

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03771

研究課題名（和文）ドライバー遺伝子陽性肺癌が依存するパスウェイを標的とした次世代精密医療の開発

研究課題名（英文）Development of next-generation precision medicine targeting the pathways on which driver gene mutation-positive lung cancer depends

研究代表者

富田 秀太 (Tomida, Shuta)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：10372111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：治療抵抗性を示すEGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株の耐性獲得メカニズムとして知られている上皮間葉転換（EMT）を標的としてドラッグリポジショニングを行い、抗EMT作用が示唆されるモネンシンを抽出した。肺癌細胞株を用いた検討において、モネンシンを添加することで、オシメルチニブに対する耐性を抑制できることを確認した。またEgfr遺伝子変異を有するマウス肺癌モデルを用いて、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬を用いた治療により、CD8陽性T細胞/制御性T細胞比率が高まり、免疫に関与するケモカイン等の遺伝子発現が亢進していることや、腫瘍微小環境においてM2様マクロファージが亢進していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト肺癌細胞株を用いて、モネンシンの抗EMT効果を確認し、モネンシン添加によるオシメルチニブ耐性獲得抑制を確認した。この結果は、モネンシンを用いた併用療法の可能性を示している。またEGFR exon-19欠損遺伝子変異を有するマウスシジエック肺癌モデルを用いて、PD-1阻害薬とVEGF受容体阻害薬をEGFR-TKI後に併用することで、CD8陽性T細胞の誘導を高めることを見出した。しかし、EGFR-TKI、PD-1阻害薬とVGR受容体阻害薬の3剤を同時に使用した場合には、このCD8陽性T細胞の誘導は見られなかった。これらの結果は、治療のスケジュールが極めて重要になることを示している。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is known to be one of the resistance acquisition mechanisms in treatment-resistant EGFR mutation-positive lung cancer cell lines. We performed drug repositioning analysis, targeting the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and extracted monensin, which is suggested to have an anti-EMT effect. In studies using lung cancer cell lines, it was confirmed that the addition of monensin can suppress resistance to osimertinib. Using an Egfr-mutated mouse lung cancer model, we found that treatment with an EGFR tyrosine kinase inhibitor increased the ratio of CD8-positive T cells to regulatory T cells. Furthermore, we clarified that the expression of genes such as chemokines involved in immunity is enhanced, and that M2-like macrophages are enhanced in the tumor microenvironment.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：バイオインフォマティクス 肺癌 遺伝子発現データ解析 パスウェイ解析 耐性

## 1. 研究開始当初の背景

EGFR、ALK 等のドライバー遺伝子変異の解析とドライバー遺伝子変異を標的とした分子標的治療薬の開発成功があいまって、肺がん治療に革命がもたらされたことにはや疑念の余地はない。2002年のゲフィチニブ (EGFR のチロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI)) 承認時、全ての非小細胞肺癌を対象とした奏効率は 27.5%であったが、2004年に EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌にゲフィチニブが有効であることが証明された結果、EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌のみを対象にした奏効率は 71.2% (IPASS 試験のサブ解析) と大幅に向上し、今日のがんゲノム医療につながっている。

しかしながら、未だにその奏効率は 100%に到達しておらず、ドライバー遺伝子変異陽性肺がんでありながら、治療抵抗性を示す症例が存在している。第 3 世代の EGFR-TKI が開発された今日、EGFR 遺伝子変異陽性の肺腺がんを対象とした奏効率は約 80% (MSK-IMPACT による 860 症例の解析結果, 2017) であるが、5 人に 1 人の割合で治療が奏功していない。5 年生存率が 31.9% (地域がん登録 2006-2008 年診断例) と膵臓がん (7.7%)、胆のう胆管がん (22.5%) に続くワースト 3 である肺がんの治療成績の向上には、治療抵抗性を示すドライバー遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌症例が依存するがん化パスウェイを明らかにし、その依存性パスウェイを狙い撃ちする次世代精密医療の開発が不可欠となっている。

