例 (T790M(-)) が含まれるなど、T790M とは異なる予後因子であることが示唆された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 「 Genetic and epigenetic characteristics of human multiple hepatocellular carcinoma.」

Taniguchi K, Yamada T, Sasaki Y, Kato K
BMC Cancer 2010 October;6.10:530.

(2) 「 Conversion of a molecular classifier obtained by gene expression profiling into a classifier based on real-time PCR: a prognosis predictor for gliomas.」

Kawarazaki S, Taniguchi K, Shirahata M, Kukita Y, Kanemoto M, Mikuni N, Hashimoto N, Miyamoto S, Takahashi JA, Kato K
BMC Medical Genomics 2010 November 10;3(1):52.

2. 学会発表

(1)Detection of T790M Gefitinib Resistance Mutation in EGFR using the BEAMing method

Taniguchi K, Nishitani K, Okami J, Kodama K, Higashiyama M, Kato K.

AACR2010 April 19, 2010

(2)Detection of T790M Gefitinib Resistance Mutation in EGFR using the BEAMing method

Taniguchi K, Nishitani K, Okami J, Kodama K, Higashiyama M, Kato K.

第 69 回日本癌学会総会 2010 年 9 月 23 日 大阪

(3)Conversion of a molecular classifier for gliomas based on gene expression profiling into a classifier based on real-time PCR

Kawarazaki S, Shirahata M, Taniguchi K, Kukita Y, Mikuni N, Takahashi JA, Hashimoto N, Miyamoto S, Kato K

第69回日本癌学会総会2010年9月23日 大阪

(4) Assessment of the correlation between MGMT promotor methylation and clinical outcome of Glioblastoma patients

Kanemoto M, Shirahata M, Taniguchi K, Kukita Y, Yamaguchi M, Arakawa Y, Mikuni N, Miyamoto S, Kato K

第69回日本癌学会総会2010年9月23日 大阪.

H. 研究協力者

塩崎桃子 大阪府立成人病センター・
臨床検査技師

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 EGF R 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.

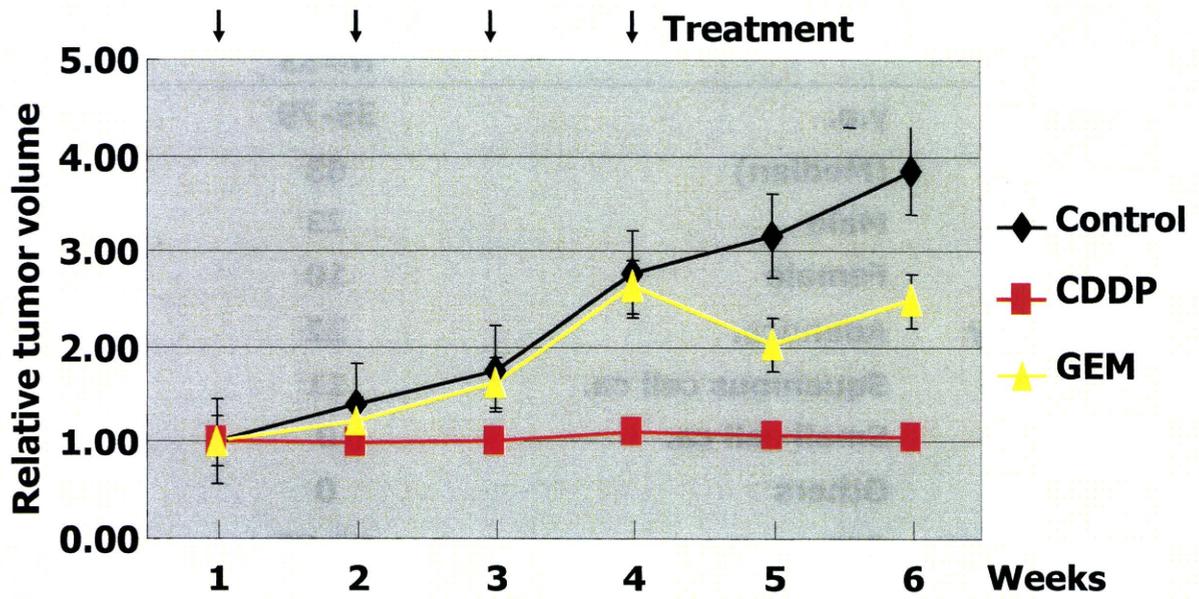
15. Oxnard GR, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation.

