

令和元年6月12日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09230

研究課題名(和文) Gefitinib耐性における肺癌幹細胞の静止期維持機構の解明と耐性克服

研究課題名(英文) Role of quiescent cancer stem cells in the gefitinib resistance in EGFR mutation positive non-small cell lung cancer

研究代表者

高橋 和久 (Takahashi, Kazuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80245711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌幹細胞の治療抵抗性の一因として、静止期維持機構の重要性が示唆されている。我々はEGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌細胞株において、Gefitinibに薬剤抵抗性を示すGefitinib-Resistant Persisters (GRPs)はその大部分が静止期に維持しており、CD133などの幹細胞性因子と静止期維持分子Xを高発現していることを見出した。そして遺伝子XのKnockdownはGefitinib暴露後に残存するGRPsの比率を有意に減少させた。EGFR-TKI耐性において、静止期にいる肺癌幹細胞は重要な役割を演じており、今後の治療標的として極めて重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、肺癌は日本のみならず世界でも癌による死亡原因の第1位を占めている。とくに進行肺癌の予後は極めて不良であり、本研究によりGefitinib耐性機序における肺癌幹細胞の静止期維持機構の重要性が認識され、静止期制御分子の抑制や阻害剤を用いた癌幹細胞・静止期制御の有用性がより立証されれば、将来的に非小細胞肺癌におけるEGFR-TKI耐性克服の重要なオプションの一つとなり、進行肺癌の予後改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Several recent studies suggest that cancer stem cells (CSCs) are involved in intrinsic resistance to cancer treatment. Maintenance of quiescence is crucial for establishing resistance of CSCs to cancer therapeutics. In this study, we developed gefitinib-resistant persisters (GRPs) from two EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, PC9 and HCC827 by treatment with a high concentration of gefitinib. The GRPs from both PC9 and HCC827 cells expressed high level of lung CSC marker CD133 and gene X that is involved in the maintenance of quiescence of CSCs. Cell cycle analysis demonstrated that the majority of GRPs existed in the G0/G1 phase. Knockdown of the gene X significantly reduced the cell number of CD133-positive GRPs and reversed the cell population in the G0/G1-phase. These findings suggest that the maintenance of quiescence is important in gefitinib-resistant lung CSCs in EGFR mutation-positive NSCLC.

研究分野：肺癌

キーワード：薬剤耐性 癌幹細胞 静止期 肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、肺癌は日本のみならず世界でも癌による死亡原因の第 1 位を占めている。進行肺癌、とくに進行非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer; NSCLC)におけるプラチナ製剤を中心とする化学療法は患者の予後改善にある一定の効果をもたらすが、それも現状以上の予後改善は難しい状況であり、また免疫療法も一定の効果を挙げているものの、依然として進行肺癌の予後は極めて不良であり、その生物学的特性に基づいた分子標的治療法の確立および耐性化の克服は社会的にも急務である。

Epidermal growth factor receptor (EGFR) に対するチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である Gefitinib は EGFR 活性型遺伝子変異をもつ NSCLC において劇的な腫瘍縮小効果を示す。しかし EGFR-TKI 治療における最大の問題点は耐性化であり、ほぼ全例が約 1 年以内に治療抵抗性となる。EGFR TKI 治療に対する二次耐性の約 50%において EGFR 遺伝子の T790M 変異が認められ、他にも Met 遺伝子増幅、HER2 遺伝子変異、小細胞肺癌への Transformation、PIK3CA 遺伝子変異など様々な要因が関与しているが、いまだに原因不明な自然耐性 (一次耐性) も約 30% ちかく存在し、NSCLC 治療の大きな障壁となっている。この耐性機序の解明と耐性化克服への試みは、現在、肺癌診療に携わる我々臨床医や癌基礎研究者たちに与えられている大きな課題である。

癌幹細胞は自己複製能および多分化能を有する未分化な細胞分画であり、抗癌剤や分子標的治療薬に対する抵抗性も高いことから、治療後の再発や薬剤耐性の重要な原因と考えられている。従来の癌治療は増殖期にある癌細胞を標的としてきたが、近年、ほとんどの癌幹細胞は静止期 (G0 期) にとどまっていることが明らかになり、癌幹細胞の治療抵抗性の大きな要因と考えられている。したがって、癌幹細胞の静止期維持機構の解明は、癌幹細胞を標的とした新たな治療戦略・薬剤耐性克服につながるものと考えられる。

