

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430159

研究課題名(和文) 肺癌におけるcMetによるtopoisomerase Iの活性制御の解析

研究課題名(英文) Regulation of Topoisomerase I activity by cMet in lung cancer

研究代表者

笠原 寿郎 (Kasahara, Kazuo)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30272967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌における増殖因子受容体cMetと核内DNA複製酵素のTopoIの関連を検討した。10種類の培養細胞を用いてcMetを検討したところ5細胞株でcMet高発現、リン酸化亢進を認めた。核内のTopoI発現、活性はcMet高発現細胞で高く活性も亢進しており、TopoI阻害剤の感受性と関連していた。cMet阻害で、TopoIも低下した。下流シグナルの検討では、TopoI発現に関連する29の候補遺伝子を同定した。臨床検体を用いた解析で、cMetは37.7%、TopoIは51.3%で陽性を指名し、有意な相関を認めた。cMetがTopoI発現を調節している可能性が示唆され、治療戦略確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationship between cMet and Topoisomerase I lung cancer. Protein expression and phosphorylation of cMet using 10 lung cancer cell lines revealed high expression and hyperphosphorylation in 5 cell line. Expression and activity of Topo I were higher in cMet overexpressing cells and were related to the sensitivity of Topo I inhibitors. Inhibition of cMet by Met inhibitor also decreased Topo I. Upon examination of the downstream signaling, 29 candidate genes associated with Topo I expression were identified by cMet stimulation and suppression. In analysis using clinical donation, cMet nominated positive with 37.7% and Topo I at 51.3%, showing a significant correlation. This study suggests that cMet may regulate the expression of Topo I and we believe that it will bring important findings to establish future treatment strategies

研究分野：呼吸器内科 胸部悪性腫瘍の治療

キーワード：cMet Topoisomerase I Lung cancer

1. 研究開始当初の背景

肺癌薬物療法は、分子生物学の進歩と大規模臨床試験により分子標的が同定され、細分化されるてきた。我々は増殖因子受容体であり、かつ EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤の耐性因子として重要な cMet に注目している。また DNA トポイソメラーゼ I(TopoI)は DNA 複製に必要で、イリノテカンの標的酵素である。我々は cMet と TopoI の関連に注目した。

2. 研究の目的

肺癌における cMet の発現状況を検索し、cMet が TopoI 発現、活性調節にどのような役割を果たしているかを解析することを目的とした。そのため、細胞株における cMet と TopoI の直接的な関連の解析、cMet 刺激、抑制による下流シグナルの変化、臨床検体における cMet と TopoI の関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌株 9 種類を用いて解析した。実験に用いた細胞株を表 1 に示す。cMet および TopoI 蛋白発現は Western blot 法を用いて行った。感受性試験は WST-1 を用いた。

表 1 実験に用いた細胞株とその性質

細胞	組織型	遺伝子変異
PC-9	肺腺癌	EGFR19del
PC-9/met	gefitinib 耐性株	EGFR19del MET 過剰発現
H1975	肺腺癌	EGFR L858R+T790M
A549	肺胞上皮腺癌	Kras 変異
EBC1	肺扁平上皮癌細胞	Met 過剰発現
H441	乳頭状肺腺癌細胞	(-)
H1993	肺腺癌	(-)
H596	肺腺扁平上皮癌	(-)
H2228	非小細胞肺癌	ALK 転座

(2) 上記の細胞株から A549 を選び Met のリガンドである Hepatocyte growth factor (以下 HGF) による cMet の刺激、Met 阻害剤である SU11274 による Met リン酸化阻害、あるいは両社の併用を行った。マイクロアレイを用いた pathway 解析を行い、TopoI 発現と並行して動く下流シグナルの変化を解析した。

(3) 臨床検体における Met 発現状況を免疫染

色で、および遺伝子増幅を fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で検討し、TopoI との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) cMet、リン酸化 Met、TopoI の発現状況を図 1、2 に示す。Met は EBC-1, H441, PC-9/Met、H2228、H1993 で高発現を示した。PC-9、A549、H1975、H596 では発現は低かった。TopoI の発現は EBC-1、H441、H2228、H1993 で高かった。