- Clin Cancer Res. 2011 Mar 15;17(6):1616-22
16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 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. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Abbruzzese JL, et al. Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab (IMC-C225)

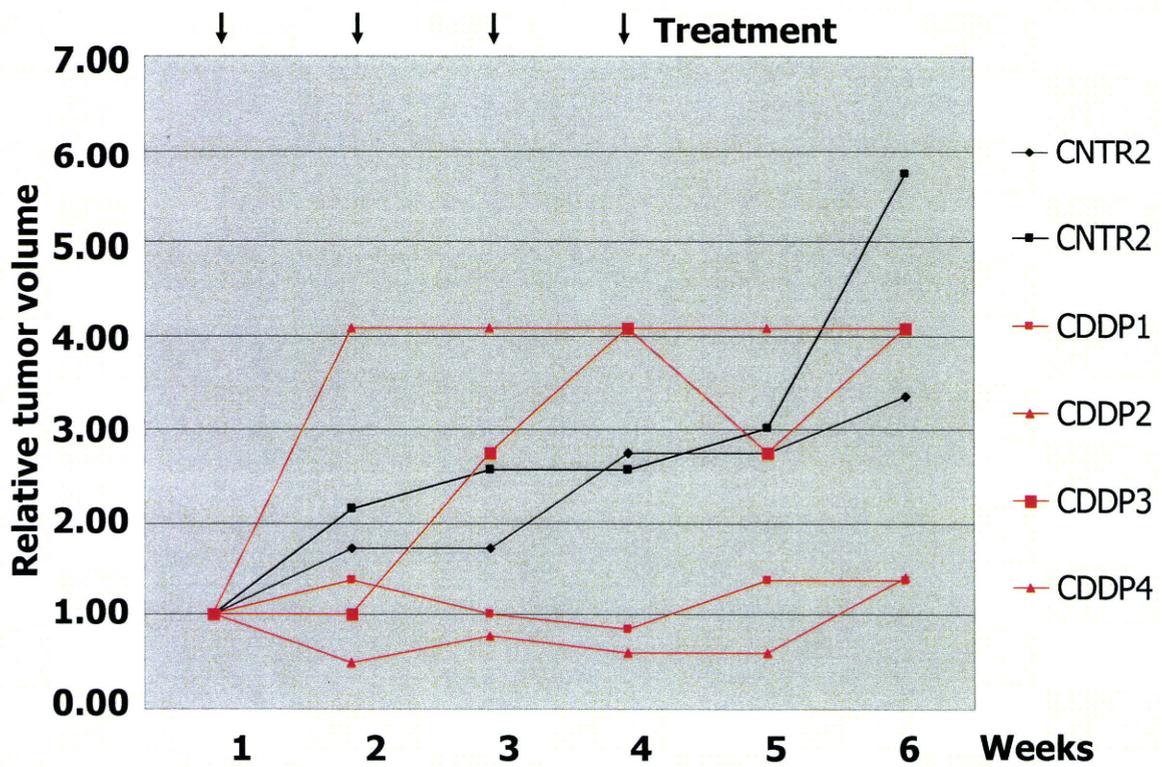
- in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. Proc Am Soc Clin Oncol. 2001;20:130a. Abstract 518.
27. Burtneß B, et al. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. J Clin Oncol. 2005; 23:8646-8654.
28. 清原祥夫 日本呼吸器学会雑誌, 2008; 46:83.
29. Jatoi A, et al. Does sunscreen prevent epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor-induced rash? Results of a placebo-controlled trial from the North Central Cancer Treatment Group (N05C4). Oncologist. 2010;15(9):1016-22.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

