

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10478

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ阻害薬耐性甲状腺未分化癌に対する新規治療開発研究

研究課題名(英文) Analysis of the tyrosine kinase inhibitor resistant anaplastic thyroid cancer cells

研究代表者

藤田 知之 (FUJITA, TOMOYUKI)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00419392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：レンパチニブ(LEN)感受性甲状腺未分化癌(ATC)細胞株と、LEN耐性ATC細胞株を用い、LENを添加した前後の遺伝子プロファイルの差異をマイクロアレイ解析し、LEN感受性・体制に重要なバイオマーカーと新規治療薬候補遺伝子を探求した。GO解析およびPAGE解析により感受性株と耐性株では、まったく異なる転写因子群の発現変化がおり、これらがLEN感受性のバイオマーカーになる可能性を示した。また、IPA (Ingenuity Pathways Analysis)解析により、LEN感受性に関与する可能性が高い候補遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性度が高い甲状腺未分化癌においてレンパチニブ耐性症例に対する治療開発が求められている。われわれは独自に所有するレンパチニブ耐性株と感受性株を用いて、レンパチニブ感受性・耐性に関与するバイオマーカーおよび候補遺伝子を同定した。同様の研究は現在まで報告がなく、独創的であるといえる。さらにメカニズム解析、バイオマーカー解析を行っていけば、レンパチニブ耐性甲状腺未分化癌治療に有効な新規治療薬の開発に繋げることが可能となり、甲状腺未分化癌に苦しむ患者を救うことができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Differences in cDNA microarray gene expression profiles before and after treatment with lenvatinib were analyzed in two ATC cell lines: KTA-2 cells, which are sensitive to lenvatinib, and TTA-1 cells, which are resistant to lenvatinib. GO and PAGE showed that genes and transcriptional pathways were completely different in KTA-2 cells from TTA-1 cells after treatment with lenvatinib. These pathways were potential biomarkers for lenvatinib. IPA showed that several genes which were significantly sensitive to lenvatinib. These genes may be new candidate drugs for treatment of lenvatinib resistant ATC.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：甲状腺未分化癌 チロシンキナーゼ阻害薬 標的治療 新規治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は甲状腺癌の1-2%程度と発生頻度は少ないが、悪性度がきわめて高く、1年生存率が5-20%と全がん腫の中でも最も予後が悪いがんとして知られている。手術、放射線、薬物療法の治療の柱となるが確立はされておらず、また長年にわたり治療改善がなく、新たな治療の確立もなかった。

特に薬物療法については、細胞傷害性薬剤で散発的に有用性が報告されることもあったが、萌芽的にすぎなかった。そのため、日本ではタキサン系抗癌剤パクリタキセルによる多施設共同臨床試験(甲状腺未分化癌(ATC)に対するweekly paclitaxelによる化学療法の認容性、安全性に関する前向き研究(アタックJ、UMIN 000008574))が行われ、安全性・認容性、抗腫瘍効果(腫瘍縮小率、PFS、OS)が評価された。71例(男性20例、女性51例)に施行された結果、59例(83.1%)が完遂し、重篤な有害事象もなく、その安全性・認容性が確認された。

また分子標的薬剤による臨床試験も行われていたが、成果に乏しく、ひとつの要因は未分化癌の特性を標的とした薬剤を使用していない点にあると考えられた。

当時、国際共同第 相試験(303試験, SELECT)において、放射性ヨウ素治療抵抗性・難治性の分化型甲状腺癌患者に対し、プラセボに比べて無増悪生存期間を有意に延長し、抗腫瘍効果を示したため、レンバチニブが承認された。またレンバチニブは、国内第 相試験(208試験)において、切除不能の甲状腺未分化癌患者に対し、抗腫瘍効果を示した。そのため、未分化癌に対し、レンバチニブが新たに使用できることになった。

レンバチニブは、腫瘍血管新生、腫瘍増殖等に関与する、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体(VEGFR1-3)、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR1-4)、血小板由来成長因子受容体(PDGFR)、幹細胞因子受容体(KIT)、Rearranged During Transfection がん原遺伝子(RET)等の受容体チロシンキナーゼを阻害することで、抗腫瘍効果を発揮する新規のチロシンキナーゼ阻害剤である。

一方、日常診療においてはレンバチニブ耐性甲状腺未分化癌に対する治療法の確立が求められることが予想されていた。それまでのレンバチニブに関する基礎研究では、ヒト甲状腺未分化癌細胞株移植マウスモデルにおいて高用量のレンバチニブで移植細胞株の腫瘍増殖抑制作用を認め、主に血管新生抑制作用に基づいていると報告されていた(Tohyama, et al. Thyroid Res. 2014:63847 (2014))。

