

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08601

研究課題名（和文）ドライバー遺伝子陽性肺癌における新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic strategies for driver mutation-positive lung cancer

研究代表者

小笹 裕晃（Ozasa, Hiroaki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80572015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：分子標的治療は、進行非小細胞肺癌の予後を劇的に改善しました。しかし、がん細胞の一部が生き残り、再び増悪することが臨床の場で問題となっています。私共の研究グループは分子標的治療薬にさらされた腫瘍細胞の一部が生き残るメカニズムとして、YAP-1という分子が重要な役割を果たしていることを発見しました。EGFR・ALK・ROS1・BRAF陽性肺癌細胞に、各々の分子標的治療薬を暴露すると、YAP-1が活性化することにより、生存シグナルが維持されました。マウス実験で、YAP-1の機能を阻害する薬と分子標的治療薬を併用することにより、腫瘍の再発を著明に遅らせることができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライバー変異陽性肺癌において、YAP1を阻害する薬剤と分子標的治療薬の併用は、治療初期の段階でがん細胞をより多く死滅させることにより、再増大までの期間を延長させることができる可能性が示唆されました。この結果は、肺癌の予後を改善に寄与するとともに、肺癌の根治を目指した新規治療戦略の礎になる可能性があります。今後は、臨床応用できるYAP1阻害剤の開発を進めていく必要があります。

研究成果の概要（英文）：Molecular-targeted therapies for driver oncogenes have dramatically improved the prognosis of advanced non-small cell lung cancer. However, it has become a clinical problem that some of the cancer cells survive and grow again. In this study, we discovered that YAP-1 played an important role in the survival mechanism of some cancer cells exposed to molecular-targeted drugs. When driver oncogenes-positive lung cancer cells were exposed to molecular-targeted drugs suitable for each, activation of YAP-1 could maintain cell survival signals in the cancer cells. The combination therapy with YAP1 inhibitor and molecular-targeted drug could suppress tumor regrowth in vivo.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 YAP1 治療初期生存 ドライバー遺伝子 分子標的治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は発癌の直接的原因ともいえる EGFR、ALK、ROS1、BRAF などのドライバー遺伝子変異が発見され、EGFR・ALK チロシンキナーゼ阻害薬等の分子標的治療の開発は癌の原因に直接作用し、多くの腫瘍が数日～数週で縮小する(New Engl J Med.2010; 362: 2380-8; Science. 2004; 304: 1497-500.)。しかし高い効果の一方で、少数の例外を除き根治はせず、数か月後、耐性を獲得した腫瘍の再発・増大が必発である。この問題に対し、分子標的治療薬への獲得耐性の研究は多く行われてきた(Nature. 2016;534, 129-132)。しかし、獲得耐性の克服治療は多く臨床に導入されたが、結果的にその治療に耐性となる新たな機序を誘導し、肺癌は根治に至っていない。この問題を解決するため、私共の研究グループは治療初期に癌細胞の一部が分子標的治療に耐え生存する現象(治療初期生存)に着目した。治療初期生存を阻害し根絶できれば、耐性の発生を未然に防ぎ、肺癌根治を目指した薬物治療となりえる。

## 2. 研究の目的

私共のグループではこの研究課題に先立ち、患者由来 ALK 陽性肺癌細胞株を 3 株樹立し、ALK 阻害剤曝露時と非曝露時でプロテオーム解析を行い、ALK 陽性肺癌の治療初期生存に重要な転写因子 YAP1 を同定し、YAP1 阻害が ALK 陽性肺癌に、治療効果をもたらす結果を得た(Nat Commun. 2020;11:74)。引き続き、同様の手法でさらなる初期生存因子の同定を試みるとともに、ALK 陽性肺癌で発見した YAP1 の作用について、他のドライバー遺伝子陽性肺癌にも適応可能であるか、検討を進めていくことを計画した。具体的な目的は下記の通りである。

- (1) 治療初期生存に関わる責任因子を、患者由来細胞株に対するプロテオーム解析を用いて探索・同定する。
- (2) 同定した因子の阻害を行い、治療初期生存を標的とした新たな治療を開発する。
- (3) すでに同定した ALK 陽性肺癌の治療初期生存に関わる因子 YAP1 をターゲットとした治療開発を行う。
- (4) 稀な ALK、ROS1、BRAF 陽性肺癌細胞を樹立・提供し、今後の研究の発展を促す。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプルの樹立:

ドライバー遺伝子陽性肺癌患者の癌性胸水から肺癌由来培養細胞株を樹立する。

### (2) 初期生存因子の探索:

当初、樹立した培養細胞株を免疫不全マウスに移植し Xenograft モデルを樹立し、マウスに標的治療薬を一定期間投与し残存した少量の腫瘍と薬剤非曝露の腫瘍と比較する予定であったが、残存する腫瘍が非常に少なかったため、in vitro で、樹立した培養細胞株に標的治療薬を一定期間投与して生き残った癌細胞と薬剤非曝露の癌細胞を用いてプロテオーム解析を行った。

### (3) 候補因子の機能解析:

プロテオーム解析の結果、ALK 陽性肺癌と同様に、YAP1 が治療初期生存に関わる候補因子と考え、YAP1 の機能解析を行った。YAP1 の活性化を検討するために、蛍光免疫染色を用いた YAP1 の細胞内における局在を確認した。次に、in vitro の機能解析を行った。siRNA を用いて YAP1 の発現抑制による標的治療薬の感受性変化を検討した。

### (4) 治療初期生存因子を標的とした治療開発:

YAP1 阻害剤の初期治療生存への治療効果を確認するために、樹立した培養細胞株を免疫不全マウスに移植し異種移植ヒト肺癌モデル(Xenograft モデル)を樹立し、YAP1 阻害剤と標的治療薬の併用効果を検討した。

### (5) 検体ライブラリを用いた検:

当院で受療した肺癌患者の病理組織アレイと患者の gDNA ライブラリを用い、病理組織の免疫染色・患者体細胞の一塩基多型(SNP)を解析し、同定した初期生存因子の意義を検討する。生存期間等の臨床情報を解析する計画をした。

#### 4. 研究成果

##### (1)研究サンプルの樹立：

肺癌患者の癌性胸水を採取した検体から樹立を行った。ROS1 陽性・BRAF 陽性・EGFR 陽性肺癌細胞株の樹立に成功した。研究開始以前より ALK 陽性肺癌細胞株は樹立している。ALK, ROS1, BRAF 陽性の肺癌由来培養細胞株は入手が難しいことより、これらの細胞株の樹立は、今後の研究の発展にも寄与すると考えられる。

##### (2)初期生存因子の探索：

ROS1 陽性肺癌細胞株 KTOR71 細胞株に、ROS1 阻害剤であるロルラチニブを暴露して生き残った癌細胞と非暴露の癌細胞を用いてプロテオーム解析を行った。GO 解析の結果、'actin filament-based process', 'regulation of cell-substrate adhesion', 'regulation of cell adhesion' の3つのタームで相違があることを確認した(図1)。以前に報告した ALK 陽性肺癌と同様の結果であったため、ROS1 陽性肺癌においても YAP1 の活性変化に注目することにした。

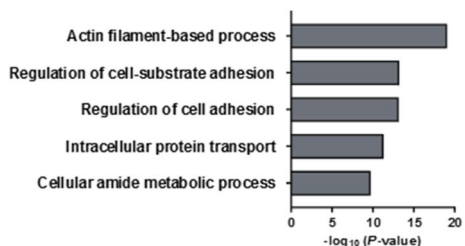


図1. プロテオーム解析 (GO 解析) の結果

##### (3)候補因子の機能解析：

KTOR71 細胞にロルラチニブを暴露することにより、YAP1 は細胞質から核内に移行し、活性化することを確認することができた(図2)。更に、EGFR 陽性肺癌では、患者検体より樹立した細胞株 KTOR27 と市販されている PC-9 細胞株を用いて行ったところ、EGFR 阻害剤であるオシメルチニブの暴露により、YAP1 は核内に移行し活性化することを確認した。患者検体より樹立した BRAF 陽性肺癌細胞株 KTOR81 については、暴露前よりほぼすべての細胞で YAP1 は核内に局在していた。

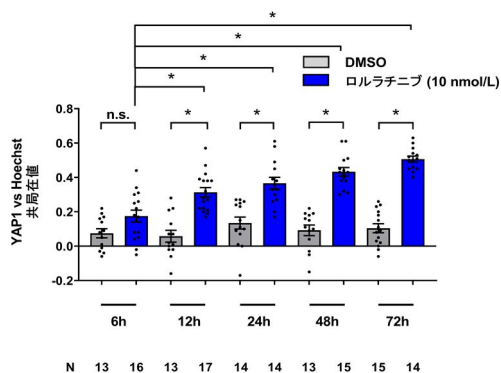


図2. ロルラチニブ暴露による YAP1 の核内移行

次に、siRNA による in vitro の機能解析を行った。KATOR71 細胞において siRNA により YAP1 の発現を抑制したところ、ロルラチニブの感受性が亢進した(図3)。同様に、EGFR 陽性肺癌細胞 KTOR27 と PC-9 においても、YAP1 発現抑制によりオシメルチニブの感受性が亢進した。

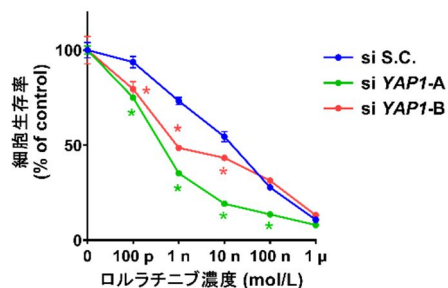


図3. siRNA による YAP1 発現抑制によるロルラチニブの感受性の変化

(4)治療初期生存因子を標的とした治療開発：

KTOR71 細胞を免疫不全マウスに移植した Xenograft モデルを樹立し、YAP1 阻害であるベルテボルフィンとロルラチニブの併用群の治療効果をロルラチニブ単独群と比較した。その結果、併用群は、腫瘍細胞をほぼ死滅させ、単独群と比較して明らかに腫瘍の再増大の速度が遅延した(図4)。EGFR 陽性肺癌と BRAF 陽性肺癌においても標的治療薬と YAP1 阻害剤の併用は腫瘍の再増大の速度が遅延した。

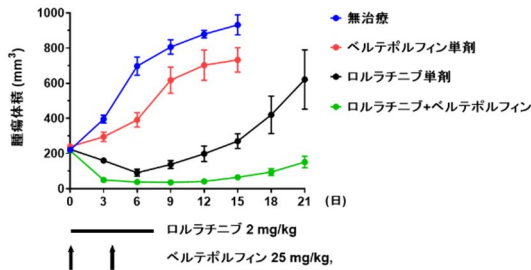


図4. In vivo における YAP1 阻害剤と標的治療の併用効果

(5)検体ライブラリを用いた検討：

YAP1 と共役する転写因子のうち、がんの悪性化に関与する TEAD 1 の一塩基多型について、当院のデータベース・検体ライブラリを用いて検討した。2008 年から 2018 年の期間に、当院で EGFR 阻害剤の治療を受けた 126 名の進行非小細胞患者の TEAD1 の一塩基多型と治療成績（無増悪生存期間）に相関はなかった。病理組織アレイを用いて、YAP 1 の発現と EGFR 阻害剤治療成績の関連を現在検討している。

以上の研究成果より、ドライバー遺伝子陽性肺癌において、分子標的治療の初期生存に関わる因子のひとつとして、YAP1 を同定した。YAP1 阻害薬と分子標的治療薬の併用は、進行肺癌の更なる予後改善に寄与し、根治に近づく治療法である可能性が示唆された。今後は、臨床応用できる YAP1 阻害剤の開発が必要となると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuji Takahiro, Ozasa Hiroaki, Aoki Wataru, Aburaya Shunsuke, Yamamoto Funazo Tomoko, Furugaki Koh, Yoshimura Yasushi, Yamazoe Masatoshi, Ajimizu Hitomi, Yasuda Yuto, Nomizo Takashi, Yoshida Hironori, Sakamori Yuichi, Wake Hiroaki, Ueda Mitsuyoshi, Kim Young Hak, Hirai Toyohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 YAP1 mediates survival of ALK-rearranged lung cancer cells treated with alectinib via pro-apoptotic protein regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13771-5	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山添正敏、小笹裕晃、辻貴宏、古垣耕、吉村康史、船造智子、味水瞳、安田有斗、野溝岳、吉田博徳、阪森優一、金永学、平井豊博
2. 発表標題 ALK陽性肺がんのアレクチニブ治療からの逃避は、抗アポトーシス因子の調節を介したYAP1により制御される
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020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	青木 航 (Aoki Wataru)  (10722184)	京都大学・農学研究科・助教  (14301)	
研究分担者	吉田 博徳 (Yoshida Hironori)  (60839710)	京都大学・医学研究科・特定病院助教  (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山添 正敏  (Yamazoe Masatoshi)		
研究協力者	大木元 達也  (Ogimoto Tatsuya)		
研究協力者	細谷 和貴  (Hosoya Kazutaka)		

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