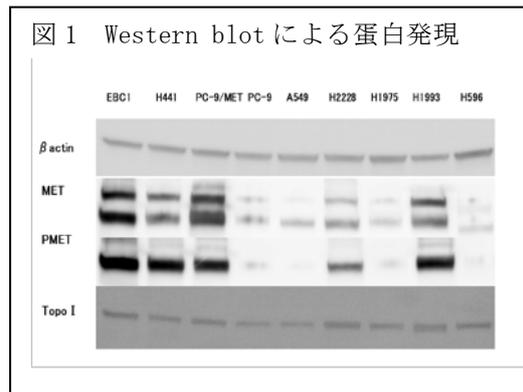


図 2 蛋白発現の定量化比較

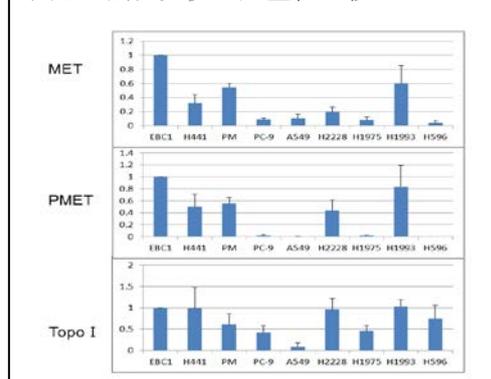
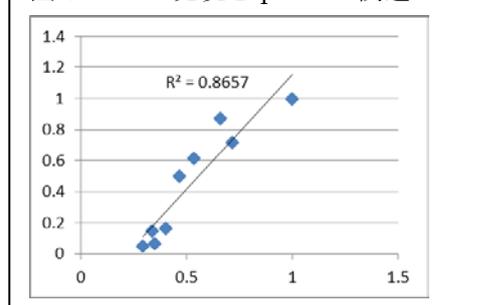


図 3 cMet 発現と pMet の関連



Met と TopoI の発現、TopoI 阻害剤、Met 阻害剤との関連を検討した。リン酸化 Met と cMet には強い相関がみられた ( $r=0.93$  図 3)。cMet と TopoI 蛋白発現には正の相関 ( $r=0.56$  図 4) がみられた。また、TopoI 阻害剤である SN38 の感受性はリン酸化 Met 発現が高い細胞株で有意に低く (図 5)、SU11274 感受性はリン酸化 Met 高発現株で良好な傾向がみられた (図 5)

図4 cMet 発現と TopoI 発現の関連

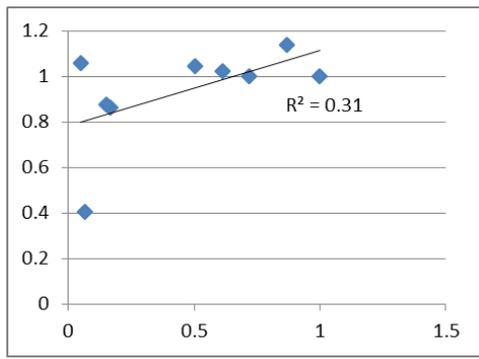
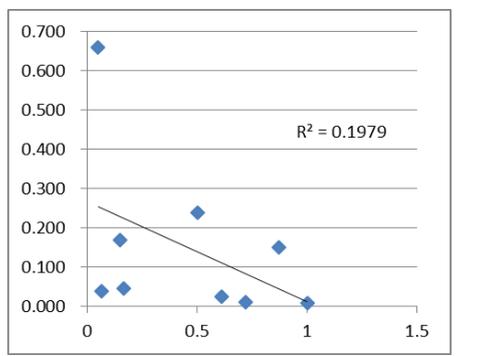
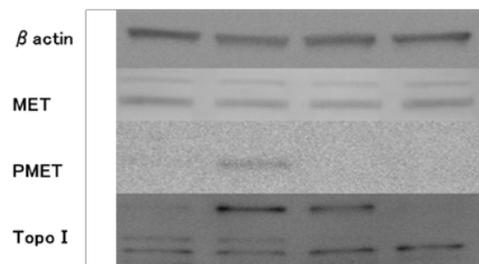