しかし、レンバチニブ耐性移植株と感受性細胞株の遺伝子発現の差異を求め、レンバチニブ感受性・耐性のバイオマーカーやメカニズムを明らかにされることはなかった。また、甲状腺未分化癌細胞株で、レンバチニブ感受性のある細胞株は報告されておらず、文献的には耐性株のみ(Tohyama, et al. Thyroid Res. 2014:63847 (2014))であった。

すでにJAK-STAT経路を阻害するバルドキシロンメチル(RTA 402)による甲状腺未分化癌4例を含む47例の進行固形癌に対する第一相臨床試験が行われ、もっとも腫瘍縮小効果が大きかったのは甲状腺未分化癌の1例であったとの報告がされていた(Hong DS, et al. Clin Cancer Res. 2012;18:3396-3406)。

以上より、レンバチニブ耐性甲状腺未分化癌に対するJAK阻害剤が新たな治療薬として有効な可能性があり、極めて悪性度が高い甲状腺未分化癌に対し、臨床にtranslationできる基礎研究として、今後研究をすすめる意義が十分あるものと考えられていた。

### 2. 研究の目的

甲状腺未分化癌は悪性度がきわめて高く、チロシンキナーゼ阻害剤レンバチニブが使用できるようになったが、レンバチニブ耐性甲状腺未分化癌に対する治療法の確立が求められている。レンバチニブ感受性甲状腺株と、JAK阻害剤が有効なレンバチニブ耐性株を用いて、レンバチニブを添加した前後の遺伝子プロファイルの差異をマイクロアレイを応用解析し、レンバチニブの感受性・耐性に重要なバイオマーカーを明らかにすることおよびレンバチニブ耐性甲状腺未分化癌でのJAK阻害剤の有効性およびメカニズムを明らかにすること、を目的とした。

を明らかにすることにより甲状腺未分化癌治療に有効な新規治療薬候補をバイオマーカーとともに開発し、またJAK阻害薬の開発に繋げ、甲状腺未分化癌で苦しむ患者の予後改善に繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

未分化癌細胞株パネルを用いて、WST-8による細胞増殖阻害アッセイにより、パクリタキセル感受性のフェノタイプスクリーニングを行い、レンバチニブ感受性甲状腺株(KTA-2)と、JAK阻害剤が有効なレンバチニブ耐性株(TTA-1)を使用した。

感受性株のIC50濃度のレンバチニブを耐性株、感受性株それぞれに添加しRNAを抽出した。

レンバチニブ添加前後の遺伝子発現の差をAffymetrix社GeneChipを用い解析に使用した。

未分化癌細胞株に対するレンバチニブの感受性および耐性に関連する遺伝子およびパスウェイを同定するため、遺伝子アノテーション情報は、公共データベース等から得た。各遺伝子について、個別にアノテーション情報を見て、発現変動遺伝子を、遺伝子の機能単位、パスウェイ単位で解析し、生体内でどのような反応が生じているかを推測し、変動遺伝子群の全体像を見た。

薬剤を与えることでどのシグナル経路や生理機能に影響が出たかが視覚的に判明し、遺伝子相互作用経路や代謝経路を同定するため、IPA (Ingenuity Pathways Analysis)™によるオントロジー解析、パスウェイ解析を行った。

IPA (Ingenuity Pathways Analysis)™による変動の大きい遺伝子抽出  
レンバチニブ感受性株でレンバチニブ添加前後に発現上昇している上位遺伝子を抽出した。

候補遺伝子 A、B、C の RNAi 干渉実験

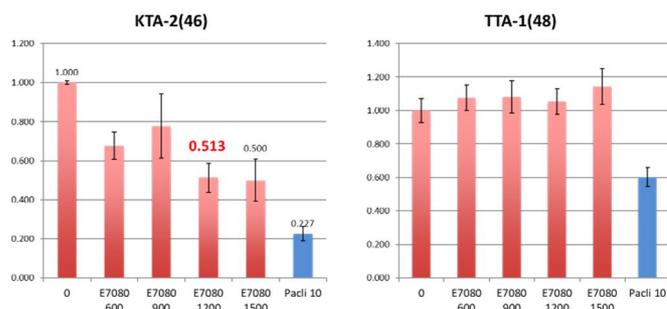
IPA 解析で同定されたレンバチニブ感受性に関与する可能性が高い候補遺伝子 A,B,C について RNAi を作成し、干渉実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### 細胞増殖阻害アッセイ

