

201010013B

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20～22年度

総合研究報告書

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

総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
- III. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

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。

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。確立したマウスは組織型や Ki-67、p53 の発現量の比較でも切除標本と一致していた。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、S100 遺伝子群がシスプラチン耐性に関与している可能性を示した。

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。これらの遺伝子に関して全エクソン解析を行っている。

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

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。

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。

また、皮疹関連遺伝子の発現状況を捉えるための *Xenografted* マウスの作製を試みる。我々は肺癌切除材料を *Xenografted* マウスに移植し、安定した生着結果を得てきた。そこで *Xenografted* マウスモデルを用い抗癌剤感投与時のバイオマーカーの探索を試みた。今回用いる *Xenografted* マウスモデルは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 CO₂ 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：肺癌組織移植マウスの作製

2007年1月から2009年3月までに得られた60症例の腫瘍組織を約125mm³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：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)およびジェムシタビン(10mg/kg once a week for 4 weeks)、アバスタチン(15mg/kg twice 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。

また、作製したマウスモデルに対し、継続してシスプラチンの投与を行った。4ヶ月以上投与を続け抵抗性を持つことが確認されたシスプラチン投与、非投与の3症例(6サンプル)に関して発現プロファイル解析を行った。

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。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。その内訳は、扁平上皮癌が 13 例 (13/24)、小細胞癌が 2 例 (2/2)、多形細胞癌が 4 例 (4/4)、腺癌が 8 例 (8/30) 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。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)。次に、作製された移植マウス中での組織の増殖スピードと原発巣の大きさを比較したところ、弱いながらも正の相関が得られた ($R^2=0.1694, p=0.0454$, 図 1)。

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ではよく似た組織像であった (図 2)。

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 3)。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 4, 5)。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 6)。さらに、腎臓及び肝臓への浸潤像も確認された (図 7)。

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 2)。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 2)。

次に、免疫組織化学染色による解析を行った。Ki-67、p53 の染色像は外科摘出サンプルと移植マウスとではほぼ一致していた (図 8)。また、1 サンプルのみの解析ではあるが、CD56、Synapto、Chr-A、PAS に関しても一致していた (表 3)。

さらに、シスプラチン耐性を獲得した組織像の観察では、原発巣とのはっきりとした組織的な違いはみられなかった (図 9)。

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 10 ~ 図 15)。しかし、治療効果の評価が難しい 1 例もみられた (図 12)。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 16)。

次に、シスプラチン耐性腫瘍を 3 症例から確立し、発現プロファイル解析を行った。シスプラチンを投与しない対象群との比較では、 $P<0.001$ の 23 遺伝子を同定した (表 4)。

また、両群で発現に差のある遺伝子群を同定するために GSEA 解析を行った。GSEA 解析の結果、S100 関連遺伝子が、

Enrichment Score(ES)=0.765、Normalized Enrichment Score(NES)=1.935、Nominal P-value =0.000、FDR P-value=0.013と有意に偏りがみられた(図17)。また、S100 関連遺伝子の2群間のP値はそれぞれ表5に示す通りである。

さらに、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18)。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。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6)。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7)。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延長していた (図19)。

D. 考察

D-1 : 考察背景

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⁾。

D-2 : 皮疹関連遺伝子の同定

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。

D-3 : マウスモデルの構築

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

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。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。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。

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膚癌関連遺伝子の遺伝子発現を解析していく。

また、得られたシスプラチン耐性組織の発現解析を行い、シスプラチン耐性機構の解明を試みた。GSEA解析で関連が見出された S100 関連遺伝子のほとんどの S100 関連遺伝子が耐性群で高発現になっており、これらの遺伝子がシスプラチンの耐性に関与している可能性が示唆された。

D-4 : T790M 耐性変異と皮疹の関連

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

延長していた。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、皮疹の grade は T790M とは異なる予後因子であることが示唆された。

E. 結論

E-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。確立したマウスは組織型や Ki-67、p53 の発現量の比較でも切除標本と一致していた。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、S100 遺伝子群がシスプラチン耐性に関与している可能性を示した。

E-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。これらの遺伝子に関して全エクソン解析を行っている。

E-3 : 血漿中の ctDNA (circulating tumor DNA) の検出による T790M 耐性変異の解析
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。

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.