近年、EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の EGFR-TKI 耐性においても癌幹細胞の関与が報告されている。現在までに、申請者らは、EGFR 遺伝子変異を有し、Gefitinib 高感受性 NSCLC 細胞株である PC9 細胞を高濃度の Gefitinib で培養し、Gefitinib に対して薬剤抵抗性を示し残存する細胞集団を Gefitinib-Resistant Persisters (GRPs) と名付けて解析している。そして GRPs はマウスへの高い腫瘍生着率を示す極めて幹細胞性の高い細胞集団であることも報告している。これらの結果は NSCLC の Gefitinib 耐性機序において、静止期に維持している肺癌幹細胞が重要であることを強く示唆している。

細胞周期の G1 期から静止期 (G0 期) への移行は細胞周期からの脱出 (exit) と呼ばれており、また G0 期から G1 期への移行は再進入 (re-entry) と言われ、様々な分子がこれらのプロセスに関与し、細胞周期の静止期維持に寄与している。近年、慢性骨髄性白血病 (CML) の癌幹細胞における静止期維持の重要性と治療応用の可能性が相次いで報告されている。CML の治療には BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害剤である Imatinib が用いられるが、Imatinib 耐性の白血病幹細胞が存在し、再発・耐性の原因になっていること、また様々な分子が白血病幹細胞の静止期維持に関与しており、これら白血病幹細胞の静止期維持分子を標的とした治療応用の可能性が示されている。これらの報告は、EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC においても、G0 期維持分子は薬剤耐性細胞の癌幹細胞性を維持することで、EGFR-TKI 治療耐性にも寄与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、高濃度の Gefitinib 暴露後に薬剤耐性を示し残存する GRPs の静止期維持機構、および EGFR-TKI である Gefitinib 耐性における静止期維持分子の生物学的役割と治療応用の可能性を明らかにすることが目的である。具体的には、静止期維持分子である遺伝子 X に着目し、*In vitro* 培養細胞の実験系で GRPs における遺伝子 X を knockdown して、GRPs の細胞周期における静止期維持、および Gefitinib に対する感受性・耐性が変化するかどうかを検証する。細胞周期の静止期の評価には FUCCI ベクターを導入する。またマウスにおいて、*In vivo* で Gefitinib 耐性を示した EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 腫瘍組織における幹細胞性因子および静止期維持分子 X についても解析する。そして EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 症例の Gefitinib 治療前および治療後に再発・耐性化した腫瘍組織を用いて、幹細胞性因子および静止期維持分子 X の解析を行い、臨床的な EGFR-TKI 治療耐性・再発と幹細胞性や静止期維持分子の相関を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、EGFR 活性型遺伝子変異である exon 19 deletion mutation ($\Delta E746-A750$) を有し EGFR TKI 感受性 NSCLC 細胞株である PC9 および HCC827 細胞を用いる。PC9 および HCC827 を用いた *In vitro* 細胞培養系において、高濃度 (1 μM) Gefitinib を曝露後に残存し薬剤抵抗性を示す細胞集団を Gefitinib-resistant persisters (GRPs) と名付けて解析する。またマウスに *In vivo* で PC9 細胞を皮下移植し、Gefitinib 投与後も薬剤抵抗性を示し残存した腫瘍を Gefitinib Resistant Tumors (GRTs) と名付けて解析する。そして、これらの *In vitro* および *In vivo* モデルを中心に、下記のように EGFR-TKI である Gefitinib に対する耐性メカニズムを、肺癌幹細胞マーカーである CD133 や他の幹細胞性因子と細胞周期における静止期 (G0 期) 維持分子である遺伝子 X の解析を通して、検証してゆく。また EGFR-TKI 投与後に再発・

耐性化した EGFR 活性型遺伝子変異陽性の NSCLC 症例に対して再生検が施行された臨床検体（腫瘍組織の生検検体）も用いて、同様に CD133 や他の幹細胞性因子と静止期維持分子である遺伝子 X の発現解析を進めてゆく。

GRPs の幹細胞性の評価・解析

NSCLC 細胞株である PC9 と HCC827 を培養し、1 μ M Gefitinib 曝露後に残存した GRPs の幹細胞性を評価する。具体的には幹細胞性因子の mRNA 発現は RNA 抽出後、cDNA 合成を行い、qPCR で評価する。幹細胞性因子は肺癌幹細胞マーカーと考えられている CD133 以外にも、Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1 などの発現解析を行う。また蛋白レベルでは、Lab-Tek chamber slide で PC9 と HCC827 を培養し、1 μ M Gefitinib 曝露後に残存した GRPs において CD133 および Oct4 の免疫細胞染色を施行し、その比率を算定する。

細胞周期・静止期(G0期)の評価・解析

細胞周期における静止期 G0/G1 期を評価するために、PC9 細胞および HCC827 細胞に FUCCI (fluorescence ubiquitination cell cycle indicator) レンチウイルスベクターを導入した。遺伝子導入の効率は、それぞれの fluorescent color によって確認した。そして PC9-FUCCI および HCC827-FUCCI 細胞に 1 μ M Gefitinib を曝露して、それぞれ残存し薬剤耐性を示した GRPs の細胞周期を解析した。具体的には、FUCCI 導入により G0/G1 期にいる細胞は Red に、S/G2/M 期にいる細胞は Green の蛍光色として認識され、これらの発色を基にその比率をカウントして評価した。

GRPs における静止期維持分子 X の評価・解析

1 μ M Gefitinib 曝露後に薬剤抵抗性を示す PC9 と HCC827 の GRPs における静止期維持分子 X の発現は、mRNA 発現は qPCR で、蛋白レベルでは免疫細胞染色により評価した。静止期との相関は、上記の FUCCI ベクターを導入した PC9-FUCCI 細胞および HCC827-FUCCI 細胞を用いて評価した。

静止期維持分子 X の Knockdown

GRPs における静止期維持分子 X の Knockdown は siRNA を用いて施行した。Knockdown 効率は qPCR および免疫細胞染色により評価した。また Gefitinib 耐性癌幹細胞における静止期維持分子 X の Knockdown の効果は、幹細胞マーカーである CD133 の免疫細胞染色により Gefitinib 曝露後に残存する癌幹細胞の比率として評価・算定した。同時に、細胞周期の静止期は FUCCI ベクターを導入した PC9-FUCCI 細胞を用いて算定し、静止期維持分子 X の Knockdown により G0/G1 期および S/G2/M 期の比率の変化として評価した。

GRTs における幹細胞性因子および静止期維持分子 X の発現解析

NOD/Shi-scid/IL-2Rnull (NOG)マウスに PC9 を皮下移植し、Tumor volume が 75 mm³ に達したところで Gefitinib (20mg/kg)の腹腔内投与を開始する。そして本動物実験系で、Gefitinib 投与後 14 日目にも薬剤抵抗性を示し、残存する腫瘍を Gefitinib Resistant Tumors (GRTs)と名付けて、CD133 および Oct4 などの幹細胞性因子の発現解析を行う。発現解析はマウスから腫瘍組織を摘出し、qPCR による mRNA レベルでの解析および免疫組織染色による蛋白レベルでの発現解析により施行した。また静止期維持分子 X の発現についても、qPCR および免疫組織染色により評価した。

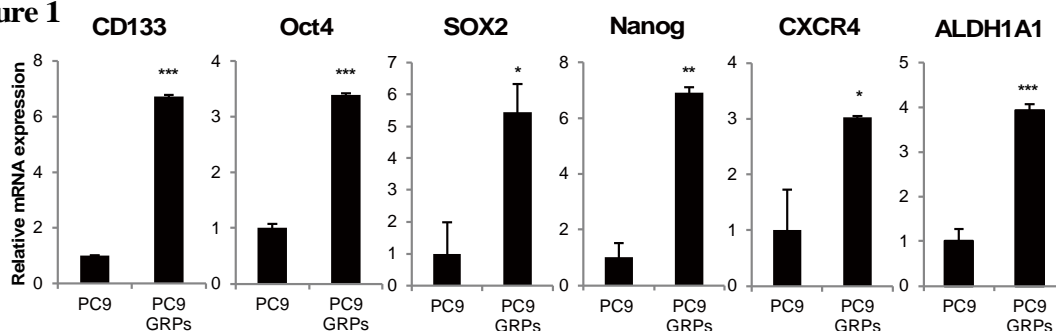
EGFR 活性型遺伝子変異陽性 NSCLC 再生検の腫瘍組織における幹細胞性因子および静止期維持分子 X の発現解析

EGFR 活性型変異陽性と診断され、EGFR-TKI (Gefitinib) が投与された NSCLC 患者の腫瘍組織における幹細胞性因子 CD133 および静止期維持分子 X の発現を免疫組織染色により検討する。EGFR-TKI 投与前および再発・耐性化後の再生検時の組織で発現を比較検討する。腫瘍細胞の同定には EGFR Ex19 Del 変異もしくは Ex21 L858R 変異に特異的抗体を用いて、二重免疫染色を施行した。