申請者グループは、RNA-Seq を用いて遺伝子発現プロファイルを取得し、各がん化パスウェイに含まれる遺伝子ごとに Z 値を算出。その平均値をもとに依存度の高いがん化パスウェイを抽出するパイプラインを開発している。また申請者らは、いち早くドラッグリポジショニング解析手法の重要性に着目し、予後不良シグナルに効果的な薬剤の選択をおこない、向精神薬のプロクロペラジンやポリフェノール的一种レズベラトロールの抗腫瘍効果を確認している。

## 2. 研究の目的

申請者グループは、遺伝子発現レベルで活性化している治療抵抗性症例が依存するがん化パスウェイを抽出し、ドラッグリポジショニング解析を実施し依存性パスウェイを標的とした薬剤を探索することにより、治療抵抗性を示すドライバー遺伝子変異陽性の肺がん症例が依存するパスウェイを狙い撃ちする薬剤併用療法を検討する。これにより、ドライバー遺伝子変異に大きく依存した治療法には抵抗性をしめす肺がん症例にも治療効果が期待できる次世代型の精密医療の基盤を開発する。

## 3. 研究の方法

①治療耐性獲得メカニズムである上皮間葉転換 (EMT) を標的としたがん化パスウェイの探索  
治療抵抗性を示す EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞株の耐性獲得メカニズムとして知られている上皮間葉転換 (EMT) を標的としてドラッグリポジショニングを行い、抗 EMT を目的としたがん化パスウェイの抽出と活性化について検討する

②EGFR 遺伝子変異陽性肺がんをモデルとしたがん化パスウェイの探索  
EGFR 遺伝子変異を有する肺がんモデルを用いて、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) を用いた治療群とコントロール群の遺伝子発現パターンを解析することにより、EGFR-TKI 抵抗性を示すがん化パスウェイを抽出する。

## 4. 研究成果

①治療耐性獲得メカニズムである上皮間葉転換 (EMT) を標的としたがん化パスウェイの探索  
治療抵抗性を示す EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞株の耐性獲得メカニズムとして知られている上皮間葉転換 (EMT) を標的としてドラッグリポジショニングを行った。具体的には、大規模癌細胞株データベース (CCLE) から、肺癌細胞株を抽出し、E-cadherin や Vimentin といった EMT マーカーの発現パターンを用いて、上皮様細胞株 12 種類と間葉様細胞株 16 種類を抽出した (図 1 A)。Gene set enrichment analysis (GSEA) 解析により、EMT が特徴的なパスウェイとして抽出されることを確認し (図 1 B)、この網羅的な遺伝子発現パターンを用いて、Connectivity-map (C-map) を用いたドラッグリポジショニング解析を実施し、抗 EMT 作用が示唆される薬剤リストを作成することに成功した。その中から、抗 EMT 作用に関する機能解明が十分ではないモネンシンを対象として以下の実験を行った (図 1 C-D)。