表1：組織移植マウスの作製成功率

Patients' and oncological factors		Fail N=33	Success N=27
Age	y.o.	35-79	44-80
	(Median)	63	71
Gender	Male	23	24
	Female	10	3
Histology	Adenoca.	22	8
	Squamous cell ca.	11	13
	Small cell ca.	0	2
	Others	0	4
Tumor size	mm	16-80	15-100
	(Median)	33	34
Stage	stage I	14	12
	stage II or more	19	22



☒1 : LK001P2



☒2 : LK002P2

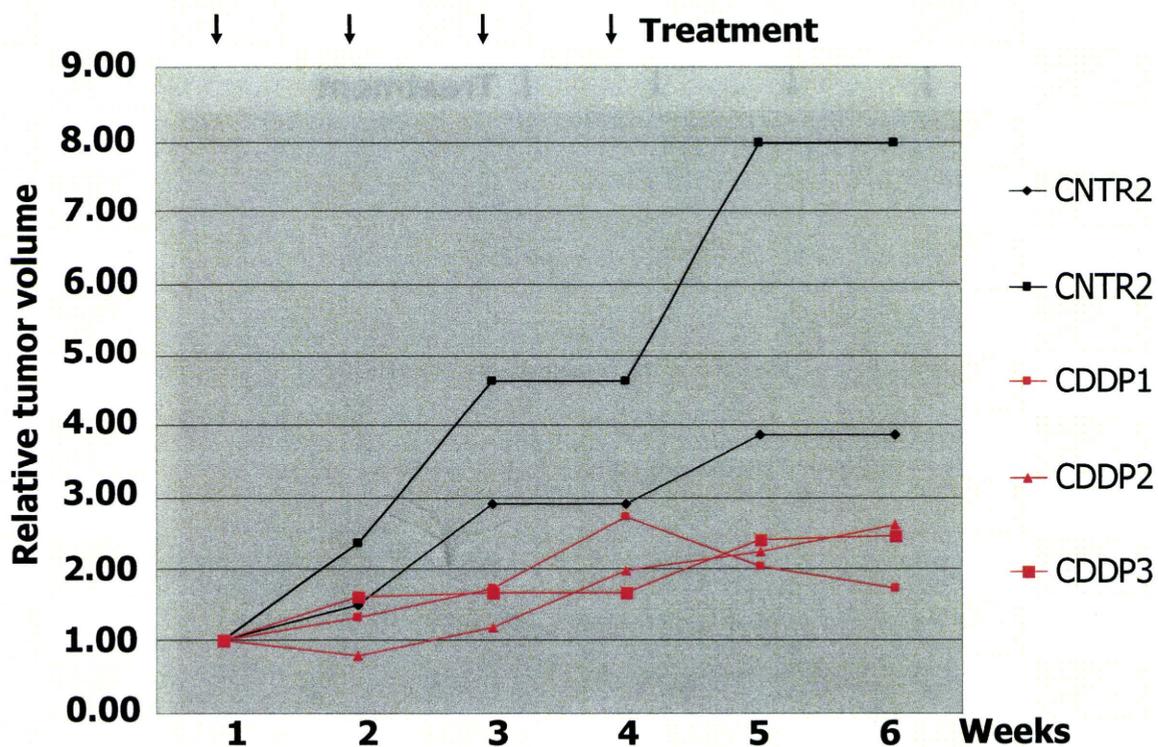


Figure 3 : LK003P1

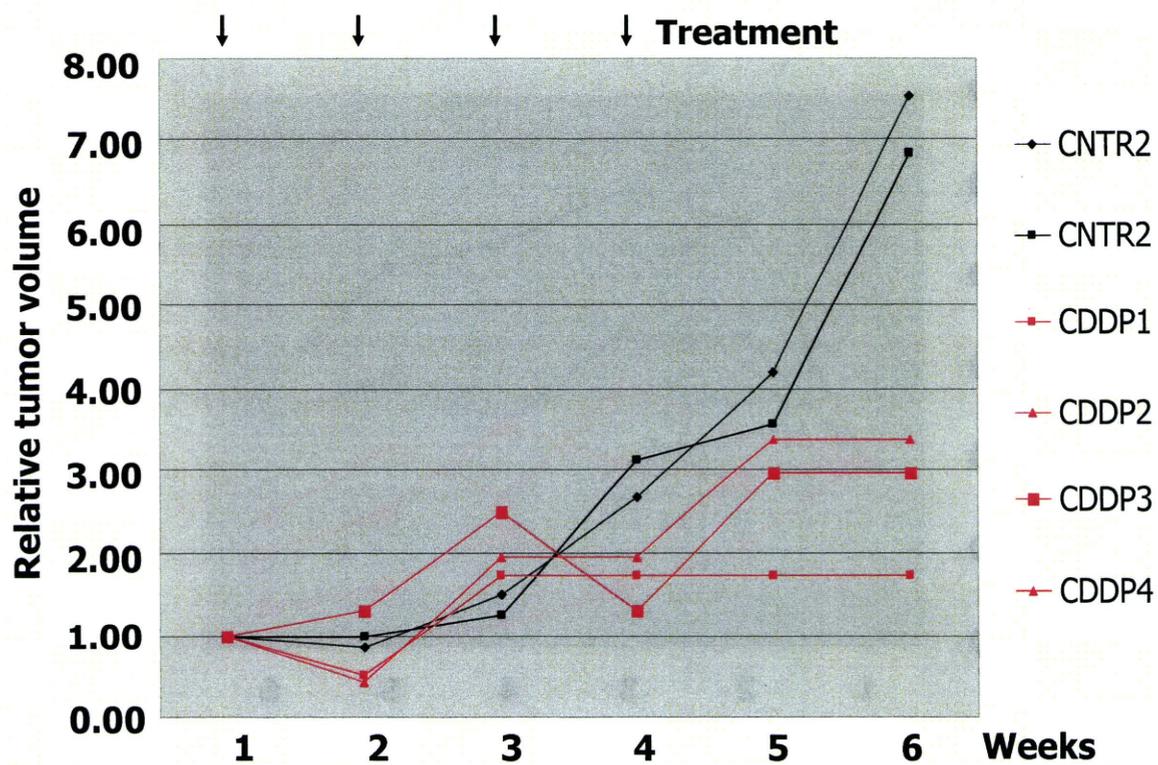


Figure 4 : LK004P1

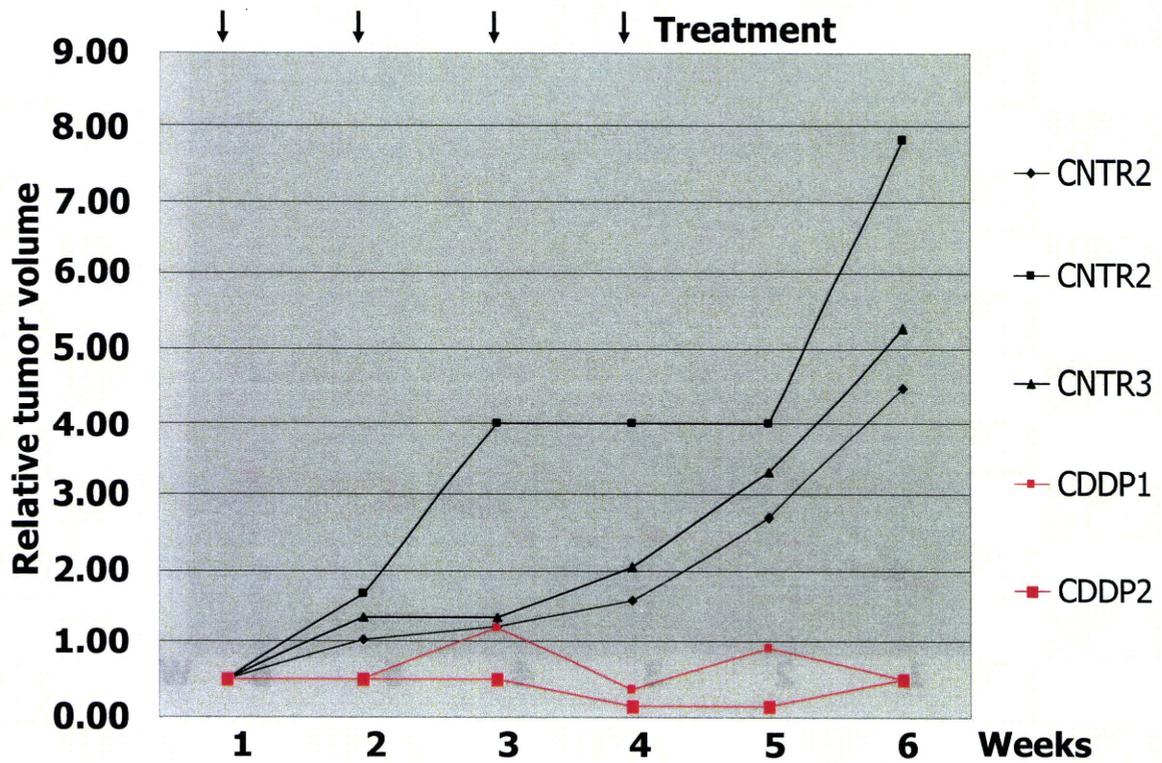


