

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09641

研究課題名(和文)「オンタイム法」による分子標的薬剤の耐性予測と耐性機序の解明へのアプローチ

研究課題名(英文) Approaches to predict resistance and elucidate resistance mechanisms of molecularly targeted drugs using "on-time methods"

研究代表者

石沢 興太 (Ishizawa, Kota)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：60400313

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)：研究期間中に肺がん患者の癌性胸水検体を集取した。集取した検体を用いて、胸水から細胞を効率よく回収する方法を確立し、正常生細胞とがん細胞をセルソーターで分離する方法をも確立した。この事により細胞表面マーカーCD326とCD45を用いて、がん細胞をサブグループに分けることができるようになった。その結果、従来想定されていなかったCD45陽性・CD326陽性(CD326+/CD45+DPC)の細胞集団を発見した。これらのがん細胞にはEGFR変異を有することを確認し、がん細胞の多様性があることを確認した。また、この新規の細胞集団の多寡が肺がん患者の治療効果と予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は無血清培養の「オンタイム法」を開発した。がん細胞を不死化する必要がなく、患者の病態を反映するがん細胞を入手できるようになった。NOGマウスを使ったゼノグラフィ(PDX)と併用することで約90%近い成功率で患者由来の細胞株を樹立することが可能になった。トランスレーショナルリサーチとして研究成果を迅速に患者治療にフィードバック可能である。究極的には患者ごとの細胞株(薬剤非耐性株、耐性株)を制作し、安定供給する事で患者本人の癌細胞株を蓄積し、セルバンク化することが可能である。これらの研究資源は患者本人の治療のみならず、さらなる治療薬の開発研究にも有用である。

研究成果の概要(英文)：Cancerous pleural fluid specimens from lung cancer patients were collected during the study period.

Using the collected specimens, we established a method to efficiently collect cells from pleural fluid and also established a method to separate normal viable cells from cancer cells by cell sorter. This has enabled us to divide cancer cells into subgroups using the cell surface markers CD326 and CD45. As a result, we found a previously unidentified population of CD45-positive and CD326-positive cells (CD326+/CD45+DPC). These cancer cells were found to have EGFR mutations, confirming that there is a diversity of cancer cells. It was also suggested that the abundance of this novel cell population may affect the therapeutic efficacy and prognosis of lung cancer patients.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺がん 胸水 EGFR 薬剤耐性 TKI 多様性

1. 研究開始当初の背景

肺癌は5年生存率が30%以下で他の癌腫と比べ生存率は低く、悪性度の高い疾患である。

近年癌ゲノム研究が盛んに行われ、肺癌研究においても多くの新しい知見が得られ、次の2点が広く知られている。

第一に癌細胞の多様性が存在する。肺癌組織には細胞生物学的、分子生物学的多様性が存在し、従来の病理学分類では分類できない。同じ遺伝子変異でも変異エクソンの場所が違えば同一薬剤でも効果が異なることがあり、抗癌剤を投与する際には考慮する必要がある。第二に癌遺伝情報に基づく薬剤選択が重要である。癌患者の治療前に癌の遺伝情報を調べることにより副作用の少ない薬剤の選択が可能である。例えば分子標的治療薬のゲフィチニブ(イレッサ)はEGFR変異の患者には有効であるがそうでない患者に投与しても患者の予後は改善されない。以上のように癌遺伝情報は薬剤の選択、治療効果、予後の予測の点で、極めて重要である。

一方で分子標的治療薬は万能ではなく、一旦奏功した薬剤であっても高頻度に薬剤耐性が治療経過中に出現する。新薬があっても、経過中に耐性が生ずるといった難題が待ち構えている。耐性機序は不明なケースが多く、治療を困難にしている。以下の3点が問題として考えられる。第1点、各患者の病態を反映する細胞株が存在しないこと、第2点、患者由来の細胞株の樹立に長い時間がかかること、そして第3点として、治療を受けた患者の組織培養の成功率が低いことが挙げられる。しかし、薬剤耐性の機序の解明は患者のみならず病態の理解にも有益である。患者間それぞれ遺伝子的差異があり、従来の細胞株では個々の患者の病態を反映しないため患者由来の細胞株の確保が重要な課題である。