(3) 「 Sublobar resection provides an equivalent survival after lobectomy in elderly patients with early lung cancer.」
Okami J, Ito Y, Higashiyama M, Nakayama T, Tokunaga T, Maeda J, Kodama K. Ann Thorac Surg. 2010 Nov;90(5):1651-6.

(4) 「 Clinical value of F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography in patients with non-small cell lung cancer after potentially curative surgery: experience with 241 patients.」 Kanzaki R,

Higashiyama M, Maeda J, Okami J, Hosoki T, Hasegawa Y, Takami M, Kodama K. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2010 Jun;10(6):1009-14.

(5) 「 Prediction of chemotherapeutic effect on postoperative recurrence by in vitro anticancer drug sensitivity testing in non-small cell lung cancer patients.」

Higashiyama M, Oda K, Okami J, Maeda J, Kodama K, Imamura F, Minamikawa K, Takano T, Kobayashi H. Lung Cancer. 2010 Jun;68(3):472-7.

(6) Surgical treatment for patients with solitary metastasis in the mediastinal lymph node from renal cell carcinoma. Kanzaki R, Higashiyama M, Okami J, Kodama K. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2009 Apr;8(4):485-7. Epub 2009 Jan 5.

(7) Innate immune therapy with a Bacillus Calmette-Guérin cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study. Kodama K, Higashiyama M, Takami K, Oda K, Okami J, Maeda J, Akazawa T, Matsumoto M, Seya T, Wada M, Toyoshima K. Surg Today. 2009;39(3):194-200. Epub 2009 Mar 12.

(8) Malignant pleural mesothelioma with long-term tumor disappearance of a local relapse after surgery: a case report. Higashiyama M, Oda K, Okami J, Maeda J, Kodama K, Imamura F. J Med Case Reports. 2009 Mar 27;3:6800.

(9) Pulmonary resection in patients aged 80 years or over with clinical stage I

non-small cell lung cancer: prognostic factors for overall survival and risk factors for postoperative complications. Okami J, Higashiyama M, Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, Nakanishi Y, Tsuchiya R, Miyaoka E; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. *J Thorac Oncol.* 2009 Oct;4(10):1247-53.

(10) Solitary pulmonary metastasis of mucoepidermoid carcinoma of the palate 43 years after the initial treatment. Okami J, Tomita Y, Higashiyama M, Kodama K. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009 Oct;9(4):728-9. Epub 2009 Jul 22.

(11) A case report of large thymic hyperplasia associated with hyperthyroidism. Takami K, Omiya H, Higashiyama M, Maeda J, Okami J, Oda K, Tsujinaka T, Kodama K. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Dec;15(6):404-7.

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.

(5) Kazuya Taniguchi, Terumasa Yamada, Yo Sasaki, Kikuya Kato. Genetic and epigenetic aberrations in human multiple hepatocellular carcinoma. AACR(米癌学会、第100回総会) 2009年4月18日 コロラド、デンバー

(6) Jiro Okami, Kazuya Taniguchi, Masahiko Higashiyama, Jun Maeda, Kazuyuki Oda, Naoki Orita, Kyoko Koizumi, Ken Kodama, Kikuya Kato. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation of response to gefitinib. IASLC2009 (世界肺癌学会2009) 2009年7月31日 サンフランシスコ

(7) Kimiyoshi Nishitani, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Ken Kodama, Masahiko Higashiyama, Kikuya Kato. Detection of EGFR Gene T790M mutation

in Non-Small Cell Lung Cancer using an improved version of the BEAMing technology. 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 横浜

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

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.
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.
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.
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. (Median)	35-79 63	44-80 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 (Median)	16-80 33	15-100 34
Stage	stage I	14	12
	stage II or more	19	22

