

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15952

研究課題名(和文) 癌幹細胞の形質維持に対するPAI-1の関与の検討；進行肺癌を治癒に導く治療の開発

研究課題名(英文) Involvement of PAI-1 in maintaining the characteristic of cancer stem cells; development of treatment to cure advanced lung cancer

研究代表者

益田 武 (Masuda, Takeshi)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：80747890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌患者のEGFR-TKIに耐性化後の検体では治療前よりもPAI-1発現が亢進していることが示された。続いて、EGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株を用いた実験により、PAI-1が肺癌細胞のEGFR-TKIに対する耐性に関与していることが確認された。また、PAI-1は癌細胞の耐性化に細胞外マトリックスとインテグリンを起点としたEMTを介して関与していることが示された。続いて、マウス皮下腫瘍モデルによる実験により、オシメルチニブ単独投与により耐性化した腫瘍ではPAI-1が高発現しており、オシメルチニブにPAI-1阻害剤を併用投与すると、この再増大が抑制されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌の85%を占める非小細胞癌に対する薬物療法は進歩を続け、その治療成績は向上している。その中で、オシメルチニブはEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者に対する標準治療薬であり、本薬剤は約70%の症例において奏効することが示されている。しかし一方で、完全寛解には至る症例は非常に少なく、大部分の症例は癌細胞がオシメルチニブに対する耐性を獲得する。よって、この耐性機序を克服する治療方法の開発が求められている。本研究では、PAI-1阻害剤がオシメルチニブに対する耐性克服のための有望な治療薬となることが示されたことに大きな意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We showed that Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression level was higher in tumors that acquired resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors than in those before treatment in patients with EGFR gene mutated lung adenocarcinoma. In addition, we revealed that PAI-1 was associated with the development of acquired resistance to Osimertinib using EGFR-mutated lung cancer cells. Furthermore, it was observed that PAI-1 participate in the development of acquired resistance to Osimertinib via integrin and extracellular matrix interaction-induced epithelial-mesenchymal transition pathway. In the mouse subcutaneous tumor model, the PAI-1 expression level in tumors that acquired resistance to Osimertinib was increased compared to those before treatment. In addition, we showed that PAI-1 inhibitor and Osimertinib administration suppressed tumor resistance thereby limiting tumor regrowth.

研究分野：肺癌

キーワード：PAI-1 EGFR-TKI 耐性化 EMT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌の 85% を占める非小細胞癌に対する薬物療法は進歩を続け、その治療成績は向上している。その中で分子標的治療薬の Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者において、約 70% の奏効率が示されている。しかし一方で、完全寛解には至る症例は少なく、大部分の症例は腫瘍が縮小した後に再増大する。このように、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌を治療に導くことができない理由の一つとして、分化能を持たないため薬物療法へ抵抗性を示し、自己複製能を併せ持つ癌幹細胞の関与が注目されている。よって、この癌幹細胞を標的にした治療方法を開発するための研究がなされているが、その効果を検証する臨床試験は未だ実施されていないのが現状である。

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は生体の血管内皮細胞、マクロファージなどから産生される分子量 47-kDa の糖タンパクであり、線溶系の抑制因子として機能している。申請者の在籍する研究室では、この PAI-1 が肺胞上皮細胞の epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関わることで肺線維症の進展に関与することを報告している。この EMT は、癌研究の領域では癌幹細胞の形質維持に関与していることが報告されている。以上の背景を踏まえて、申請者らは PAI-1 が癌幹細胞の形質維持にも EMT を介して関わり、非小細胞肺癌に対する薬物療法、特に EGFR-TKI の効果に関与するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、PAI-1 阻害薬を用いながら、PAI-1 が EMT を介して癌幹細胞の形質維持と EGFR-TKI への効果にも関わることを証明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者の EGFR-TKI 治療前と耐性化後の組織における PAI-1 発現の比較 広島大学病院で肺腺癌と病理診断され、EGFR-TKI である Gefitinib 又は Erlotinib、Afatinib による治療に耐性化した後、再生検された検体を用いた免疫染色により PAI-1 発現の程度を比較した。

