

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24701037

研究課題名(和文) 肺がんにおけるFOXQ1高発現による分子標的薬を含む化学療法の効果予測

研究課題名(英文) To provide a biomarker for predicting the therapeutic effect of chemotherapy to lung cancer harboring EGFR mutation.

## 研究代表者

金田 裕靖 (KANEDA, Hiroyasu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50351599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんは予後不良の疾患で、死亡原因の第一位である。近年、肺がんにおいてEGFR遺伝子変異やALK融合遺伝子転座といった遺伝子異常が発見され、これら遺伝子異常を有する肺がんに対してEGFRチロシンキナーゼ阻害剤やALK阻害剤といった分子標的薬が従来の抗がん剤には見られないような劇的な抗腫瘍効果を示し、平均生存期間が2年以上となり進歩を遂げている。

しかし、その効果も長くは続かず、約1年の治療期間で無効になり薬剤耐性となる。その耐性メカニズムが研究されているが、すべて解明はされていない。肺がんを高発現しているFOXQ1遺伝子が、どのような機序で治療耐性に関与しているかをこの研究で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Non-small-cell lung cancer (NSCLC) has a poor prognosis and remains the leading cause of death related to cancer. The discovery of both activating mutations in the EGFR gene in 2004 and EML4-ALK in 2007 have been found. EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) and ALK TKI results in dramatically high response rates and prolonged progression-free survival compared with standard chemotherapy in NSCLC patients harboring gene alteration.

However, almost patients eventually develop acquired resistance to these drugs within 1 year. In addition, 20%-30% of NSCLC patients with EGFR mutations do not show an initial response to EGFR-TKIs. Several mechanisms of acquired resistance to EGFR-TKIs were found but not all. We found that forkhead box Q1 (FOXQ1) is overexpressed in lung cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth presumably through its angiogenic and antiapoptotic effects in this research. Furthermore, FOXQ1 has a role of regulating drug resistance and aggressiveness in lung cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：化学療法 抗がん剤耐性 EMT

## 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉移行(EMT)は、がん細胞の薬剤(抗がん剤)感受性に関与することが報告されており、いくつかの抗がん剤で関連が報告されているが耐性株での解析が多くを占めている。肺がんにおいては EMT が分子標的薬の感受性に関連していることが EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKIs)耐性細胞株で報告されている。EMT による薬剤耐性は非常に重要であるが、EMT 誘導の制御機構はほとんど明らかにされていない。

我々は 2010 年に大腸がんで高発現していた新規がん関連遺伝子として **FOXQ1** 遺伝子を同定しその機能解析を行った。**FOXQ1** は正常の大腸粘膜ではまったく高発現しておらず大腸がんでのみ高発現していること、**FOXQ1** 高発現のがん細胞は抗がん剤により誘導されるアポトーシス耐性を示し、**FOXQ1** の高発現は VEGF の発現誘導による腫瘍血管新生を促進させることで腫瘍増殖を促進させる機能を有していることを国内外で初めて明らかにした (Kaneda H. Cancer Res 2010)。**FOXQ1** の発現が様々ながん種においても薬剤感受性に影響を与えているかどうかはほとんど研究されていない。現在まで肺がんにおける **FOXQ1** の発現と抗がん剤感受性に関する研究については報告がない。

肺がんにおける EGFR-TKIs の治療効果におけるバイオマーカーとして **EGFR** 遺伝子変異が臨床応用されている。一方、EGFR-TKIs 治療耐性のバイオマーカーとしては、**EGFR** 遺伝子の **T790M** 変異および **MET** 遺伝子の増幅が知られている。しかし約 2-30%においては EGFR-TKIs 治療の耐性機序については不明である。

**FOXQ1** 遺伝子は肺がん細胞株においても高発現している遺伝子であり、**FOXQ1** 高発現による抗がん剤および EGFR-TKIs の耐性機序に EMT の関与を明らかにし、**FOXQ1** 高発現を予測することにより EGFR-TKIs の効果予測バイオマーカーとしての意義を明らかにすることを目的として本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

肺がんにおける **FOXQ1** 遺伝子高発現の意義を解明する。

①**FOXQ1** 高発現による肺がん細胞の機能解析

②**FOXQ1** 高発現による上皮間葉移行の作用機序の解明

③**FOXQ1** の発現と肺がんの化学療法 (分子標的薬を含む)に対する治療効果および予後との相関解析

## 3. 研究の方法

①肺がん細胞における **FOXQ1** 高発現の機能解析

②肺がん細胞における **FOXQ1** 高発現による上

皮間葉移行の誘導と抗がん剤耐性メカニズムの検討

肺がん細胞に **FOXQ1** を過剰発現させ増殖能、浸潤能、アポトーシス作用への影響を検討し肺がん細胞における **FOXQ1** の機能を解析する。また、siRNA を用いて **FOXQ1** の発現を抑制した場合の影響も検討する。最終的には in vivo におけるマウスでの腫瘍増殖能に与える影響についても検討する。肺がん細胞で **FOXQ1** の高発現により EMT が誘導されるか検討する。さらに、EMT 誘導にて抗がん剤による耐性が生じているかどうかを検討する。

③**FOXQ1** の発現と肺がんの化学療法 (分子標的薬を含む)に対する治療効果および予後との相関解析

臨床検体において 50-100 例の非小細胞肺がんを対象にがん細胞 mRNA を試料として **FOXQ1** の発現レベルを検討する。**FOXQ1** の発現量は real time RT-PCR によって mRNA レベルで発現量を定量化する。また VEGF の発現量も同様に定量化し、**FOXQ1** の発現量との相関性を検討する。そして患者背景因子である生存期間や治療効果等との相関解析を行う。

## 4. 研究成果

**FOXQ1** 遺伝子を肺癌細胞株 H1299 細胞に遺伝子導入し強制発現をさせた細胞株 (H1299/**FOXQ1**)を作成した。この H1299/**FOXQ1** は、in vivo においてコントロール群と比較して明らかな腫瘍形成能および腫瘍増殖の亢進を認めた。**FOXQ1** 強制発現による腫瘍増殖のメカニズム解析のために遺伝子発現解析を行い、血管内皮増殖刺激因子である VEGF の亢進を認めた。H1299/**FOXQ1** の腫瘍組織の免疫染色においても VEGF の亢進が確認できた。腫瘍の血管新生を評価すると **FOXQ1** は腫瘍の血管新生を誘導していた。**FOXQ1** 高発現による VEGF 発現誘導により腫瘍増殖亢進や薬剤耐性が起こっていることが示唆された。また、TUNEL 染色において H1299/**FOXQ1** の腫瘍組織でアポトーシスの抑制が認められ、殺細胞性抗がん剤に対するアポトーシスも **FOXQ1** 高発現により抑制されていた。一方、分子標的薬である EGFR-TKI や ALK 阻害剤に耐性を示す細胞株において、**FOXQ1** の発現が亢進していることが新たに分かった。EGFR 遺伝子変異を有し EGFR-TKI に感受性を示す肺癌細胞株 PC-9 と HCC827 に EGFR-TKI 暴露により作成した EGFR-TKI 耐性株 PC-9ZD と HCC827GR5 において親株と比較して **FOXQ1** の発現亢進がみられた。同様に ALK 阻害剤耐性株においても **FOXQ1** が高発現していた。

これらの結果より、**FOXQ1** が肺がんにおいて高発現していることが判明し、肺がんの治療薬である EGFR-TKI や殺細胞性抗がん剤の耐性機序に **FOXQ1** 発現が関与していることが示唆された。肺がんにおける **FOXQ1** の発現による治療抵抗性の関与はバイオマーカーとして効果予測因子として有用性があり、臨床的に意義が大きい。また臨床導入可能となれば、

治療効果予測のみならず予後に関わる可能性もあり、今回のデータは臨床導入にむけて非常に重要な結果と言える。

#### 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 13 件)

すべて査読有

- ① Kidera Y, Kawakami H, Sakiyama T, Okamoto K, Tanaka K, Takeda M, Kaneda H, Nishina S, Tsurutani J, Fujiwara K, Nomura M, Yamazoe Y, Chiba Y, Nishida S, Tamura T, Nakagawa K. Risk factors for cisplatin-induced nephrotoxicity and potential of magnesium supplementation for renal protection. *PLoS One*. 2014, 14;9(7):e101902. doi: 10.1371
- ② Okamoto I, Sakai K, Morita S, Yoshioka H, Kaneda H, Takeda K, Hirashima T, Kogure Y, Kimura T, Takahashi T, Atagi S, Seto T, Sawa T, Yamamoto M, Satouchi M, Okuno M, Nagase S, Takayama K, Tomii K, Maeda T, Oizumi S, Fujii S, Akashi Y, Nishino K, Ebi N, Nakagawa K, Nakanishi Y, Nishio K. Multiplex genomic profiling of non-small cell lung cancers from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin: results of a West Japan Oncology Group study. *Oncotarget*. 2014, 30;5(8):2293-304.
- ③ Horinouchi H, Yamamoto N, Nokihara H, Horai T, Nishio M, Ohyanagi F, Horiike A, Nakagawa K, Terashima M, Okabe T, Kaneda H, McKee MD, Carlson DM, Xiong H, Tamura T. A phase I study of linifanib in combination with carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of Japanese patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014, 74(1):37-43. doi:10.1007
- ④ Tanizaki J, Okamoto I, Okabe T, Sakai K, Tanaka K, Hayashi H, Kaneda H, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Hatashita E, Nishio K, Nakagawa K. Activation of HER family signaling as a mechanism of acquired resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012, 15;18(22):6219-26. doi: 10.1158
- ⑤ Sakai K, Okamoto I, Takezawa K, Hirashima T, Kaneda H, Takeda M, Matsumoto K, Kimura H, Fujita Y, Nakagawa K, Arai T, Nishio K. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012;7(5):913-8. doi: 10.1097
- ⑥ Matsuoka H, Makimura C, Koyama A, Otsuka M, Okamoto W, Fujisaka Y, Kaneda H, Tsurutani J, Nakagawa K. Pilot study of duloxetine for cancer patients with neuropathic pain non-responsive to pregabalin. *Anticancer Res*. 2012;32(5):1805-9.
- ⑦ Kaneda H, Okamoto I, Nakagawa K. Pharmacokinetics of docetaxel in a patient with non-small cell lung cancer undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Thorac Oncol*. 2012;7(3):621-2. doi: 10.1097
- ⑧ Kaneda H, Okamoto I, Sakai K, Tanizaki J, Takeda M, Nishio K, Nakagawa K. Marked response to both S-1 and pemetrexed in a patient with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinoma. *Acta Oncol*. 2012;51(7):942-4. doi: 10.3109
- ⑨ Tanaka K, Arai T, Tamura D, Aomatsu K, Furuta K, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Kimura H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. *PLoS One*. 2012;7(1):e27922. doi: 10.1371
- ⑩ Kaneda H, Okamoto I, Nakagawa K. Pharmacokinetics of docetaxel in a patient with non-small cell lung cancer undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Thorac Oncol*. 2012;7(3):621-2. doi: 10.1097
- ⑪ Furuta K, Arai T, Sakai K, Kimura H, Nagai T, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, Kaneda H, Fujita Y, Matsumoto K, Yamada Y, Yanagihara K, Sekijima M, Nishio K. Integrated analysis of whole genome exon array and array-comparative genomic hybridization in gastric and colorectal cancer cells. *Cancer Sci*. 2012;103(2):221-7. doi: 10.1111
- ⑫ Fujita Y, Islam R, Sakai K, Kaneda H, Kudo K, Tamura D, Aomatsu K, Nagai T, Kimura H, Matsumoto K, de Velasco MA, Arai T, Okawara T, Nishio K. Aza-derivatives of resveratrol are potent macrophage migration

inhibitory factor inhibitors. Invest New Drugs. 2012;30(5):1878-86. doi: 10.1007

- ⑬ Kaneda H, Okamoto I, Satoh T, Nakagawa K. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and trastuzumab. Invest New Drugs. 2012;30(4):1766-7. doi: 10.1007

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kaneda H. Clinical benefit of continued therapy with crizotinib beyond initial disease progression in advanced ALK-positive NSCLC. 第12回日本臨床腫瘍学会, 2014年7月17日~2014年7月19日, 福岡国際会議場
- ② Kaneda H. Tumor genomic profiling of non-small cell lung cancers (NSCLC) from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin. 第12回日本臨床腫瘍学会, 2014年7月17日~2014年7月19日, 福岡国際会議場
- ③ Kaneda H. Phase II study of erlotinib plus tivantinib in patients with EGFR mutation-positive NSCLC who failed in immediately previous EGFR-TKI therapy. 第55回日本肺癌学会学術集会, 2014年11月14日~2014年11月16日, 国立京都国際会館
- ④ Kaneda H. Phase I study of CO-1686 (rociletinib), an irreversible, mutant-selective inhibitor of EGFR mutations, in Japanese patients with T790M-positive NSCLC. 第55回日本肺癌学会学術集会, 2014年11月14日~2014年11月16日, 国立京都国際会館
- ⑤ Kaneda H. Update of Nintedanib (BIBF1120). 第55回日本肺癌学会学術集会, 2014年11月14日~2014年11月16日, 国立京都国際会館
- ⑥ 金田裕靖・中川和彦・工藤慶太・西尾誠人・村上晴泰・山本信之・堀之内秀仁・田村友秀. Phase I study of Patritumab (U3-1287) in combination with Erlotinib in NSCLC patients. 第54回日本肺癌学会総会, 2013年11月22日~2013年11月22日, ホテルニューオータニ (東京都千代田区)
- ⑦ Kaneda H, Ueda S, Kawakami H, Tanizaki J, Okamoto K, Makimura C, Tanaka K, Matsuoka M, Okamoto W, Shimizu T, Fujisaka Y, Nishina S, Miyazaki M, Tsurutani J, Kurata T, Okamoto I, Nakagawa K. Chemotherapy with CPT-11 after gemcitabine failure in patients with advanced pancreatic cancer. 14th World Congress of Gastrointestinal Cancer, 2012年6月23日, スペイン バ

ルセロナ

- ⑧ Ueda S, Kawakami H, Okamoto W, Nishina S, Kudo T, Makimura C, Kiyota H, Tanaka K, Kaneda H, Fujisaka Y, Miyazaki M, Tsurutani J, Okamoto I, Kurata T, and Nakagawa K. Second-line chemotherapy with S-1 after cisplatin and gemcitabine failure in patients with advanced biliary tract cancer. 14th World Congress of Gastrointestinal Cancer, 2012年6月23日, スペイン バルセロナ
- ⑨ Murakami H, Kurata T, Fujisaka Y, Hayashi H, Tanaka K, Kaneda H, Nakagawa K, Yokota T, Boku N, Yamamoto N. Phase I study of ombrabulin, a vascular disrupting agent (VDA) in Japanese patients with advanced solid tumors. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~2012年9月21日, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑩ Okamoto W, Okamoto I, Arai T, Sakai K, Okamoto K, Kawakami H, Kaneda H, Nishina S, Tsurutani J, Kurata T, Yanagihara K, Nishio K, and Nakagawa K. Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib in gastric cancer positive for MET amplification. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~2012年9月21日, ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑪ Kaneda H, Kotani Y, Satouchi M, Ando M, Yamamoto N, Ichinose Y, Ohe Y, Nishio M, Hida T, Takeda K, Kudoh S, Minato K, Shibata T, and Tamura T. A phase III study comparing amrubicin and cisplatin (AP) with irinotecan and cisplatin (IP) for the treatment of extended-stage small cell lung cancer (ED-SCLC): JCOG0509. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2012年7月26日~2012年7月28日, 大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑫ Kaneda H, Arai T, Tanaka K, Matsumoto K, Kimura H, Nagai T, Sakai K, Fujita Y, de Velasco MA, Yamada Y, Tsurutani J, Okamoto I, Nakagawa K, and Nishio K. Overexpression of FOXQ1 is important factor in tumorigenicity and tumor growth. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2012年7月26日~2012年7月28日, 大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑬ Kaneda H, Arai T, Tanaka K, Matsumoto K, Kimura H, Nagai T, Fujita Y, de Velasco MA, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, and Nishio K. Activin-A directly inhibits vascular endothelial cell growth via TGF- $\beta$  dependent signal pathway. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2012年07月

28日～2012年07月28日，大阪国際会議場（大阪市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 裕靖 (KANEDA, Hiroyasu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50351599