そこで申請者は細胞株樹立の成功率を格段に向上させ、肺癌組織から効率よく細胞株を樹立できる「オンタイム細胞株樹立法」の開発を試み、効率よく各患者由来のがん細胞、組織を作り出すことができるようにした。

2. 研究の目的

本研究ではこの開発した手法を用いて患者由来の肺癌細胞株を作製し、今まで不可能であった患者の治療と同時進行で個々の患者の病態に即したドラッグスクリーニングや薬剤耐性の機序を究明するシステムの開発を目的とした。

3. 研究の方法

肺癌分子標的治療及び耐性研究において患者由来の癌細胞株は患者本人遺伝情報を有するため他の細胞株で代替できない。従来の細胞株樹立法では成功率が低いことがボトルネックとなっていたが、我々はがん細胞の初代培養法を改良し、肺癌細胞株の樹立を容易にした。

このことにより研究成果をベンチサイドからベッドサイドへ移行しやすくした。研究期間中計画に従い、1、2年目は多くの患者由来の肺癌細胞株を樹立し安定供給できるようにした。集めた細胞株はバンク化することで研究試料の確保を試みた。

薬剤耐性株を用いることで、すでに治療を受けた患者由来細胞株も樹立し、抗がん剤耐性の機序

研究を行った。薬剤耐性の機序解析についてはセルソーティング及び細胞分子的技術を駆使し、治療に結びつくようなターゲットを絞り込めるよう検索を行った。

この際には患者由来の検体を用いるのでサンプル間の個性が大きく異なるため検体数が少ない場合に同一検体間の薬剤非耐性耐性株間の比較検討を行うよう心がけ、サンプル間の誤差を最小限に抑え、エンリッチメントターゲットを効果的に絞り出せるようにした。また、有望な結果が得られた検体についてはさらに次世代シーケンスを含め網羅的検索を実行できるように計画した。

4. 研究成果

固形がん組織由来の初代細胞培養は難しく、従来の培養法では癌関連線維芽細胞等の間質細胞の存在が二次元培養の大きな障壁になり、成功率は低く 20-30%である。

我々は無血清条件下で培養液を工夫し、従来の課題を克服できるようにした。そこで、我々は新しい無血清での細胞培養法を開発した。具体的には磁気分離法 (MACS) を使用し肺癌細胞を純化し無血清細胞培養液を用いて、成長因子を添加することで成功率が飛躍的に高まった。この方法では細胞の不死化する必要がなく、より患者の状態を反映する。また、免疫不全マウス (NOG) を使ったゼノグラフト法と組み合わせることで 90%近い成功率で患者由来の細胞株を樹立可能となった。この方法により実際の臨床で使用されている分子標的薬の治療効果判定が可能となった。無血清培養は FBS 添加培養より細胞株は患者状態を反映する利点がある。この方法を用いれば、たとえ針生検のような少量の検体でも細胞株を樹立が可能である。さらに免疫不全マウスを用いたゼノグラフト法と組み合わせることで患者治療と同時に細胞株樹立できる。

本研究はこの画期的な細胞株樹立法を用いて細胞株をバンク化することによって薬剤耐性研究、次世代シーケンサーを含めた最先端の技術を活用し、患者の診断、治療のためのバイオマーカーの開発を可能にする。オンタイム細胞株樹立は患者オーダーメイド治療につながるとともに細胞検体のバンク化で癌のビッグデータを蓄積することで新規の癌患者治療の参考にできるため、今後の肺癌治療に大きく貢献するであろうと期待できる。