(2) PAI-1 が癌細胞の EGFR-TKI に対する耐性に関与しているかどうかを検討するため、癌細胞株を用いた *in vitro* の実験を行った。実験には、以下の 3 種類の EGFR 遺伝子変異を有するヒト肺腺癌細胞株を用いた PC9; Exon19 欠失変異、HCC827; Exon19 欠失変異、H1975; L858 変異と T790M 変異。day0 にそれぞれの細胞を 6well プレートに 0.5×10^5 個ずつ撒き、day1、day4、day7 に $1 \mu\text{M}$ の gefitinib または $0.5 \mu\text{M}$ の Osimertinib を含む培養液 (IC_{50} の 30-50 倍) に入れ替えた。day8 にこの時点で死滅せず生存する細胞を EGFR-TKI 耐性細胞とした。各細胞の mRNA を抽出し、定量的 RT-PCR で耐性細胞とコントロール細胞の PAI-1 mRNA 発現を比較した。さらに、EGFR-TKI 耐性細胞を無血清培養液で培養して、48 時間後に培養液を回収し、培養液中の PAI-1 濃度を測定し、コントロールと比較した。

(3) 耐性機序の確認

ここまでで作製した EGFR-TKI 耐性細胞が既知の遺伝子変異を有しているかどうかを確認した。各細胞の EGFR-TKI 耐性細胞において、T790M 変異、C797S 変異の有無を PNA-LNA PCR Clamp 法で確認した (LSI メディエンスに委託)。また MET や HER2 の遺伝子増幅変異の有無も定量的 PCR 法 (TaqMan® Copy Number Assay) により検討した。

(4) PAI-1 が EGFR-TKI に耐性となった細胞の生存、増殖に関与しているかを確認した。PAI-1 を高発現して EGFR-TKI に耐性化した細胞に対して、PAI-1 阻害薬である SK-216 (0 、 50 、 $100 \mu\text{M}$) を添加し、PAI-1 の耐性細胞の生存や増殖への影響を検討した。

(5) EGFR-TKI による耐性に PAI-1 が関与する機序が EMT であるかどうかを検討するために、耐性化した癌細胞の EMT 関連遺伝子の mRNA 発現を評価した。Osimertinib 投与後の第 4 日、第 8 日に生存する細胞を回収し、PAI-1 並びに EMT 関連遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法で測定した。

(6) PAI-1 がどのようなシグナル経路を介して EMT に関与しているかを検討するために、Osimertinib 耐性の PC9 と H1975 の RNA を抽出して、マイクロアレイ法で網羅的な発現遺伝子解析を行い、遺伝子発現の傾向をコントロールと比較した。

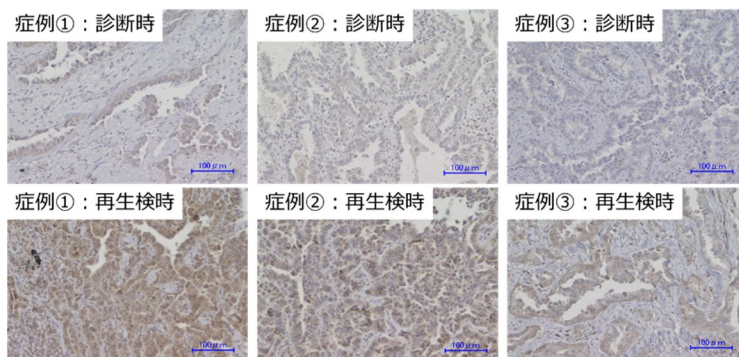
(7) 実際に Osimertinib 耐性時にインテグリンを起点とした EMT 経路の遺伝子発現が亢進しているかどうかを RT-PCR で検討した。さらに細胞に PAI-1 阻害剤を添加した後、生存する細胞において、これらの EMT シグナル経路の遺伝子発現の変化を RT-PCR で確認した。