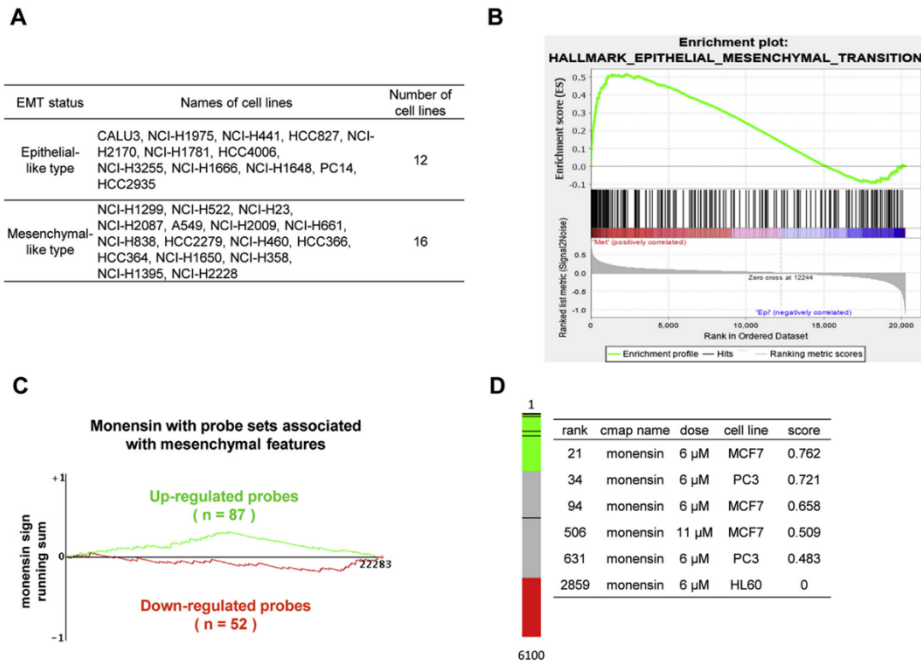


図1 A)上皮様細胞株12種類と間葉様細胞株16種類、B)GSEA解析結果、C-D) Connectivity-map (C-map)を用いたドラッグリポジショニング解析

EGFR 遺伝子変異陽性の HCC827 株と H1975 株を用いて、抗 EMT 効果を確認することをを行った。EMT を誘導することが知られている TGF- $\beta$  を用いて、HCC827 株と H1975 株において EMT が誘導されることを確認した後、モネンシンを併用することにより EMT を抑制することを確認した (図 2 A)。さらに、TGF- $\beta$  を用いて誘導された EMT により第 3 世代の抗 EGFR 薬剤であるオシメルチニブに対する耐性を獲得することを、HCC827 株と H1975 株において確認した後 (図 2 B)、モネンシンを添加することで、オシメルチニブに対する耐性を抑制できることが確認できた (図 2 C)。またモネンシン添加によるアポトーシスを確認した (図 2 D) これらの結果は、モネンシンを用いた併用療法により、抗 EGFR 薬剤に対する耐性獲得メカニズムの 1 つである EMT の抑制を通して、耐性獲得を抑制する可能性を示している。

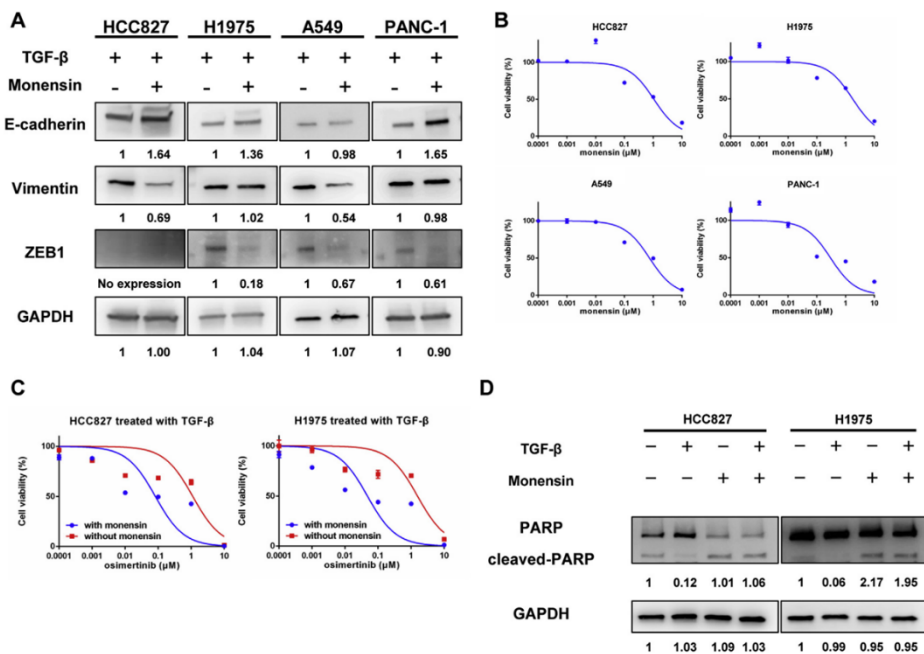


図2 A)モネンシン併用によるEMT抑制、B) TGF- $\beta$ 誘導EMTによるオシメルチニブ耐性獲得、C)モネンシン添加によるオシメルチニブ耐性抑制、D)モネンシン添加によるアポトーシス誘導