また、研究期間中に肺がん患者の癌性胸水検体をも集取した。集取した検体を用いて、胸水から細胞を効率よく回収する方法を確立し、正常細胞とがん細胞をセルソーターで分離する方法も確立した。この事により細胞表面マーカー CD326 と CD45 を用いて、がん細胞をサブグループに分けることができるようになった。その結果、従来想定されていなかった CD45 陽性・CD326 陽性の新規の細胞集団を発見し、同定した。これらのがん細胞は同一個体と同じ変異 (EGFR) を有することを確認し、がん細胞の多様性があることを確認した。また、この新規の細胞集団の多寡が肺がん患者の治療効果と予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究期間中計画していたドラッグスクリーニングはサンプル数と予算的制限あり、研究の大規模展開ができなかった。耐性機序の一端を垣間見ることができたが、それに対応する治療薬へのアプローチまではたどり着けなかった。しかし、解析技術が進化しており、今後、少ない細胞数でも短時間に解析が可能になってきている。日本からのさらなる研究成果を期待しつつ、研究システムの改良が必要と思われる。効率の良い研究室間、研究者間の協力体制の構築も大学のバックアップサポートが不可欠な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishizawa Kota, Yamanaka Mie, Saiki Yuriko, Miyauchi Eisaku, Fukushige Shinichi, Akaishi Tetsuya, Asao Atsuko, Mimori Takahiro, Saito Ryota, Tojo Yutaka, Yamashita Riu, Sakurada Akira, Pham Nhu-An, Okada Yoshinori, Ishii Tadashi, Ishii Naoto, Kobayashi Seiichi, Ichinose Masakazu, Tsao Ming-Sound, Horii Akira	4. 巻 25
2. 論文標題 CD45+CD326+ Cells are Predictive of Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6756 ~ 6763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-19-0545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato K., Saiki Y., Arai K., Ishizawa K., Fukushige S., Sakurada A., Okada Y., Horii A.	4. 巻 14
2. 論文標題 MA18.02 S100A10 Upregulation Associates with Poor Prognosis in Lung Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 S321 ~ S322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2019.08.647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Sho, Saiki Yuriko, Ishizawa Kota, Fukushige Shinichi, Yamanaka Mie, Sato Masaki, Ishida Masaharu, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Horii Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression of SNA1L in accompanying PanIN is a key prognostic indicator in pancreatic ductal adenocarcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1671 ~ 1678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Abe Michiaki, Okuda Hiroshi, Ishizawa Kota, Abe Takaaki, Ishii Tadashi, Ito Sadayoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 High glucose level and angiotensin II type 1 receptor stimulation synergistically amplify oxidative stress in renal mesangial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5214-5220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41536-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Michiaki, Akaishi Tetsuya, Miki Takashi, Miki Mika, Funamizu Yasuharu, Araya Kaori, Ishizawa Kota, Takayama Shin, Takase Kei, Abe Takaaki, Ishii Tadashi, Ito Sadayoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Influence of renal function and demographic data on intrarenal Doppler ultrasonography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0221244 ~ 0221244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0221244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Yasaka Ken, Abe Michiaki, Fujii Hiroshi, Watanabe Mika, Shirai Tsuyoshi, Ishizawa Kota, Takayama Shin, Kagaya Yutaka, Harigae Hideo, Ishii Tadashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Protein losing gastroenteropathy with severe hypoalbuminemia associated with Sjögren's syndrome: A case report and review of the literature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General and Family Medicine	6. 最初と最後の頁 24 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgf2.281	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Kobayashi Junpei, Abe Michiaki, Ishizawa Kota, Nakashima Ichiro, Aoki Masashi, Ishii Tadashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Sensitivity and specificity of meningeal signs in patients with meningitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General and Family Medicine	6. 最初と最後の頁 193 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgf2.268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Kiyomoto Hideyasu, Abe Michiaki, Okuda Hiroshi, Ishizawa Kota, Endo Toshiki, Miyata Masahiro, Nakayama Keisuke, Ito Sadayoshi, Tominaga Teiji, Ishii Tadashi	4. 巻 58