Figure 5 : LK005P1

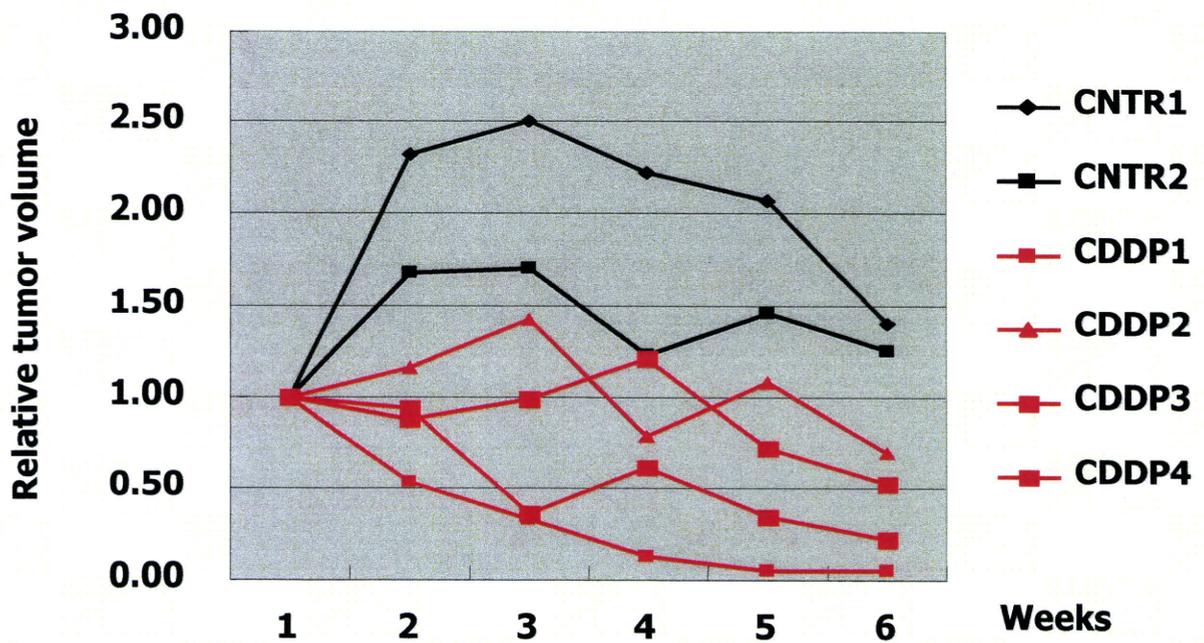


Figure 6 : LK006P1

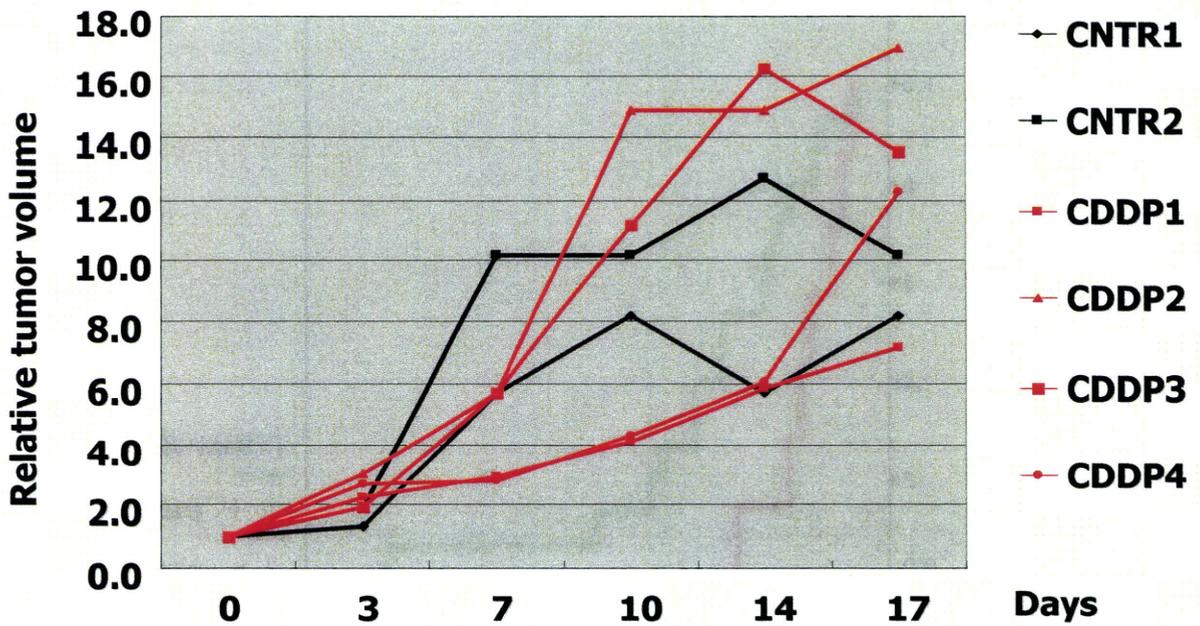
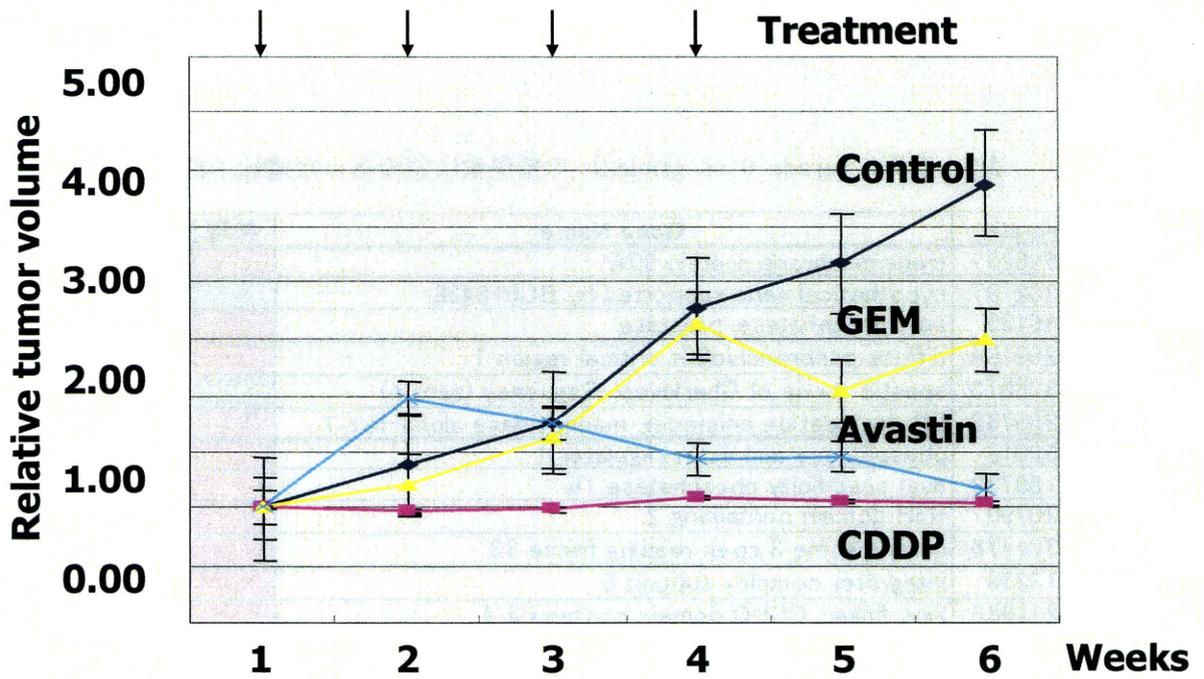