図5 p-MET 発現と SN-38 (IC50)の相関



(2) A549細胞を用いてMetのlegandであるHGFおよびMet阻害剤のSU 11274で暴露し、下流シグナルを検討した。A549細胞ではMetのリン酸化がHGF刺激により誘導され、SU11274により抑制された(図6)。またTopoI蛋白も同様にHGFにより誘導されて、Su11274により抑制された。

図6 A549細胞におけるHGF刺激、SU11274暴露下のtopoI蛋白発現変化

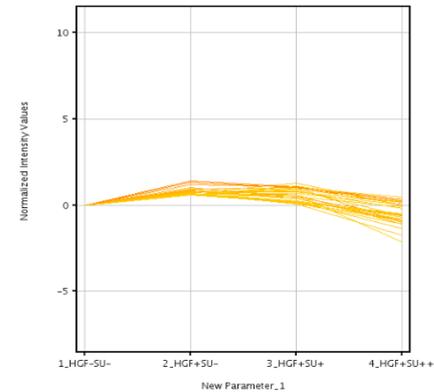


HGF	-	+	+	+
SU	-	-	2 µM	20 µM

HGF添加によりMetのリン酸化が誘導され、SD11274によりHGFによるMetのリン酸化はキャンセルされた

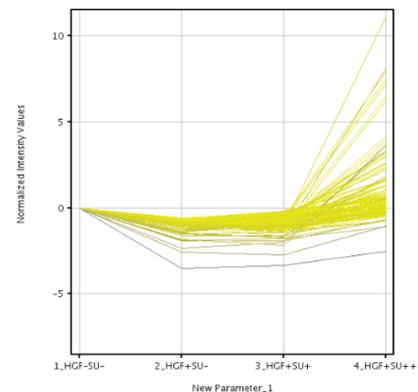
またTopoI蛋白も同様にHGFにより誘導されて、Su11274により抑制された。この際の遺伝子発現をマイクロアレイで解析したところ、29遺伝子が候補として考えられた(図7、8)。

図7 pathway解析



HGF添加により発現増加し、Su11274により減少に転じる遺伝子群(29)

図8 pathway解析



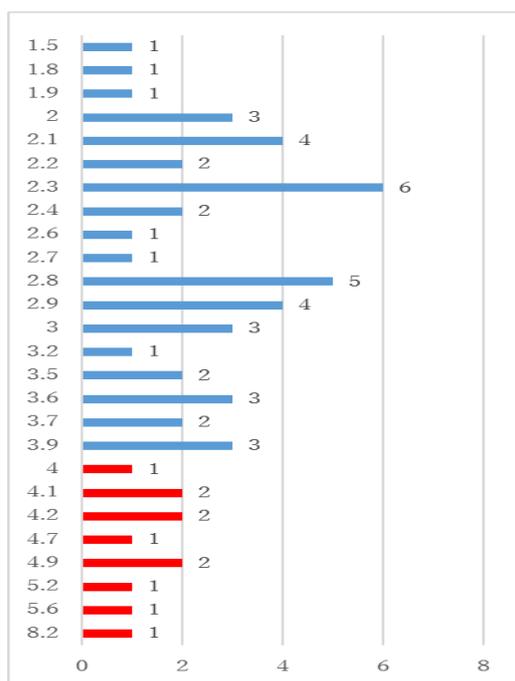
HGF添加により発現減少し、Su11274添加により増加する遺伝子群(138)

(3) EGFR 遺伝子変異陰性進行再発非小細胞肺癌に対するエルロチニブの第II相試験を行い、付随研究としてMet遺伝子増幅を解析した。78例を集積したが、56例でFISHによるMet遺伝子増幅が解析可能であった。解析可能であった56例中11例でMet/CEP7≥4の遺伝子増幅が観察された(図9)。患者背景には増幅の有無では有意な差は見られず(表2)、全生存期間にも差は無かった(Sone et al.)。