②EGFR 遺伝子変異陽性肺がんをモデルとしたがん化パスウェイの探索

ドライバー遺伝子変異として *Egfr* exon-19 欠損遺伝子変異を有する肺がんマウスモデルを解析対象として、肺がん組織と正常肺を比較したところ、肺がん組織では T 細胞や B 細胞に関連する遺伝子パスウェイが抑制されていることを確認した (図 3 A)。EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) を用いた治療により、腫瘍の増殖抑制効果がみられることを確認し (図 3 B)、さらに CD8 陽性 T 細胞が誘導されることを見出した (図 3 C)。このとき、CD8 陽性 T 細胞に関連する遺伝子発現の誘導も確認している (図 3 D)。

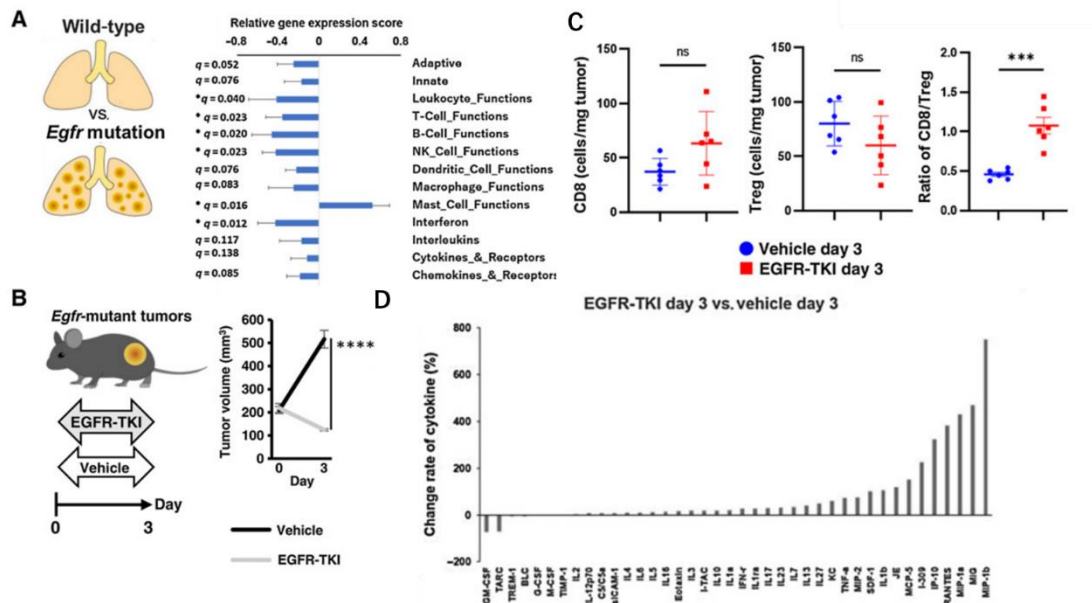


図 3 A) 肺がん組織では T 細胞や B 細胞に関連する遺伝子パスウェイが抑制されている、B) EGFR-TKI による腫瘍増殖抑制、C) EGFR-TKI 治療による CD8 陽性 T 細胞の誘導、D) CD8 陽性 T 細胞関連遺伝子発現の更新