図7 : PC14



CDDP; 5mg/kg ip weekly, Gemcitabine; 125mg/kg ip weekly, Avastin 15mg/kg ip twice a week.

図8 : 組織移植マウスモデルによる抗腫瘍効果の判定

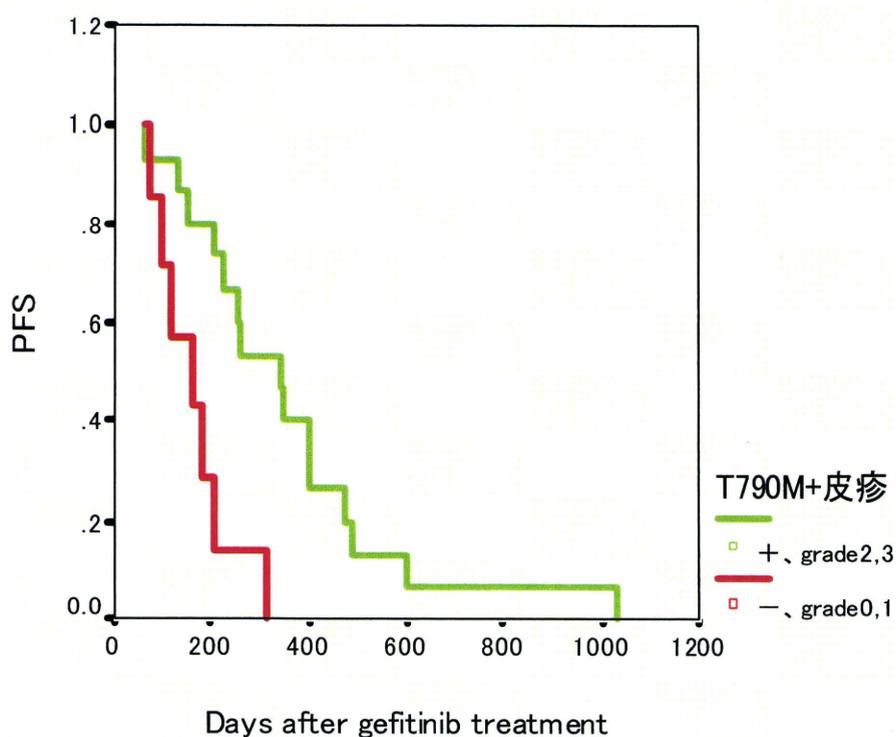


図9：T790M及び皮疹の有無によるゲフィチニブ投与後の生存曲線解析

表2：皮疹（grade 0 vs grade2）で発現量に差のあった遺伝子群

Systematic	Gene Name	発現量比	P値
A_24_P595237	transmembrane protein 90A	2.98	0.00041
A_23_P302787	hypothetical gene supported by BC013438	2.95	0.00087
A_24_P46130	acid phosphatase, prostate	2.62	0.00063
A_24_P269184	diffuse panbronchiolitis critical region 1	2.11	0.00098
A_23_P308073	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin)	1.63	0.00093
A_24_P285768	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	1.62	0.00002
A_32_P52018	phosphatase and actin regulator 1	1.61	0.00083
A_24_P189739	dual specificity phosphatase 16	1.58	0.00088
A_24_P207907	R3H domain containing 2	1.54	0.00023
A_23_P301476	chromosome 3 open reading frame 33	1.53	0.00008
A_23_P13338	integrator complex subunit 5	1.44	0.00041
A_23_P212983	zinc finger, CCHC domain containing 4	1.44	0.00064
A_23_P39718	fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)	1.41	0.00084
A_23_P214474	prickle homolog 4 (Drosophila)	1.40	0.00069
A_23_P51572	translin-associated factor X	1.39	0.00047
A_24_P203678	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	1.39	0.00097
A_24_P15797	nudix-type motif 22	1.38	0.00044
A_23_P24515	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	1.34	0.00021

表3：遺伝子変異及びSNP検索に用いた40症例のリスト

No.	SEX	AGE	HIS	Stage	EGFR mutation
LUN023	男	74	Adenoca	2B	del2238-2256 insGCAA
LUN025	男	46	Adenoca	3A	
LUN026	男	69	Adenoca	3A	
LUN027	女	64	Adenoca	1B	del2235-2249
LUN028	男	75	Adenoca	1B	
LUN030	女	66	Adenoca	1A	T2573G
LUN031	女	71	Adenoca	1B	del2235-2249
LUN035	男	73	Adenoca	1B	T2573G
LUN036	男	74	Adenoca	1B	T2573G
LUN037	女	72	Adenoca	1B	T2573G
LUN042	男	60	Adenoca	2B	
LUN046	男	79	Adenoca	1B	T2573G
LUN048	男	64	Adenoca	1A	dup2219-2236
LUN049	男	75	Adenoca	1A	
LUN053	女	54	Adenoca	3A	del2240-2257
LUN055	女	58	Adenoca	1B	del2236-2250
LUN058	男	55	Adenoca	3A	del2240-2257
LUN059	女	53	Adenoca	3B	T2573G
LUN064	女	55	Adenoca	3A	
LUN073	男	65	Adenoca	1A	
LUN075	女	50	Adenoca	1A	del2236-2250
LUN078	男	69	Adenoca	3B	
LUN079	女	71	Adenoca	3A	del2237-2253 insTTGCT
LUN080	女	67	Adenoca	1B	T2573G
LUN083	男	71	Adenoca	1B	
LUN086	男	52	Adenoca	1B	dup2215-2232
LUN087	女	54	Adenoca	1A	T2573G
LUN093	女	80	Adenoca	1B	del2235-2249
LUN095	男	51	Adenoca	1B	
LUN096	男	64	Adenoca	1B	
LUN097	男	59	Adenoca	3A	del2240-2254
LUN101	男	66	Adenoca	3A	
LUN102	男	71	Adenoca	2A	
LUN104	男	74	Adenoca	1B	
LUN106	男	73	Adenoca	3B	
LUN108	女	68	Adenoca	3A	
LUN109	男	75	Adenoca	4	del2235-2249
LUN111	男	74	Adenoca	2B	
LUN113	女	45	Adenoca	1A	del2235-2249
LUN117	男	68	Adenoca	2B	G2533C
LUN120	男	49	Adenoca	3A	
LUN121	女	67	Adenoca	3A	G2156C
LUN123	男	74	Adenoca	1B	del2235-2249
LUN126	男	69	Adenoca	1B	
LUN134	男	61	Adenoca	1A	
LUN135	男	44	Adenoca	3A	
LUN137	男	69	Adenoca	1B	del2235-2249
LUN139	男	61	Adenoca	3B	