(8) ここまでの実験結果を *in vivo* で確認した。H1975 を用いたマウス皮下腫瘍モデルを作成し、Osimertinib による治療後に残存する耐性化した腫瘍が、PAI-1 を高発現しているかどうかを免疫染色で評価した。

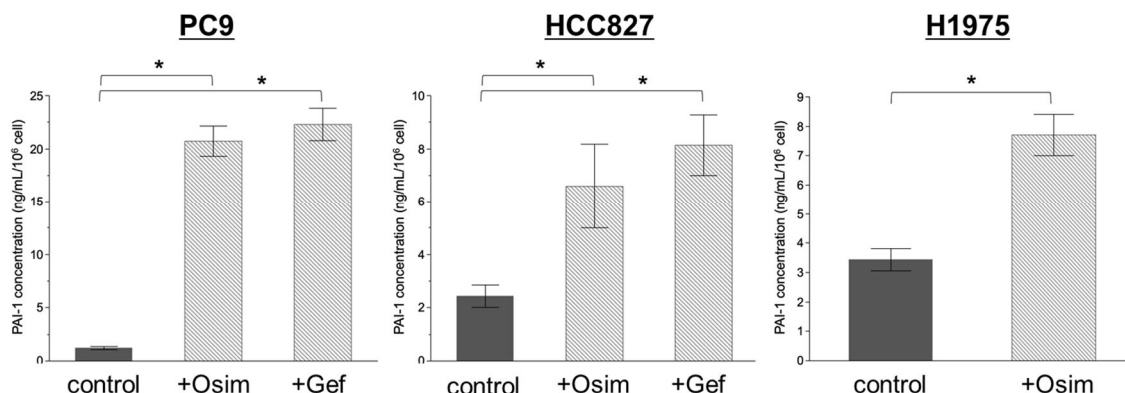
(9) 同様のモデルにおいて、Osimertinib 単独治療による耐性化が PAI-1 阻害により抑制されるかどうかを検討した。

4. 研究の成果 番号は方法の番号と対応している

(1) 27例が対象となり、その中で EGFR-TKI 治療前と再生検時ともに手術または CT ガイド下生検という免疫染色により適正な評価が可能な 8 検体を利用した。その結果、EGFR-TKI に耐性となった検体の癌細胞は治療前に比べて、PAI-1 が高発現していることが示された。以下に代表的な症例の Figure を示す



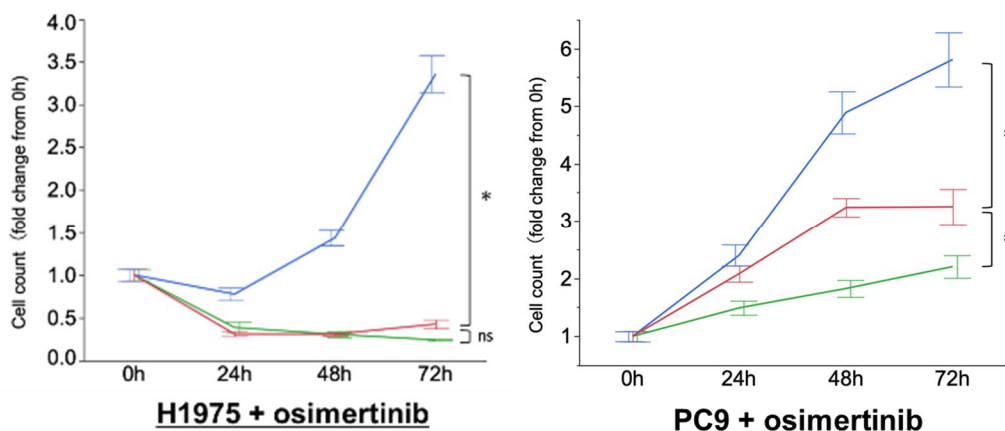
(2) EGFR-TKI の Osimertinib 又は Gefitinib に耐性化した PC9、HCC827、H1975 はコントロールと比較して PAI-1 mRNA が統計学有意に高発現していた。下記の Figure のように、EGFR-TKI に耐性の PC9、HCC827、H1975 の培養液中の PAI-1 タンパク濃度もコントロールよりも統計学的有意に高値であることが認められた。+Osim; Osimertinib 添加により耐性化した細胞、+Gef; Gefitinib 添加により耐性化した細胞、*; $p < 0.05$