PD-1 阻害薬と VEGF 受容体阻害薬を EGFR-TKI 後に併用することで、腫瘍浸潤性の CD8 陽性 T 細胞が増加することも確認しており、これらの結果は、治療薬の投薬スケジュールが極めて重要になることを示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Inoue Hirofumi, Tomida Shuta, Horiguchi Shigeru, Kato Hironari, Matsuoka Hiromi, Sanehira Etsuko, Matsuoka Masashi, Yanai Hiroyuki, Hirasawa Akira, Toyooka Shinichi	4. 巻 71
2. 論文標題 Best practices for the extraction of genomic DNA from formalin fixed paraffin embedded tumor tissue for cancer genomic profiling tests	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 360 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13086	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 Shi Hanxiao, Niimi Atsuko, Takeuchi Toshiyuki, Shiogama Kazuya, Mizutani Yasuyoshi, Kajino Taisuke, Inada Kenichi, Hase Tetsunari, Hatta Takahiro, Shibata Hirofumi, Fukui Takayuki, Chen Yoshikawa Toyofumi Fengshi, Nagano Kazuki, Murate Takashi, Kawamoto Yoshiyuki, Tomida Shuta, Takahashi Takashi, Suzuki Motoshi	4. 巻 112
2. 論文標題 CEBP facilitates lamellipodia formation and cancer cell migration through CERS6 upregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2770 ~ 2780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14928	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 Miura Akihiro, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Tomida Shuta, Shimizu Dai, Jiang Yan, Takao Tomoka, Yamamoto Hiromasa, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Yamane Masaomi, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi, Takarada Takeshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Oncogenic potential of human pluripotent stem cell derived lung organoids with HER2 overexpression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1593 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33713	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 Nakamura Makoto, Meguri Yusuke, Ikegawa Shuntaro, Kondo Takumi, Sumii Yuichi, Fukumi Takuya, Iwamoto Miki, Sando Yasuhisa, Sugiura Hiroyuki, Asada Noboru, Ennishi Daisuke, Tomida Shuta, Fukuda-Kawaguchi Emi, Ishii Yasuyuki, Maeda Yoshinobu, Matsuoka Ken-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduced dose of PTCy followed by adjuvant -galactosylceramide enhances GVL effect without sacrificing GVHD suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-92526-z	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 Oo May Wathone, Kawai Hotaka, Takabatake Kiyofumi, Tomida Shuta, Eguchi Takanori, Ono Kisho, Shan Qiusheng, Ohara Toshiaki, Yoshida Saori, Omori Haruka, Sukegawa Shintaro, Nakano Keisuke, Okamoto Kuniaki, Sasaki Akira, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Resident stroma-secreted chemokine CCL2 governs myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	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) 10.1172/jci.insight.148960	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 Ochi Kosuke, Suzawa Ken, Tomida Shuta, Shien Kazuhiko, Takano Jui, Miyauchi Shunsaku, Takeda Tatsuaki, Miura Akihiro, Araki Kota, Nakata Kentaro, Yamamoto Hiromasa, Okazaki Mikio, Sugimoto Seiichiro, Shien Tadahiko, Yamane Masaomi, Azuma Kazuo, Okamoto Yoshiharu, Toyooka Shinichi	4. 巻 529
2. 論文標題 Overcoming epithelial-mesenchymal transition-mediated drug resistance with monensin-based combined therapy in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 760 ~ 765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.077	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 Hayashi H, Takiguchi Y, Minami H, Akiyoshi K, Segawa Y, Ueda H, Iwamoto Yasuo, Kondoh Chihiro, Matsumoto Koji, Takahashi Shin, Yasui Hisateru, Sawa Toshiyuki, Onozawa Yusuke, Chiba Yasutaka, Togashi Yosuke, Fujita Yoshihiko, Sakai Kazuko, Tomida Shuta, Nishio Kazuto, Nakagawa Kazuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Site-Specific and Targeted Therapy Based on Molecular Profiling by Next-Generation Sequencing for Cancer of Unknown Primary Site	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JAMA Oncology	6. 最初と最後の頁 1931 ~ 1931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaoncol.2020.4643	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 Suzuki M, Cao K, Kato S, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Nakatani N, Yanagisawa K, Takeuchi T, Shi H, Mizutani Y, Niimi A, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Tamiya Koizumi K, Murate T, Kyogashima M, Tomida S, Takahashi T	4. 巻 24