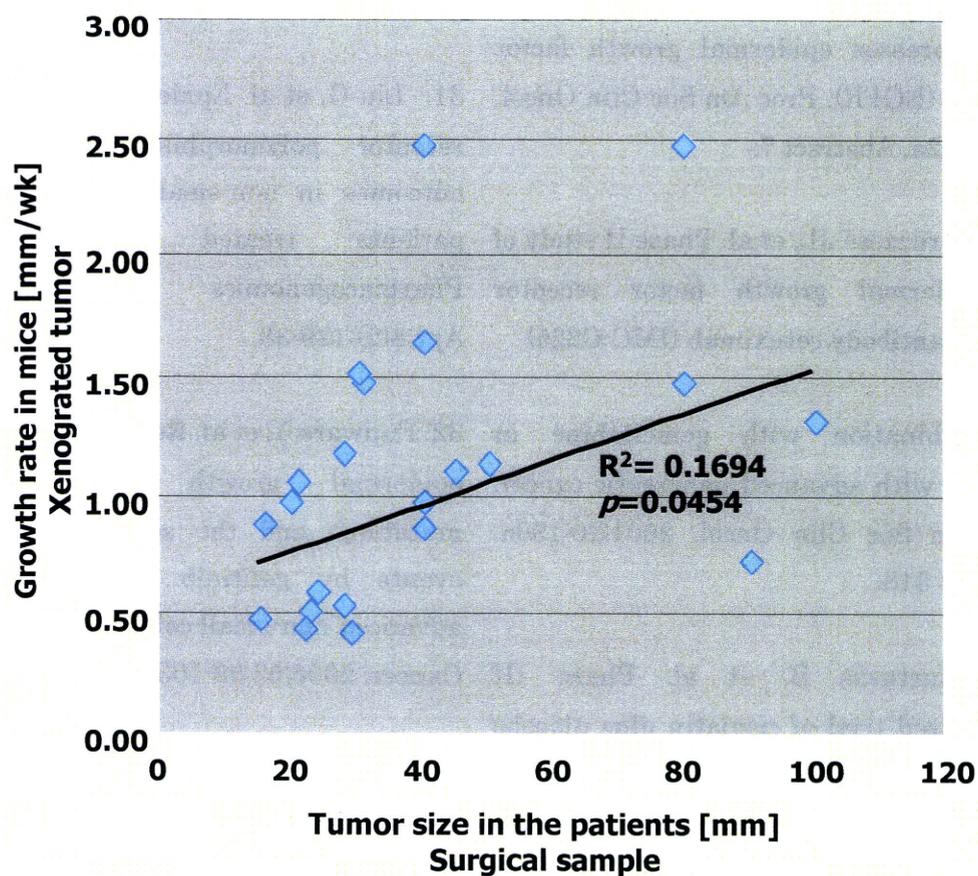


図1：原発巣の腫瘍径と移植組織の増殖速度との相関

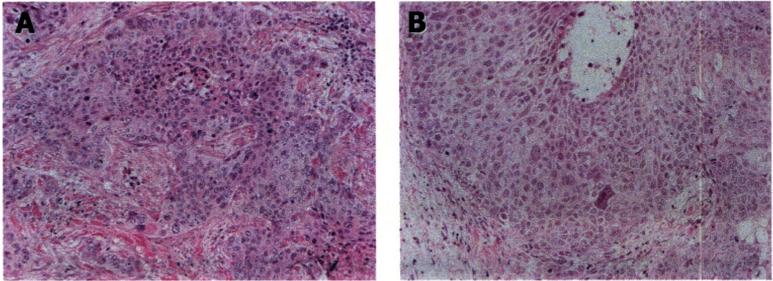


Figure 2. Squamous cell carcinoma histology of surgical (A) and xenograft (B) samples.