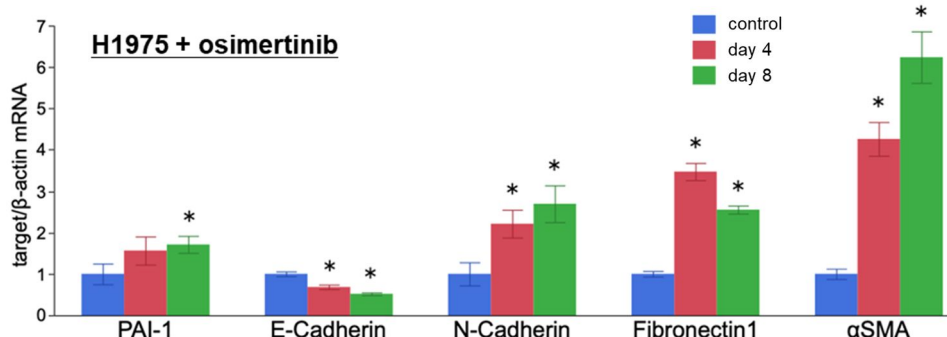
(3) 耐性細胞では、新しく T790M 変異、C797S 変異、MET や HER2 の遺伝子増幅変異は認められなかった。

ここから先の実験では、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の初回標準治療、そして T790M 変異を生じて耐性化した症例に対して標準治療として使用される Osimertinib を実験に用いることにした。

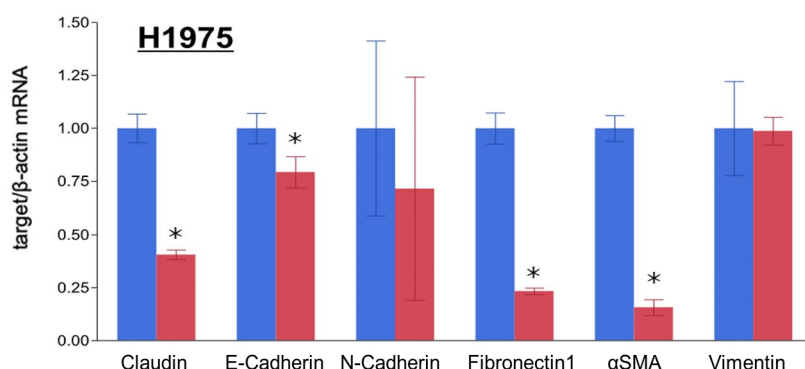
(4) PAI-1 を阻害することで、Osimertinib 耐性の H1975、PC9 と HCC827 の細胞増殖が抑制されることが示された。つまり、PAI-1 が耐性細胞の増殖、生存に関与することが示された。以下の Figure では、H1975 と PC9 のデータを示している。*; $p < 0.05$, ns; not significant