1回目抽出用

Lenvatinib E7080 MTT assay  
単位: nm



レンバチニブ 1.2 μM で KTA-2 の IC50 がえられた。

これらの細胞株はどちらも BRAF 変異はなく、NRAS に共通の変異を認める。P53 は KTA-2 に変異はあるが、TTA-1 に変異はない。

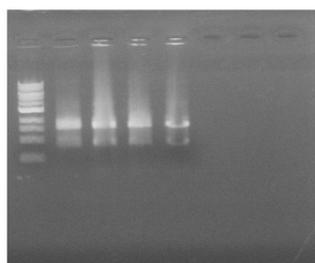
RNA 抽出

1回目抽出

時間15分、量 1ul/well

Lenvatinib E7080 :1.2 μM

M T1N T1L K2N K2L



Concentration of RNA

レンバチニブ感受性甲状腺未分化癌細胞株 (A株) と、コントロールとしてレンバチニブ耐性甲状腺未分化癌細胞株 (B株) にレンバチニブを添加し、RNA を抽出した。その後 aRNA を作成し、レンバチニブ添加前後の遺伝子プロファイルの差異をマイクロアレイデータの解析を行った。質の悪いデータは除去して、統計学的解析や生物学的解釈のための解析を行った。

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースを用いた Gene Ontology 解析

各遺伝子が様々なカテゴリーに属し意味づけされており、どのカテゴリーに属する遺伝子が増動しているか解析した。

レンバチニブ添加により、GABA(Gamma aminobutyric acid)ergic synapse、Gap junction、Arginine biosynthesis、Long-term depression の 4 経路が耐性株に対し感受性株で発現が有意に変動し、いずれも活性が低下した。そのうち GABA(Gamma aminobutyric acid)ergic synapse パスウェイがもっとも有意に発現が低下し、レンバチニブの代謝経路であることが示唆された。

Transcriptional Regulatory Element Database(TRED) データベースを用いた PAGE 解析

Transcriptional Regulatory Element Database(TRED)の情報を元に、遺伝子セットに含まれる遺伝子の発現比の平均を、全体の平均と比較し検定する PAGE 解析を行い、転写因子活性で分類される各遺伝子セット全体の発現変動についての検討を行い、レンバチニブ添加によりどのような転写活性群が発現変動を起こすか検討した。

薬剤添加で耐性と感受性で差がひろがった

A T F 3 および P P A R A 転写因子群でレンバチニブ添加により感受性株に比べ、耐性株で負の方向に転写の活性差が広がった。これは耐性株で転写活性が低下した場合と感受性株で転写活性が上昇した場合が考えられた。

一方、S M A D 7 および E 2 F 4 転写因子群でレンバチニブ添加により感受性株に比べ、耐性株で正の方向に転写の活性差が広がった。これは耐性株で転写活性が上昇した場合と感受性株で転写活性が低下した場合が考えられた。

Transcriptional Regulatory Element Database(TRED) データベースを用いた PAGE 解析

感受性株でレンバチニブ添加前後に変動する転写因子群と耐性株でレンバチニブ添加前後に変動する転写因子群が、まったく異なる群にわかれた。レンバチニブの感受性には NFkB、ETS1、STAT3 などの転写因子群の活性変動が重要であることがわかった。

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースを用いた Gene Ontology 解析

感受性株でレンバチニブ添加前後に変動するパスウェイと耐性株でレンバチニブ添加前後に変動するパスウェイが、まったく異なるパスウェイにわかれた。レンバチニブの感受性には Transcriptional misregulation in cancer 群などの変動が重要であることがわかった。

IPA (Ingenuity Pathways Analysis)<sup>TM</sup>による機能解析

機能解析の結果、レンバチニブ感受性株と耐性株でレンバチニブ添加により変動する有意性が高い遺伝子機能群がまったく異なっていた

IPA (Ingenuity Pathways Analysis)<sup>TM</sup>による変動の大きい遺伝子抽出

レンバチニブ感受性株でレンバチニブ添加前後に発現上昇している上位遺伝子を抽出した。細胞周期停止、アポトーシス誘導、細胞死などが抑制方向に働くと考えられる機能を有している遺伝子、神経細胞の発達に関与した遺伝子、脂肪酸の生合成に関与した遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子が甲状腺未分化癌のレンバチニブ感受性に関与している可能性が示唆された。

候補遺伝子 A、B、C の RNAi 干渉実験

IPA 解析で同定されたレンバチニブ感受性に関与する可能性が高い候補遺伝子 A,B,C について RNAi を作成し、干渉実験を行った。それらの RNAi により A,B,C の遺伝子発現がノックダウンされることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田 知之
2. 発表標題 甲状腺未分化癌細胞株におけるJAK阻害剤の細胞増殖抑制の検討
3. 学会等名 第9回三大学セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田 知之
2. 発表標題 小所帯のアカデミアでも発信できること
3. 学会等名 順天堂大学TVカンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoyuki Fujita
2. 発表標題 JAK inhibitors to suppress paclitaxel-resistant anaplastic thyroid cancer Via IL-6 reduction
3. 学会等名 2018 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 知之
2. 発表標題 甲状腺未分化細胞株におけるJAK阻害剤の細胞増殖抑制の検討
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	藤森 実  (FUJIMORI MINORU)  (00262725)	東京医科大学・医学部・兼任教授    (32645)	