

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23964

研究課題名（和文）患者由来肺癌細胞の培養技術を用いた、チロシンキナーゼ阻害薬からの逃避機構の解明

研究課題名（英文）A study on mechanisms underlying the initial survival of tumor cells against tyrosine kinase inhibitors based on patient-derived tumor models and in vivo real-time imaging

研究代表者

辻 貴宏 (Tsuji, Takahiro)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：50850046

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：切除不能な肺癌が薬物治療で根治することはない。効果の高い分子標的薬治療でも、癌細胞は一部が生き残り（初期生存）、いずれ増殖し病勢が再燃する（薬剤耐性）。本研究では患者の癌細胞を大量培養する手法を用いて、ALK陽性肺癌患者3名の癌細胞と、ALK陽性培養細胞H2228をマルチオミクス解析でスクリーニングし、初期生存規定因子を探索し、YAP1を同定した。本研究が予想より早く進んだことで、本研究に含まれていた生体内イメージングを発展させ、転移性脳腫瘍を生体内で観察できるモデルを確立する試みを開始し、系のプロトタイプを完成させるに至った。次の研究課題によってさらに発展させていく計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌の薬剤耐性の研究は盛んに行われてきたが、初期生存の研究は少なく、メカニズムは不明である。完全寛解を目指した集中的な治療法は開発されておらず、進行肺癌に対する薬物治療は、数十年前から緩和化学療法と位置づけられている。本研究は、ALK陽性肺癌の根治を目指した多剤併用療法を検討した最初の研究である。この成果をもとに薬剤開発が進めば、薬によって根治を目指した治療を開発できる可能性があり、その社会的な意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Despite the promising clinical efficacy of the second-generation anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor alectinib in patients with ALK-rearranged lung cancer, some tumor cells survive and eventually relapse, which may be an obstacle to achieving a cure. Limited information is currently available on the mechanisms underlying the initial survival of tumor cells against alectinib. Using patient-derived cell line models, we herein demonstrate that cancer cells survive a treatment with alectinib by activating Yes-associated protein 1 (YAP1), which mediates the expression of the anti-apoptosis factors Mcl-1 and Bcl-xL, and combinatorial inhibition against both YAP1 and ALK provides a longer tumor remission in ALK-rearranged xenografts when compared with alectinib monotherapy. These results suggest that the inhibition of YAP1 is a candidate for combinatorial therapy with ALK inhibitors to achieve complete remission in patients with ALK-rearranged lung cancer.

研究分野：肺癌 転移性脳腫瘍

キーワード：ALK陽性肺癌 薬剤耐性 YAP1 治療抵抗性 治療初期生存 生体イメージング 転移性脳腫瘍 画像解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

EGFR・ALK チロシンキナーゼ阻害薬等の分子標的治療は、EGFR、ALK 遺伝子異常を持つ肺癌の予後を劇的に改善した(N Engl J Med. 2010; 362: 2380-8; Science. 2004; 304: 1497-500.)。しかし多くの患者が治療中に薬剤耐性を獲得し、病状は再燃する。分子標的薬の薬剤耐性機序の研究は盛んにおこなわれ、耐性克服治療が提案されてきた(Nature. 2016; 534, 129-132)。しかし、これらの耐性克服治療に対してさえも新たな耐性機序が誘導され、肺癌は根治に至らない。この問題の解決のため、我々は治療初期に癌細胞の一部が分子標的治療から逃避し生存する現象(治療初期生存)に着目した。分子標的治療から逃避する機構を同定し阻害すれば、耐性を未然に防ぎ、肺癌根治を目指した薬物治療となりえる。研究代表者は研究開始時点で、YAP1-抗アポトーシス経路が、ALK 陽性肺癌の治療からの逃避・生存を仲介する示唆を得ていた。YAP1 は Hippo signaling pathway の主要調節因子で、転写コファクターとして細胞のアポトーシス・増殖を調節し、肝細胞癌の一部では発癌の原因とされる。YAP1 研究の問題点は(1)特異的阻害剤が少ないこと、(2)活性化は転写活性を見る必要があり、評価が容易でない点が挙げられた。