4. 研究成果

Gefitinib 感受性 PC9 および HCC827 細胞を高濃度 Gefitinib に曝露すると、ほとんどの細胞は死滅するが、非常に少数の細胞が残存し、これら細胞集団を Gefitinib-resistant persisters (GRPs)として解析した。GRPs の遺伝子発現解析では、肺癌幹細胞マーカーである CD133をはじめ山中因子である Oct4, Sox2 や幹細胞性に重要な因子である Nanog, CXCR4, ALDH1A1 などが高発現していた(Figure 1 参照 ; PC9 および PC9 GRPs における CD133, Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1 の mRNA 発現を qPCR で解析した)。

Figure 1



静止期維持分子 X の mRNA 発現も qPCR で解析したところ、PC9 および HCC827 細胞ともに GRPs において発現上昇を認めた。また Lab-Tek chamber slide を用いた免疫細胞染色においても、PC9 および HCC827 細胞において Gefitinib 曝露後の GRPs では静止期維持分子 X の蛋白発現は上昇していた。

細胞周期における静止期を評価するために、PC9 および HCC827 細胞に FUCCI ベクターを導入し、PC9-FUCCI および HCC827-FUCCI を樹立し、その Fluorescence color によって GRPs の細胞周期を解析したところ、ほとんどの細胞が G0/ G1 期に維持していた。

次に Gefitinib 耐性における静止期維持分子 X の役割を明らかにするために、siRNA を用いて PC9-FUCCI および HCC827-FUCCI における遺伝子 X の発現を knockdown したところ、Gefitinib 曝露後に残存し幹細胞マーカーである CD133 陽性の GRPs は有意に減少した。また細胞周期の解析では、ほとんどの細胞が G0/ G1 期に維持していた GRPs において、遺伝子 X の knockdown によりその比率は有意に減少し、S/G2/M 期の比率が上昇した。これらの結果は、GRPs における Gefitinib 耐性機序において、遺伝子 X は CD133 陽性肺癌幹細胞の静止期維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

NOG マウスに PC9 を皮下移植し、Gefitinib 投与後に薬剤耐性を示し残存した Gefitinib Resistant Tumors (GRTs) における幹細胞性因子を免疫組織染色により検討したところ、CD133 および Oct4 の発現上昇を認めた。そして静止期維持分子 X と CD133 の二重免疫染色で評価したところ、GRTs のマウス腫瘍組織においてはコントロールと比較して、CD133 陽性細胞における静止期維持分子 X 発現の比率が有意に増加していた。

最後に Gefitinib 治療後に耐性を獲得した EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者の腫瘍組織を用いて静止期維持分子 X と CD133 の二重免疫染色を行った。治療開始前と比較して、CD133 陽性細胞における静止期維持分子 X 発現の比率は有意に増加している事を確認した。

以上より、EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の EGFR-TKI 耐性機序において、遺伝子 X は静止期にある Gefitinib 耐性肺癌幹細胞の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後は *In vivo* でも遺伝子 X を制御することで、静止期・肺癌幹細胞の比率を減らし、Gefitinib 耐性克服が可能かどうかを検証する必要がある。具体的には、PC9-FUCCI および HCC827-FUCCI において遺伝子 X を Knockdown した細胞を樹立し、マウスに移植後の Gefitinib 耐性と静止期に維持している CD133 陽性癌細胞の状態を解析する。また転移の促進に重要と考えられている上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) は癌幹細胞性とも密接な関連があることが知られており、近年では EMT を引き起こした Mesenchymal な肺癌細胞は EGFR-TKI の重要な耐性機序の一つと考えられている。*In vivo* で遺伝子 X を制御して、静止期に維持している肺癌幹細胞の比率を減らすことで、Gefitinib 耐性後の転移の抑制につながるかどうか *In vivo* イメージング装置を用いて検証する必要がある。また EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 症例の Gefitinib 治療前および治療後に再発・耐性化した腫瘍組織についても更に症例数を蓄積させ、EGFR の genetic status や幹細胞性因子および静止期維持分子の解析を行い、臨床的な Gefitinib や Erlotinib 治療耐性・再発と幹細胞性や静止期維持分子の相関をより明らかにし、臨床的なバイオマーカーとしての有用性について検証することも必要である。