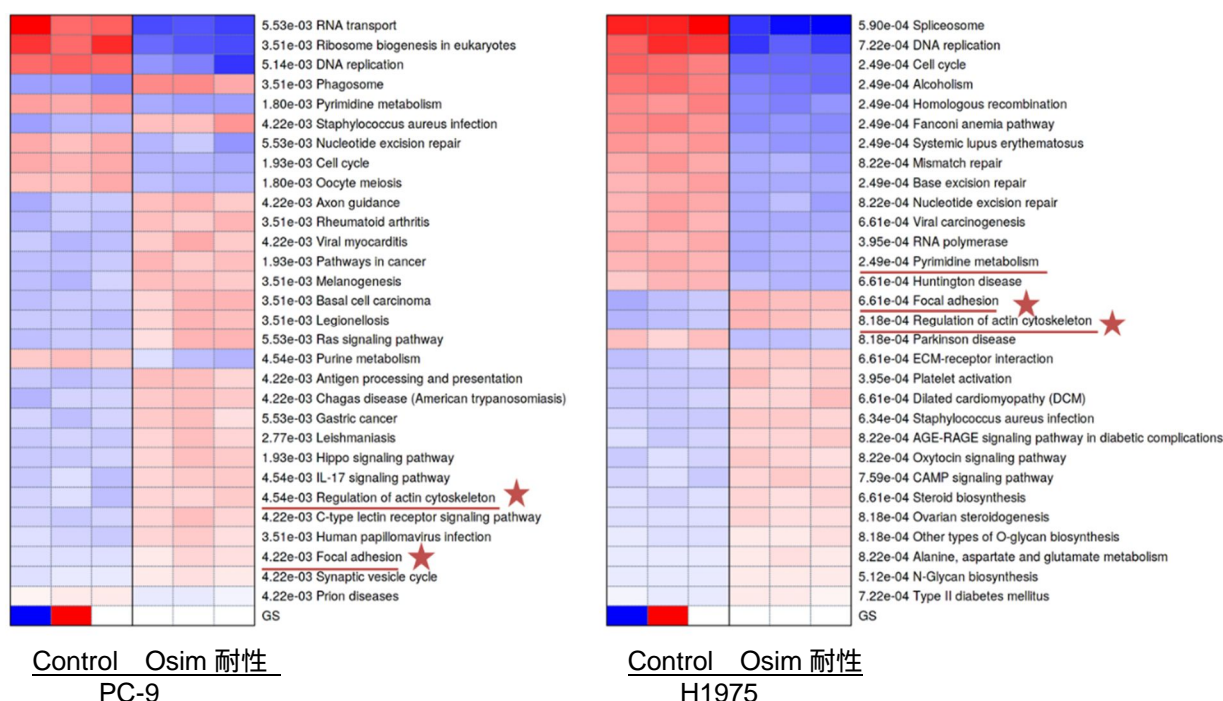
(5) Osimertinib 投与後に、PAI-1 また間葉系マーカーである N-Cadherin、Fibronectin、 α SMA 発現が経時的 (day4、day8) に亢進した (下記 Figure)。ただ、当初想定していた癌幹細胞の遺伝子発現は変化が認められなかった。よって、以下の検討では癌幹細胞についての検討は行っていない。*; $p < 0.05$



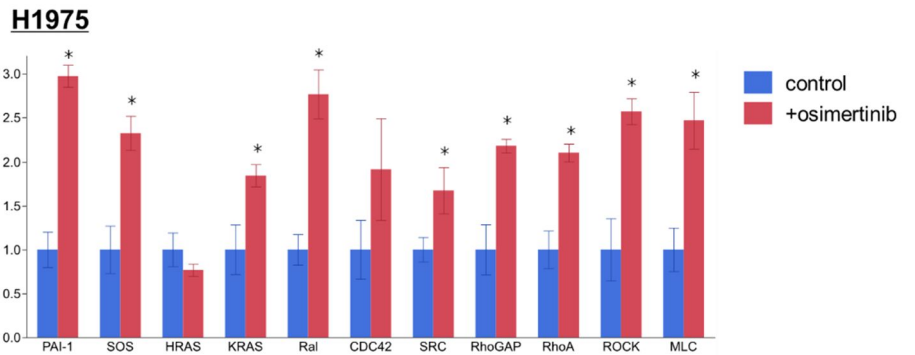
さらに、Osimertinib 耐性の H1975 に PAI-1 阻害薬を添加すると、一部の間葉系マーカーの発現低下が認められた。これらの結果より、EGFR-TKI による耐性に PAI-1 が関与する機序が EMT であることが確認された (下記 Figure)。*; $p < 0.05$