2. 研究の目的

- (1)肺癌患者由来細胞株を用い、YAP1 の阻害が初期生存を抑制する標的として適切か Target Validation を行う。
- (2)YAP1 の活性化がアポトーシス阻害をもたらすメカニズムを解明する。
- (3)*in vivo* において、YAP1 の活性化・抑制を可視化できる実験系を構築する
- (4)上記の実験系を他のドライバー遺伝子陽性肺がんに展開し、YAP1-抗アポトーシス経路が、他のドライバー遺伝子陽性肺癌の初期生存も仲介しているか検討する。

3. 研究の方法

- (1) 研究サンプルの樹立：ドライバー遺伝子異常陽性の肺癌由来培養細胞株を樹立した。
- (2) YAP1 のエフェクターの探索：標的治療を曝露され YAP1 が活性化した患者由来細胞の既知の抗アポトーシス関連因子を qRT-PCR で網羅的に解析した。
- (3) YAP1 のエフェクターの機能解析：YAP1 活性化に伴い発現亢進した因子のコーディング遺伝子の転写開始点前後でプライマーを設計し、YAP1 抗体による ChIP-qPCR を行い YAP1 の DNA への結合を解析した。siRNA を用いて因子のノックダウンを行い、YAP1 阻害と同様の効果が得られるかを確認し、下流を確定した。
- (4) YAP1 の活性化を画像解析によって行った。YAP1 はその細胞内局在(核局在)によってその活性化が評価されるため、画像に対して共局在解析を使うことで、組織標本、細胞の免疫染色の一括した定量的評価を行った。
- (5) YAP1 の活性化を評価するための生体内イメージング系の構築を検討したが、今回の仮

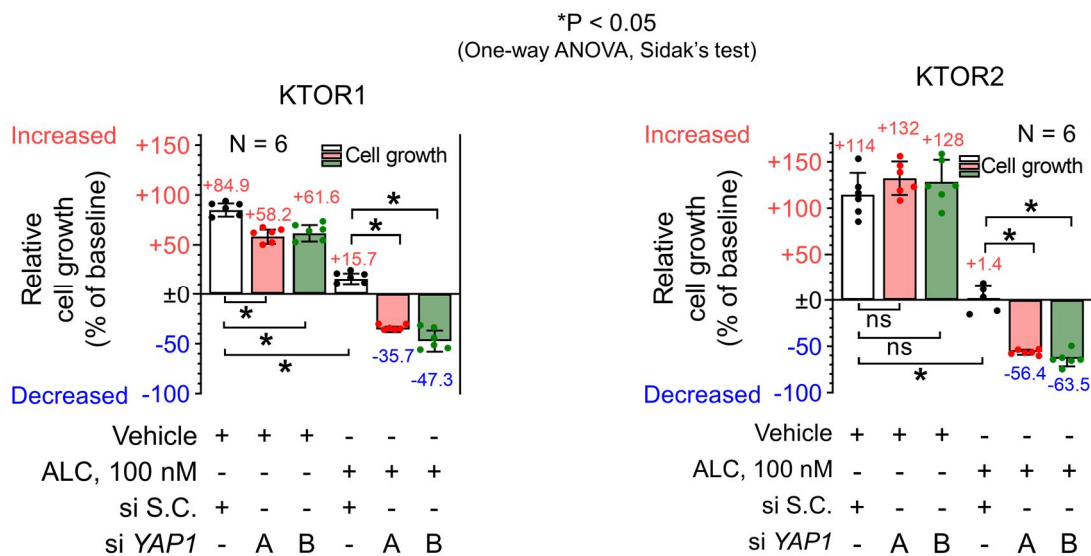
説を証明するためには免疫組織標本で十分であったため、生体内での腫瘍の増殖を二光子顕微鏡下で観察できる系の構築を開始した。結果、転移性腫瘍を生体内で可視化する系のプロトタイプを完成させた。

4. 研究成果

(1)本研究課題以前に研究代表者は ALK 陽性肺癌患者より胸水を採取し、EML-ALK 融合遺伝子を持つ肺癌由来細胞株を 3 株樹立していた。この患者由来細胞株に分子標的薬アレクチニブを曝露すると、がん細胞の増殖は低下するものの、がん細胞の致死誘導には至らず、細胞の多くは生存する（初期生存）。その際、癌細胞中の YAP1 が核内移行し、活性化していることを示した。そこで YAP1 の遺伝学的阻害（siRNA）や薬理的阻害（Verteporfin）をアレクチニブと併用すると、「初期生存」と考えられる現象が減少し、癌細胞の生存率を著しく低下させるという知見を得た。

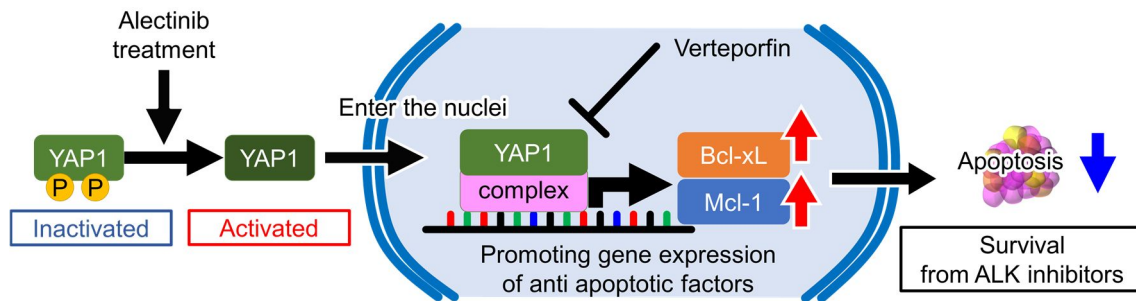
図(1):患者由来細胞 KTOR1 と KTOR2 の薬剤曝露中の生存率

KTOR1, KTOR2 ともに、アレクチニブ（ALC）を曝露することで、72 時間の細胞の増殖率は著しく低下する（KTOR1: +15.7%, KTOR2: +1.4%）。ここに YAP1 の同時阻害を追加すると、細胞は減少する（右 2 列が ALK 阻害剤 ALC と YAP1 阻害の併用に該当）



(2)YAP1 の活性化がアポトーシス阻害をもたらすメカニズムを解明するため、アポトーシス関連蛋白のスクリーニングを PCR 法で行い、ChIP 法を用いて確定した。結果、ALK 陽性肺癌細胞は ALK 阻害剤に曝露された際、YAP1 が活性化し核内に移行し、抗アポトーシス蛋白 *BCLXL* と *MCL1* の遺伝子座上流に結合すること、またその転写を活性化することを示した。

図(2):ALK 阻害剤 Alectinib で曝露時における、がん細胞での生存パスウェイ



(3) 癌細胞を生体内で観察する系の構築

経頸動脈的にマウス肺癌細胞をマウスに投与し、転移性脳腫瘍を形成するモデルを作製した。さらに、それらを可視化するモデルのプロトタイプを完成させた。

この研究成果をもとに現在も研究継続中であり、下記の研究課題に引き継がれた。

- ・ 日本学術振興会特別研究員 PD

課題名：転移性脳腫瘍の予防治療開発を目指した、生体内イメージング系の構築と解析

- ・ 日本学術振興会 科学研究費補助金 若手研究

課題名：脳内における肺癌細胞の排除を規定するメカニズムの可視化と同定

(4)他のドライバー遺伝子変異における検討：上記の実験系を用い、共同研究者が BRAF 遺伝子変異陽性肺癌、ROS1 遺伝子陽性肺癌における初期生存と YAP1 の関係について引き続き検討を行っている。

受賞

2020年 奨励賞．NPO 法人西日本呼吸器内科医療推進機構．

2020年 若手奨励賞．日本肺癌学会．

2021年 Scholar-in-Training Award．米国癌学会．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 74
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 -