表 2 Met 遺伝子高発現、低発現患者の背景

		cMet $\geq$ 4	cMet<4	p
		N=11	N=45	
年齢	中央値	63	67.5	N.S.
	(範囲)	(55-82)	(38-84)	
性別	男性	10	32	N.S.
	女性	1	13	
臨床病期	III 期	4	5	N.S.
	IV 期	7	37	
	術後再発	0	2	
PS (ECOG)	0-1	8	34	N.S.
	2	3	11	
組織型	腺癌	8	37	N.S.
	扁平上皮癌	3	7	
	大細胞癌	0	1	
喫煙歴	喫煙者	8	35	N.S.
	非喫煙者	3	10	

図 9 非小細胞肺癌症例における Met 遺伝子発現状況



研究成果のまとめ

本研究で、Met 蛋白発現と TopoI 発現の関連を検討した。その結果から非小細胞肺癌細胞株において、cMet 蛋白及びリン酸化 Met には強い相関があり、それぞれ、TopoI 蛋白発現と関連していることが、多くの細胞株で証明された。さらに pathway 解析を行うことでこの関連をつなぐ 177 遺伝子候補が同定された。現在この候補遺伝子を絞り込み、解析を続けている。また、臨床検体を用いた解析から、Met 高発現の非小細胞肺癌患者の頻度もおおよそ知ることができ、我々の以前の解析を合わせて Met 遺伝子・蛋白高発現患者における TopoI 阻害剤、Met 阻害剤を用いた個別化療法の可能性が示唆される。今後の治療戦略構築に重要な知見をもたらすと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Watanabe S, Waseda Y, Takato H, Nishikawa S, Yoneda T, Kasahara K, et al. Imatinib ameliorates bronchiolitis obliterans via inhibition of fibrocyte migration and differentiation. J Heart Lung Transplant. 2017;36(2):138-47. (査読有)
2. Kimura H, Nishikawa S, Koba H, Yoneda T, Sone T, Kasahara K. A Rapid and Sensitive Method for Detection of the T790M Mutation of EGFR in Plasma DNA. Adv Exp Med Biol. 2016;924:171-4. (査読有)
3. Watanabe S, Kimura H, Takato H, Waseda Y, Hara J, Sone T, Kasahara K l. Severe pneumonitis after nivolumab treatment in a patient with melanoma. Allergol Int. 2016;65(4):487-9. (査読有)
4. Waseda Y, Johkoh T, Egashira R, Sumikawa H, Saeki K, Watanabe S, Kasahara K, et al. Antisynthetase syndrome: Pulmonary computed tomography findings of adult patients with antibodies to aminoacyl-tRNA synthetases. Eur J Radiol. 2016;85(8):1421-6. (査読有)
5. Ohkura N, Hara J, Sakai T, Okazaki A, Abo M, Kasahara K, et al. Bronchoconstriction-triggered cough in atopic cough: A retrospective study. Exp Lung Res. 2016;42(5):227-31. (査読有)
6. Matsunuma R, Takato H, Takeda Y, Watanabe S, Waseda Y, Murakami S, Kasahara K et al. Patients with End-stage Interstitial Lung Disease may have More Problems with Dyspnea than End-stage Lung Cancer Patients. Indian J Palliat Care. 2016;22(3):282-7. (査読有)
7. Yoneda T, Koba H, Tanimura K, Ogawa N,

Watanabe S, Hara J, Kasahara K et al. Postoperative Recurrence of Invasive Thymoma with Cold Agglutinin Disease and Autoimmune Hemolytic Anemia. Intern Med. 2016;55(18):2685-9. (査読有)

8. Okazaki A, Watanabe S, Yoneda T, Hara J, Nishitsuji M, Nishi K, Kasahara K, et al. Paradoxical reaction to antituberculosis therapy after 6 months of treatment for pulmonary tuberculosis: A case report. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2016;22(11):748-51. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

米田太郎 木場隼人 西川晋吾 曾根崇 木村英晴 笠原寿郎 MET 過剰発現細胞では topoisomerase-I 蛋白発現が亢進する 日本臨床腫瘍学会 2016年7月28日—30日 兵庫県神戸市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 寿郎 (KASAHARA Kazuo)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：30272967

### (2) 研究分担者

曾根 崇 (SONE Takashi)  
金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授  
研究者番号：30420334

### 研究分担者

木村 英晴 (KIMURA Hideharu)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：40444202

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )