

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08622

研究課題名(和文) 肺がんと血小板の関係に着目した新たな分子標的薬耐性機構の解明と克服

研究課題名(英文) Role of Platelets in Molecular Targeted Drug Resistance Mechanisms of Lung Cancer

研究代表者

渡邊 広祐 (Watanabe, Kousuke)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50644291

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)：血液中の血小板はがんの浸潤・転移において重要な役割を果たしており、大腸がんや乳がんにおいて上皮間葉移行(EMT)を誘導し浸潤・転移を促進することが報告されている。血小板が、がんの薬物療法の感受性にどのように影響するのかが分かっておらず、本課題では、肺がんの薬剤感受性における血小板の役割を明らかにすることを目的として血小板を肺癌細胞株と共培養をする系を確立した。共培養により、癌細胞の形態変化、CDH1発現低下、VIM発現上昇が認められ、EMT誘導と考えられた。EMTはEGFR阻害薬耐性機構の一つと考えられているため共培養による耐性化を検証したが、十分な再現性をもった耐性化誘導は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中の血小板は、上皮間葉移行(EMT)と呼ばれる変化をがん細胞に誘導することで、がんの浸潤・転移に重要な役割を果たしている。本課題では血小板が肺癌細胞にもEMTを誘導することが確認されたが、EGFR阻害薬という肺癌で広く用いられている薬剤の効果への影響は認められなかった。肺癌の治療薬には他にも多くの薬剤があるため、今後他の薬剤を含めた解析が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Platelets are known to play an important role in cancer invasion and metastasis, and have been reported to induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) and promote invasion and metastasis in colon and breast cancers. However, the impact of platelets on the sensitivity of cancer chemotherapy is not yet clear. Therefore, in this study, a co-culture system of platelets and lung cancer cell lines was established to clarify the role of platelets in drug sensitivity of lung cancer. Co-culture resulted in morphological changes in cancer cells, decreased CDH1 expression, and increased VIM expression, which were considered to indicate EMT induction. EMT is considered to be one of the mechanisms of EGFR inhibitor resistance, but the induction of resistance by co-culture did not show sufficient reproducibility.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌 EMT 血小板

1. 研究開始当初の背景

血小板は血栓形成・止血以外に、がんの浸潤・転移において重要な役割を果たしている。血小板は大腸がんや乳がんにおいて EMT を誘導し浸潤・転移を促進する [Myriam Labelle et al. Cancer Cell 2011]。また circulating tumor cell は、血小板と接着することで NK 細胞による排除や shear stress による細胞死から保護されている [Raphael Leblanc et al. Blood 2016]。一方、血小板が薬物療法 (分子標的治療薬、免疫チェックポイント阻害薬、殺細胞性抗がん剤) の効果にどのように影響するかは分かっていない。本研究課題では、わが国の肺腺がんの 4~5 割を占める EGFR 遺伝子変異陽性肺がんに着目した。

EGFR 遺伝子変異陽性肺がんでは EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) 投与開始から 1 - 2 年以内に耐性を生じることが多く、第 1・第 2 世代の EGFR-TKI (ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ) は無増悪生存期間 (PFS) 中央値が 10 か月、第 3 世代の EGFR-TKI (オシメルチニブ) は PFS 中央値が 18 か月である。申請者は当院で第 1・第 2 世代の EGFR-TKI を投与された EGFR 遺伝子変異陽性の再発・進行非小細胞肺がんを後方視的に解析し、EGFR-TKI 投与開始直前の平均血小板体積 (MPV) が高値の症例で PFS が有意に短いことを明らかにした (14.7 か月 vs 8.2 か月)。幼弱な血小板はサイズが大きく活性が高いため、MPV 高値は血小板のターンオーバーが亢進し活性が高いことを意味している。したがって、血小板の活性と関連した EGFR-TKI の耐性機序が存在する可能性が示唆された [Watanabe K et al. PLOS ONE 2018]。

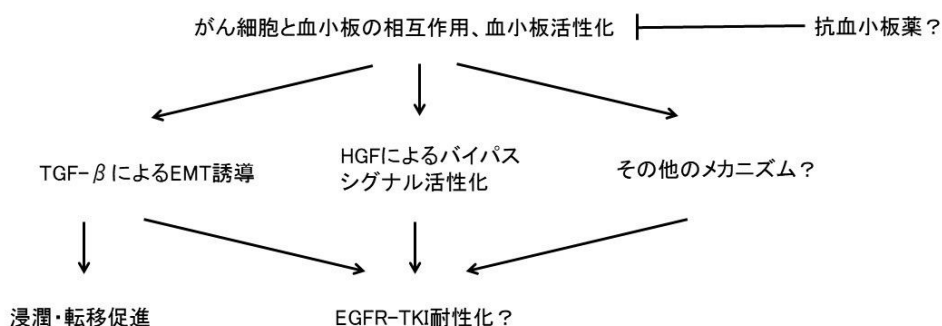


図 1 本研究の作業仮説

2. 研究の目的

血小板はがんの浸潤・転移や血管新生を促進することが知られているが、肺がんにおける血小板の役割、とくに薬物療法の感受性への影響は明らかではない。本研究では EGFR 遺伝子変異陽性肺がんに着目し、薬剤感受性に対する影響を解明する。そのために以下のことを明らかにしていく。

- 血小板との共培養によって誘導される形態変化は EMT と言えるのか
- 血小板は EGFR-TKI の感受性を低下させるか
- どのような分子メカニズムにより肺がん細胞の形質が変化するのか
- 抗血小板薬は血小板存在下における EGFR-TKI の感受性を改善させるか

3. 研究の方法

本研究では健康被験者 (研究室メンバー) の血小板と肺がん細胞株を共培養する系を用いて、EMT の誘導や EGFR-TKI 感受性を解析する。

血小板による EMT 誘導

がん細胞と血小板を共培養し、がん細胞に形態変化が誘導されるかを観察する。また形態変化が EMT であることを検証するために、EMT マーカー (CDH1 遺伝子、VIM 遺伝子など) の発現を免疫細胞染色で確認する。

血小板による分子標的薬感受性への影響の検証

EGFR-TKI (アファチニブとオシメルチニブ) に対する感受性を *in vitro* で評価する。有意な結

果が得られれば、動物実験（ヌードマウスへの接種）を行う。

抗血小板薬の EMT 誘導や EGFR-TKI 耐性化への影響の検証
抗血小板薬（アスピリン、P2Y12 受容体拮抗薬）で処理した血小板を用いて共培養し、EMT 誘導や EGFR-TKI 耐性化への影響を検証する。

4 . 研究成果

健常者のボランティアの末梢血から血小板を精製し、非小細胞肺癌細胞株と共培養を行うと、細胞株の形態変化が生じるとともに、免疫細胞染色により CDH1 発現低下、VIM 発現上昇が認められ、がん細胞に EMT が誘導されていると考えられた（図 2）。EMT は肺がんの分子標的薬の耐性化に関与しているとの報告があり、血小板による EMT 誘導が、肺がん細胞の薬剤感受性を低下させる可能性が示唆された。

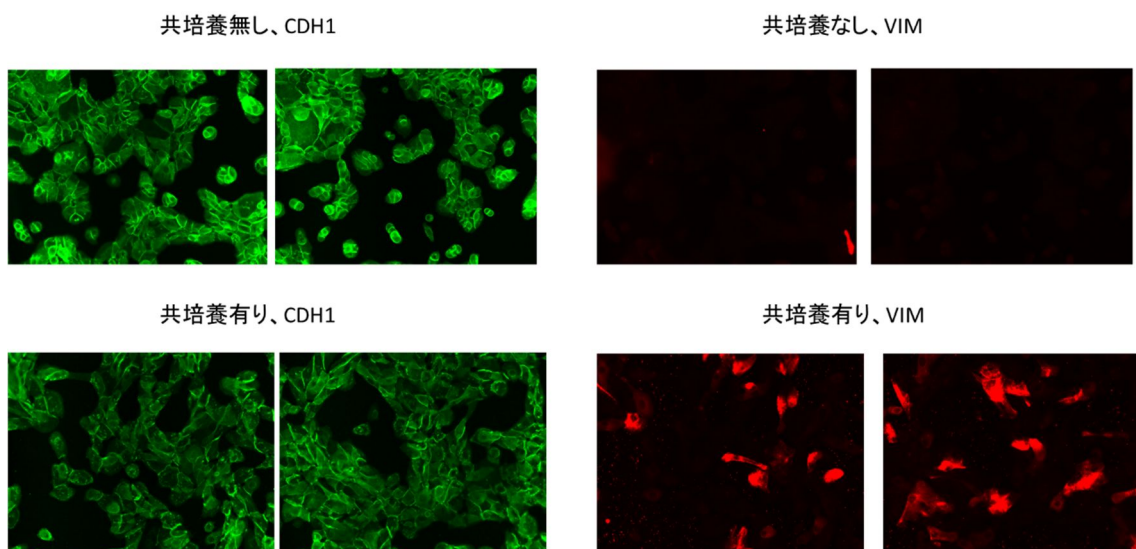


図 2 非小細胞肺癌細胞株と血小板との共培養による免疫細胞染色
血小板との共培養により CDH1 の発現は低下し、VIM は発現上昇しており EMT が誘導されていると考えられる。

続いて、複数の分子標的薬（アファチニブとオシメルチニブ）の感受性について検証を行ったが、十分な再現性をもった耐性化誘導は認められず、EGFR 耐性化における血小板の役割は否定的と考えられた。販売されている複数の抗血小板薬の存在下で EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株と血小板を共培養し、抗血小板薬の併用により EMT の誘導が抑制されるかを検証した。少なくとも今回使用した細胞株では、有意な誘導抑制は認められず、抗血小板薬の効果は乏しい結果であった。共培養の系は確立されており、今後は EGFR 阻害薬以外の分子標的薬や殺細胞性化学療法の影響性に関して検討を進めたい。

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 Katsunori Manaka, Junichiro Sato, Maki Takeuchi, Kousuke Watanabe, Hidenori Kage, Taketo Kawai, Yusuke Sato, Takuya Miyagawa, Daisuke Yamada, Haruki Kume, Shinichi Sato, Takahide Nagase, Taroh Iiri, Masaomi Nangaku, Noriko Makita	4. 巻 11
2. 論文標題 Immune checkpoint inhibitor combination therapies very frequently induce secondary adrenal insufficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91032-6	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 Seraki Miyamoto, Tadahiro Yamazaki, Ken Shimizu, Toshio Matsubara, Hidenori Kage, Kousuke Watanabe, Hiroshi Kobo, Yutaka Matsuyama, Gary Rodin, Kazuhiro Yoshiuchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Brief, manualised and semistructured individual psychotherapy programme for patients with advanced cancer in Japan: study protocol for Managing Cancer and Living Meaningfully (CALM) phase 2 trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ open	6. 最初と最後の頁 e056136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjopen-2021-056136	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 Takuma Yotsumoto, Keita Maemura, Kousuke Watanabe, Yosuke Amano, Yoko Matsumoto, Koichi Zokumasu, Takahiro Ando, Masanori Kawakami, Hidenori Kage, Jun Nakajima, Yutaka Yatomi, Takahide Nagase and Daiya Takai	4. 巻 11
2. 論文標題 NRXN1 as a novel potential target of antibody-drug conjugates for small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3590-3600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27718	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 Kousuke Watanabe, Hidenori Kage, Saki Nagoshi, Kazuhiro Toyama, Yoshiyuki Ohno, Aya Shinozaki-Ushiku, Kumi Nakazaki, Hiroshi Suzuki, Mineo Kurokawa, Takahide Nagase	4. 巻 2020
2. 論文標題 Dual EGFR and ABL Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in a Patient with Concomitant EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma and BCR-ABL1-Positive CML	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Rep Oncol Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/4201727	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0件

〔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
---------	---------