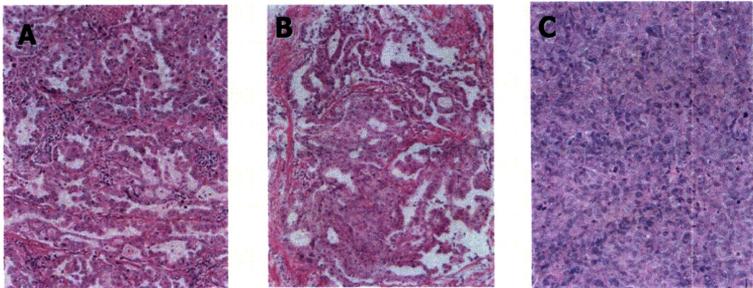


Figure 3. Adenocarcinoma carcinoma histology of surgical (A), xenograft (B), and xenograft tumor of established cell line (PC-14) samples(C).

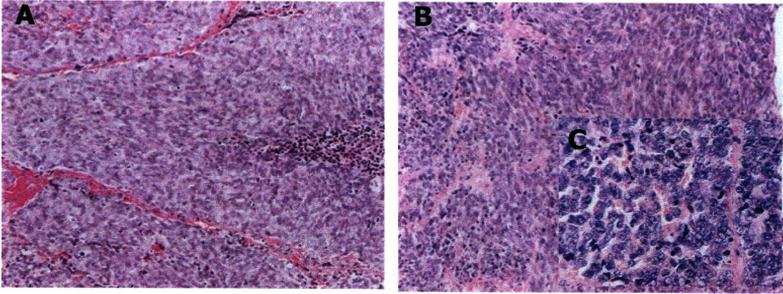


Figure 4. Small cell lung carcinoma histology of surgical (A) and xenograft (B) (C) samples.

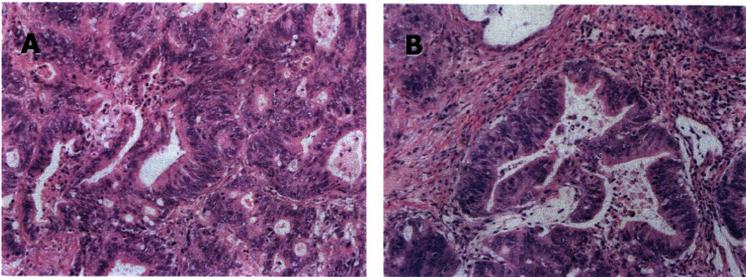


Figure 5. Metastatic colon cancer in the lung.

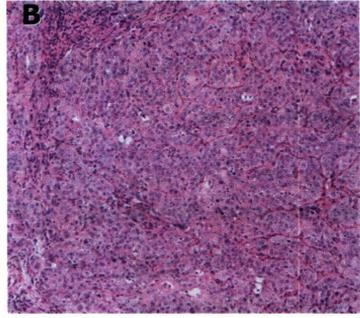
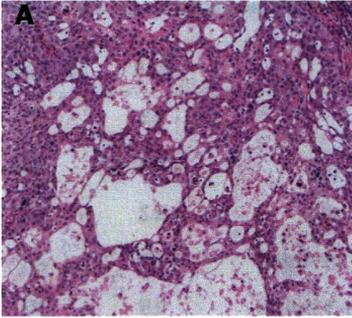


Figure 6. Histological heterogeneity of a xenograft tumor.

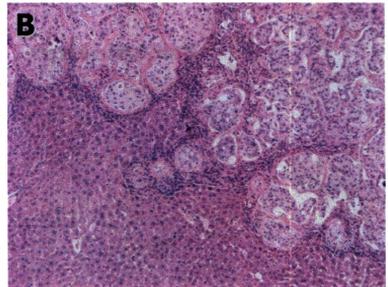
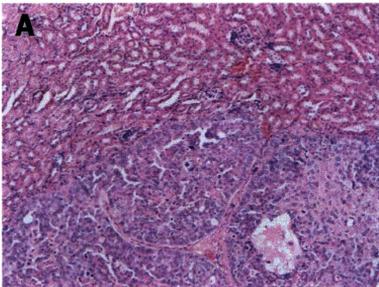


Figure 7. Direct invasion into adjacent organs of xenograft tumors.