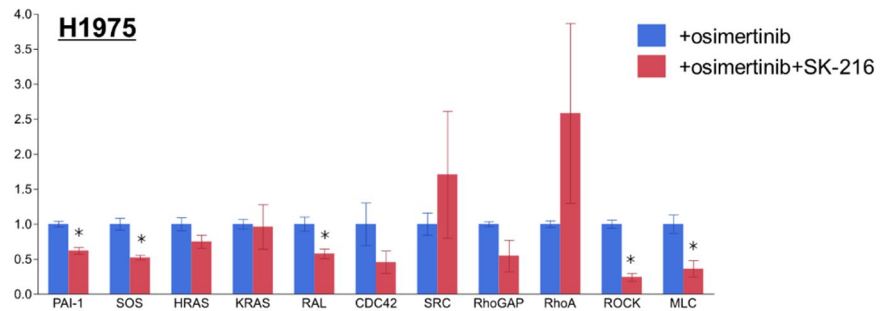
(6) マイクロアレイ結果から、耐性化した細胞では細胞骨格、細胞接着に関与している遺伝子発現が亢進しており、さらに細胞外マトリックス (Fibronectin、Vitronectin、Collagen、Laminin 等) インテグリンの遺伝子発現が高発現していることが認められた (下記 Figure)。細胞外マトリックス・インテグリンを起点とした EMT 経路が存在することは知られており、この経路を形成する遺伝子発現の亢進も認められた。Osim; Osimertinib



(7) マイクロアレイの結果と同様に、コントロールと比較して、右 Figure のように、Osimertinib 投与群で PAI-1 とインテグリン・ECM を起点とした EMT 経路の構成遺伝子の発現が亢進していた。*; p<0.01

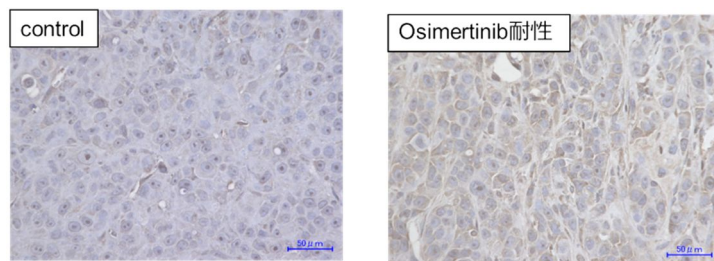


さらに、Osimertinib 耐性細胞は、PAI-1 阻害剤 (SK-216) 添加によりインテグリン・ECM を起点とした EMT 経路の構成遺伝子の発現が抑制された (右 Figure)。