1. 著者名 Funazo Tomoko, Tsuji Takahiro, Ozasa Hiroaki, Furugaki Koh, Yoshimura Yasushi, Oguri Tetsuya, Ajimizu Hitomi, Yasuda Yuto, Nomizo Takashi, Sakamori Yuichi, Yoshida Hironori, Kim Young Hak, Hirai Toyohiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Acquired Resistance to Alectinib in ALK-Rearranged Lung Cancer due to ABCC11/MRP8 Overexpression in a Clinically Paired Resistance Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1320 ~ 1327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0649	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 Yasuda Yuto, Ozasa Hiroaki, Kim Young Hak, Yamazoe Masatoshi, Ajimizu Hitomi, Yamamoto Funazo Tomoko, Nomizo Takashi, Tsuji Takahiro, Yoshida Hironori, Sakamori Yuichi, Nakajima Naoki, Menju Toshi, Yoshizawa Akihiko, Date Hiroshi, Hirai Toyohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 MCL1 inhibition is effective against a subset of small-cell lung cancer with high MCL1 and low BCL-XL expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2379-2	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Hiroaki Ozasa, Koichiro Haruwaka, Hitomi Ajimizu, Yuto Yasuda, Yuichi Sakamori, Takashi Nomizo, Young Hak Kim and Toyohiro Hirai
2. 発表標題 Real-time visualization of brain metastasis in vivo
3. 学会等名 AACR annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Ozasa, Wataru Aoki, Shunsuke Aburaya, Tomoko Funazo, Koh Furugaki, Yasushi Yoshimura, Hitomi Ajimizu, Yuto Yasuda, Takashi Nomizo, Yuichi Sakamori, Hironori Yoshida, Mitsuyoshi Ueda, Young Hak Kim and Toyohiro Hirai
2. 発表標題 YAP1 mediates initial survival of alectinib therapy in ALK-rearranged lung cancer via pro-apoptotic protein regulation
3. 学会等名 AACR annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻貴宏、和氣弘明、小笹裕晃、進藤麻理子、味水瞳、山添正敏、安田有斗、阪森優一、野溝岳、金永学、平井豊博
2. 発表標題 転移性脳腫瘍の可視化モデル
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Koichiro Haruwaka, Hitomi Ajimizu, Masatoshi Yamazoe, Tomoko Funazo, Yuto Yasuda, Hironori Yoshida, Yuichi Sakamori, Young Hak Kim, Hiroaki Ozasa and Toyohiro Hirai
2. 発表標題 Novel in vivo imaging method to evaluate "Don't eat me" signal of tumor against microglia.
3. 学会等名 AACR annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻貴宏、和氣弘明、進藤麻理子、山添正敏、味水瞳、安田有斗、船造智子、吉田博徳、阪森優一、金永学、加藤大輔、小笹裕晃、平井豊博
2. 発表標題 Novel in vivo imaging method to evaluate "Don't eat me" signal of tumor against microglia.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Daisuke Kato, Hiroaki Ozasa, Toyohiro Hirai
2. 発表標題 Real time in vivo imaging of brain metastasis visualized dynamic reaction of microglia against cancer cells.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Daisuke Kato, Hiroaki Ozasa, Toyohiro Hirai
2. 発表標題 転移性脳腫瘍の生体内可視化はミクログリアと癌細胞の相互作用の多様さを明らかにする.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Tsuji, Hiroaki Wake, Mariko Shindo, Daisuke Kato, Hiroaki Ozasa, Toyohiro Hirai
2. 発表標題 Real time in vivo imaging of brain metastasis visualized dynamic reaction of microglia against cancer cells.
3. 学会等名 AACR Virtual Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻貴宏、小笹裕晃、青木航、油屋駿介、船造智子、山添正敏、味水瞳、安田有斗、野溝岳、吉田博徳、阪森 優一、和氣弘明、植田充美、平井豊博、金永学
2. 発表標題 YAP1は抗Apoptosis因子Mcl-1とBcl-xLの発現調節を介して、ALK陽性肺癌細胞の初期生存を仲介する
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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