2. 論文標題 A 29-year-old Woman with Recurrent Pregnancy-induced Hypertension Based on Vascular Compression of the Medulla Oblongata	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2257 ~ 2261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2382-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Onishi Eiko, Abe Michiaki, Toyama Hiroaki, Ishizawa Kota, Kumagai Michio, Kubo Ryoosuke, Nakashima Ichiro, Aoki Masashi, Yamauchi Masanori, Ishii Tadashi	4. 巻 16
2. 論文標題 The human central nervous system discharges carbon dioxide and lactic acid into the cerebrospinal fluid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12987-019-0128-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Abe Michiaki, Okuda Hiroshi, Ishizawa Kota, Abe Takaaki, Ishii Tadashi, Ito Sadayoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 High glucose level and angiotensin II type 1 receptor stimulation synergistically amplify oxidative stress in renal mesangial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41536-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Sho, Saiki Yuriko, Ishizawa Kota, Fukushige Shinichi, Yamanaka Mie, Sato Masaki, Ishida Masaharu, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Horii Akira	4. 巻 0
2. 論文標題 Expression of SNAIL in accompanying PanIN is a key prognostic indicator in pancreatic ductal adenocarcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2016	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Kimiaki, Saiki Yuriko, Arai Kazumori, Ishizawa Kota, Fukushige Shinichi, Aoki Kenko, Abe Jiro, Takahashi Satomi, Sato Ikuro, Sakurada Akira, Okada Yoshinori, Horii Akira	4. 巻 505
2. 論文標題 S100A10 upregulation associates with poor prognosis in lung squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 466 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.118	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamanaka Mie, Shiga Kiyoto, Fujiwara Sho, Mizuguchi Yasuhiko, Yasuda Sari, Ishizawa Kota, Saiki Yuriko, Higashi Kenjiro, Ogawa Takenori, Kimura Noriko, Horii Akira	4. 巻 245
2. 論文標題 A Novel SDHB IVS2-2A>C Mutation Is Responsible for Hereditary Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.245.99	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akaishi Tetsuya, Onishi Eiko, Abe Michiaki, Toyama Hiroaki, Ishizawa Kota, Kumagai Michio, Kubo Ryosuke, Nakashima Ichiro, Aoki Masashi, Yamauchi Masanori, Ishii Tadashi	4. 巻 16
2. 論文標題 The human central nervous system discharges carbon dioxide and lactic acid into the cerebrospinal fluid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12987-019-0128-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akane Inoue-Yamauchi, Paul Jeng, Kwanghee Kim, Hui-Chen Chen, Kota Ishizawa, Sylvia Jebiwott, Maria Pietanza, Mark Kris, James Hsieh, Emily Cheng.	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeting the Differential Addiction to Anti-apoptotic BCL-2 Family for Cancer Therapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms16078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuriko Saiki, Kimiaki Sato, Kazumori Arai, Kota Ishizawa, Shinichi Fukushige, Kenko Aoki, Jiro Abe, Satomi Takahashi, Ikuro Sato, Akira Sakurada, Yoshinori Okada, Akira Horii.
2. 発表標題 S100A10 Upregulation Associates with Poor Prognosis in Lung Squamous Cell Carcinoma.
3. 学会等名 AACR-JCA Joint conference, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka M, Ishizawa K, Horii A,
2. 発表標題 Mutation Analyses of Four Japanese Pedigrees with Hereditary Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome (HPPS).
3. 学会等名 ASHG, 2018 (2814W) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kota Ishizawa
2. 発表標題 MDM2 Amplification Mediates Resistance to Cabozantinib in RET-Rearranged Lung Cancers
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2017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	堀井 明 (horii akira) (40249983)	東北大学・医学系研究科・名誉教授 (11301)	
研究分担者	三森 隆広 (mimori takahiro) (40760161)	国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・研究員 (82401)	
研究分担者	桜田 晃 (sakurada akira) (60360872)	東北大学・加齢医学研究所・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------