現在までの我々の知見は、CML における Imatinib 耐性・白血病幹細胞と同様に、固形癌である NSCLC においても、静止期に維持している肺癌幹細胞は同じチロシンキナーゼ阻害剤である Gefitinib 耐性に関与しており、これらを標的とした治療は耐性克服に有用である可能性を示唆している。将来的に、静止期制御分子の抑制や阻害剤を用いた癌幹細胞・静止期の制御は、NSCLC における EGFR-TKI 耐性克服の重要なオプションの一つになる可能性がある。

本治療戦略の臨床応用を考える際に最も考慮すべき点は、正常幹細胞への影響である。癌幹細胞と正常組織幹細胞あるいは造血幹細胞には、静止期維持において共通の分子が関与している可能性があり、静止期維持分子の抑制あるいは阻害が正常幹細胞に及ぼす影響を慎重に検証する必要があると共に、癌幹細胞に特異的な静止期維持分子の同定が重要である。また肺癌幹細胞を G0 期から逸脱させることで、一時的に腫瘍の増殖スピードが亢進し、原発巣や転移巣が急速に増大する可能性がある。これら G0 期を逸脱した細胞集団に対して、しっかりと治療

感受性が担保できているかどうかを確認する必要がある。また EGFR 遺伝子などに二次的変異を生じないかどうか慎重に検証する必要がある。ただし最も頻度の高い二次変異である T790M 変異に対しては第三世代 EGFR-TKI である Osimertinib が既に実地診療において良好な効果を認めており、耐性克服の戦略としては、静止期肺癌幹細胞を制御しつつ、かつ第三世代 EGFR-TKI を組み合わせることも重要と考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件) 全て査読ありの原著論文

1. Kobayashi I, **Takahashi F**, Nurwydia F, Nara T, Hashimoto M, Murakami A, Yagishita S, Tajima K, Hidayat M, Shimada N, Suina K, Yoshioka Y, Sasaki S, Moriyama M, Moriyama H, **Takahashi K**.
Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells.
Biochem Biophys Res Commun. 22;473(1):125-32. (2016)
2. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, Suehara Y, Hayashi T, Shimada N, **Takahashi K**, Suzuki K, Takamochi K, **Takahashi F**, Mano H.
A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer
Science Transl Med 15;9(416). (2017)
3. Suina K, Tsuchihashi K, Yamasaki J, Kamenori S, Shintani S, Hirata Y, Okazaki S, Sampetean O, Baba E, Akashi K, **Takahashi F**, **Takahashi K**, Saya H, Nagano O.
EGFR promotes glioma progression by regulating xCT and GluN2B-containing NMDA receptor signaling.
Cancer Science 109(12):3874-3882. (2018)
4. Kohsaka S, Tatsuno K, Ueno T, Nagano M, Shinozaki-Ushiku A, Ushiku T, Takai D, Ikegami M, Kobayashi H, Kage H, Ando M, Hata K, Ueda H, Yamamoto S, Kojima S, Oseto K, Akaike K, Suehara Y, Hayashi T, Saito T, **Takahashi F**, **Takahashi K**, Takamochi K, Suzuki K, Mimori K, Nagase T, Nakajima J, Tanaka S, Fukayama M, Oda K, Nangaku M, Miyagawa K, Miyazono K, Aburatani H, Mano H.
Comprehensive assay for the molecular profiling of cancer by target enrichment from formalin-fixed paraffin-embedded specimens.
Cancer Science 110(4):1464-1479. (2019)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kobayashi I, **Takahashi F**, Nurwidya F, Murakami A, Hidayat M, Shimada N, Kato M, Suina K, Kanemaru R, Asao T, Ohashi R, Muraki K, Takahashi M, Yoshioka Y, Sasaki S, **Takahashi K**.
Role of POU5F1 in gefitinib resistance in EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC)
日本呼吸器学会総会 2015.
2. Hidayat M, **Takahashi F**, Tajima K, Nurwidya F, Wirawan A, Kanemaru R, Koinuma Y, Hayakawa D, Tajima M, Matsumoto N, Kanamori, K, Takeda I, Kato M, Kobayashi I, Shimada N, **Takahashi K**.
Role of quiescent cancer stem cells in the gefitinib resistance in EGFR mutation positive non-small cell lung cancer (NSCLC).
Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR) 2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高橋 史行

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Fumiyuki

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70327823

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。