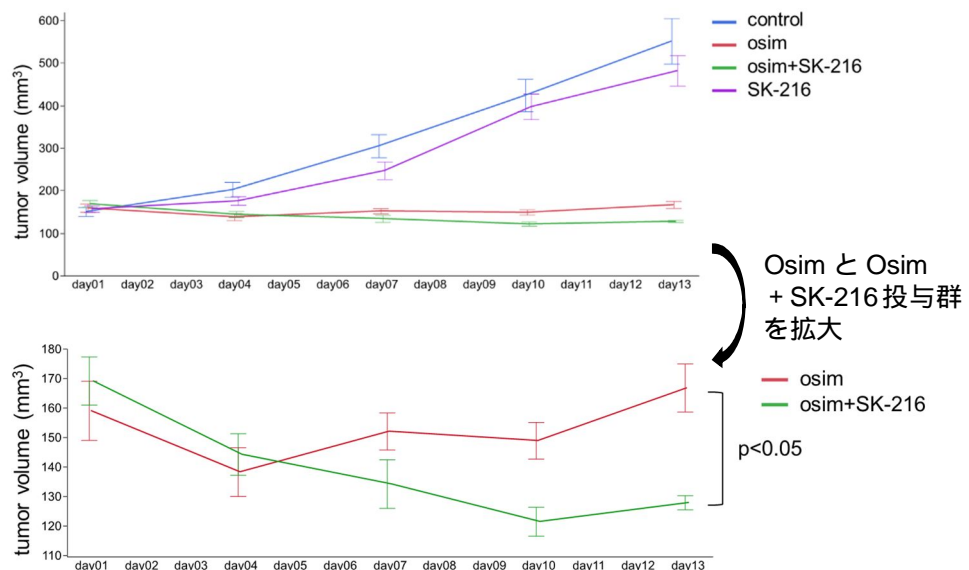


これらの結果から、PAI-1 が関与する Osimertinib 耐性化にはインテグリン・ECM を起点とした EMT シグナル経路が関与しているものと考えられた。*; p<0.01

(8) H1975 を用いたマウス皮下腫瘍モデルを作成し、Osimertinib による治療後に残存する耐性化した腫瘍が、PAI-1 を高発現しているかどうかを免疫染色で評価した。その結果、Osimertinib に耐性化した細胞では、右の Figure のように、コントロールと比較して、免疫染色で PAI-1 が高発現していることが示された。



(9) さらに、下記 Figure に示すように、Osimertinib 単独治療群では治療開始約 14 日目に腫瘍の再増大が認められたが、ここに PAI-1 阻害剤 (SK-216) を併用投与した場合は、腫瘍の再増大が抑制されることが示された。Osim; Osimertinib



本研究では、PAI-1 が細胞外マトリックスとインテグリンを起点とした EMT を介して Osimertinib への耐性に関与することが示された。また、PAI-1 阻害剤がオシメルチニブに対する耐性の克服のための有望な治療薬となることも示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakanishi Y, Masuda T, Yamaguchi K, Sakamoto S, Horimasu Y, Mimae T, Nakashima T, Miyamoto S, Tsutani Y, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyata Y, Hamada H, Okada M, Hattori N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Albumin-globulin ratio is a predictive biomarker of antitumor effect of anti-PD-1 antibody in patients with non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 74-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-019-01539-2.	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 -
1. 著者名 Nakanishi Y, Masuda T, Yamaguchi K, Sakamoto S, Horimasu Y, Nakashima T, Miyamoto S, Tsutani Y, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyata Y, Hamada H, Okada M, Hattori N.	4. 巻 57
2. 論文標題 Pre-existing interstitial lung abnormalities are risk factors for immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease in non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Investig.	6. 最初と最後の頁 451-459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2019.05.002.	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 -
1. 著者名 Shioya S, Masuda T, Yamaguchi K, Sakamoto S, Horimasu Y, Nakashima T, Miyamoto S, Senoo T, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N.	4. 巻 152
2. 論文標題 Comparison of anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibody-related and idiopathic non-specific interstitial pneumonia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Med.	6. 最初と最後の頁 44-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmed.2019.04.023.	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 -
1. 著者名 Masuda T, Nakashima T, Namba M, Yamaguchi K, Sakamoto S, Horimasu Y, Miyamoto S, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyata Y, Hamada H, Okada M, Hattori N.	4. 巻 23
2. 論文標題 Inhibition of PAI-1 limits chemotherapy resistance in lung cancer through suppressing myofibroblast characteristics of cancer-associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med	6. 最初と最後の頁 2984-2994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.14205.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳毛 健太郎、益田 武、山口 覚博、坂本 信二郎、堀益 靖、宮本 真太郎 中島 拓、岩本 博志、藤高 一慶、濱田 泰伸、服部 登
2. 発表標題 PAI-1はEGFR遺伝子変異陽性肺腺癌のEGFRチロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性獲得に関与する
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳毛 健太郎、益田 武、山口 覚博、坂本 信二郎、堀益 靖、宮本 真太郎、中島 拓、岩本 博志、藤高 一慶、濱田 泰伸、服部 登
2. 発表標題 PAI-1はEGFR遺伝子変異陽性肺腺癌のチロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性獲得に関与する
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------