2. 論文標題 CERS6 required for cell migration and metastasis in lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 11949 ~ 11959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.15817	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 Nakadai Masakazu, Tomida Shuta	4. 巻 60
2. 論文標題 Diameter Is a Key 3D Characteristic for Assessments of Efficient Inhibitors of Protein-Protein Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 4785 ~ 4790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.0c00607	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 MIYAUCHI SHUNSAKU, SHIEN KAZUHIKO, TAKEDA TATSUAKI, ARAKI KOTA, NAKATA KENTARO, MIURA AKIHIRO, TAKAHASHI YUTA, KURIHARA EISUKE, OGOSHI YUSUKE, NAMBA KEI, SUZAWA KEN, YAMAMOTO HIROMASA, OKAZAKI MIKIO, SOH JUNICHI, TOMIDA SHUTA, YAMANE MASAOMI, SAKAGUCHI MASAKIYO, TOYOOKA SHINICHI	4. 巻 40
2. 論文標題 Antitumor Effects of Pan-RAF Inhibitor LY3009120 Against Lung Cancer Cells Harboring Oncogenic BRAF Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2667 ~ 2673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14237	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 Nishii K, Ohashi K, Tomida S, Nakasuka T, Hirabae A, Okawa S, Nishimura J, Higo H, Watanabe H, Kano H, Ando C, Makimoto G, Ninomiya K, Kato Y, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Udono H, Maeda Y, Kiura K	4. 巻 10
2. 論文標題 CD8+ T-cell Responses Are Boosted by Dual PD-1/VEGFR2 Blockade after EGFR Inhibition in <i>Egfr</i> -Mutant Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1111 ~ 1126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-21-0751	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 Ohki Daisuke, Yamamichi Nobutake, Sakaguchi Yoshiki, Takahashi Yu, Kageyama Yahara Natsuko, Yamamichi Mitsue, Takeuchi Chihiro, Tsuji Yosuke, Sakai Yasuhiro, Sakurai Kouhei, Tomida Shuta, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome of sessile serrated adenoma/polyps is associated with <i>MSI</i> high colorectal cancer and decreased expression of <i>CDX2</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 5066 ~ 5078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4810	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 Ochi Kosuke, Suzawa Ken, Thu Yin Min, Takatsu Fumiaki, Tsudaka Shimpei, Zhu Yidan, Nakata Kentaro, Takeda Tatsuaki, Shien Kazuhiko, Yamamoto Hiromasa, Okazaki Mikio, Sugimoto Seiichiro, Shien Tadahiko, Okamoto Yoshiharu, Tomida Shuta, Toyooka Shinichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Drug repositioning of tranilast to sensitize a cancer therapy by targeting cancer associated fibroblast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3428 ~ 3436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15502	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 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富田秀太
2. 発表標題 がんゲノム医療提供体制と 遺伝子パネル検査実施体制の概要
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田秀太
2. 発表標題 バイオインフォマティクスの立場から肺がん診療における遺伝子パネル検査の利活用方法について
3. 学会等名 日本肺癌学会学術集会 (招待講演)
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
研究分担者	豊岡 伸一 (Toyooka Shinichi) (30397880)	岡山大学・医歯薬学域・教授  (15301)	



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
研究分担者	山本 寛斉  (Yamamoto Hiromasa)  (40467733)	岡山大学・大学病院・講師    (15301)	
研究分担者	大橋 圭明  (Ohashi Kadoaki)  (60729193)	岡山大学・大学病院・研究准教授    (15301)	
研究分担者	諏澤 憲  (Suzawa Ken)  (90839713)	岡山大学・大学病院・助教    (15301)	
研究分担者	山本 英喜  (Yamamoto Hideki)  (10581697)	岡山大学・医歯薬学域・講師    (15301)	

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