

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07691

研究課題名(和文) SWI/SNF異常を有する固形がんに対するEZH2阻害療法の最適化

研究課題名(英文) Optimization of treatment strategy with EZH2 inhibitor for solid cancer with SWI/SNF alteration

研究代表者

木下 一郎 (Kinoshita, Ichiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：40343008

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)：SWI/SNF異常を有する細胞を主体とした肺癌細胞で、HDAC阻害薬によるエピジェネティクス標的治療の抗腫瘍効果が、CDK4/6阻害薬との併用で相乗的に増強した。同併用療法において、相乗効果の見える細胞に共通に高発現しているエフェクター分子の候補が同定された。また、SWI/SNFの主要構成因子であるSMARCA4遺伝子の変異を有する肺癌細胞は、clone増殖能がMTOR経路に依存し、MTOR阻害薬による高い抗腫瘍効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EZH2阻害薬を含むエピジェネティクスを標的とした治療の固形腫瘍における有効性は限定的である。本研究では、固形腫瘍全体で20%を占めるエピジェネティクス関連因子SWI/SNF複合体に着目して、エピジェネティクス治療の改善を目指した。SWI/SNFの異常を有する固形腫瘍を主体として、HDAC阻害薬によるエピジェネティクス標的治療の効果が、CDK4/6阻害薬との併用で、相乗的に増強する可能性が示唆された。また、SWI/SNFの主要構成因子であるSMARCA4変異陽性腫瘍において、MTOR阻害薬の治療効果が高く、エピジェネティクスを標的とする治療との併用薬の候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of epigenetics-targeted therapy with HDAC inhibitors was synergistically enhanced in combination with CDK4/6 inhibitors in lung cancer cells, mainly those with SWI/SNF abnormalities. We identified candidate effector molecules highly expressed in cells showing synergistic effects of the combination therapy. In addition, lung cancer cells with mutant SMARCA4, a major component of SWI/SNF, showed clonal growth ability dependent on the MTOR pathway and high growth inhibition by MTOR inhibitors.

研究分野：腫瘍内科学、がんゲノム医療学

キーワード：エピジェネティクス SWI/SNF SMARCA4 HDAC inhibitor CDK4/6 inhibitor MTOR everolimus EZH2

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はポリコム抑制複合体 2 (PRC2) に属する H3K27 トリメチル化酵素 EZH2 が肺癌でしばしば過剰発現し、術後非小細胞肺癌の独立した予後不良因子であることを初めて報告し (Kikuchi, Kinoshita et al. Cancer 2010) EZH2 阻害薬が種々の肺癌細胞の増殖を in vitro および in vivo で抑制すること (Kikuchi, Kinoshita et al. Lung Cancer 2012) その抗腫瘍効果はヒストンアセチル化酵素 HDAC 阻害薬の SAHA と相加・相乗的であること (Takashina, Kinoshita et al. Cancer Sci 2016) を示してきた。

最近、他のエピジェネティック制御機構であるクロマチンリモデリングを担う SWI/SNF 複合体が、EZH2 の H3K4 トリメチル化によって抑制される標的遺伝子を活性化し、EZH2 の発現自体も抑制すること、SWI/SNF のコアサブユニットである SNF5 の機能欠失変異が EZH2 の幹細胞プログラムに関わる標的遺伝子を活性化し、がん化誘導することが報告された (Wilson et al. Cancer Cell 2010) 。さらに、in vivo での SNF5 の機能欠失による腫瘍形成は、EZH2 阻害薬によって抑制された。すなわち、SWI/SNF と EZH2 はエピジェネティックな拮抗作用を有していると考えられた。

SWI/SNF には 20 を超えるサブユニットがあるが、触媒サブユニットである SMARCA2/4 変異を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞、cBAF 特異的サブユニットである ARID1A 変異を有する卵巣明細胞癌細胞 (OCCC) を用いた研究などから、多くの SWI/SNF サブユニットの変異が SWI/SNF の機能を破壊し、EZH2 の標的遺伝子への動員を引き起こすことが示された。網羅的なゲノム解析が進み、SWI/SNF の何らかのサブユニットの変異が、すべてのヒト腫瘍の 20% 近くに達することが明らかとなり、EZH2 の活性化変異がまれな固形がん全般において、EZH2 阻害薬の効果予測バイオマーカーとしての期待が高まった。固形がんを対象とした EZH2 阻害薬 tazometostat の第 II 相試験が行われ、SNF5 または SMARCA4 発現陰性の固形腫瘍 13 例中 2 例に PR、3 例に長期 SD が得られたが、両者とも発現陽性の 30 例では臨床的有用性は長期 SD の 1 例のみであった (Italiano et al, Lancet Oncol 2018) 。

以上より、固形腫瘍全体で 20% を占める SWI/SNF サブユニットの変異・欠失の EZH2 阻害療法のバイオマーカーとしての意義が示される一方、現時点での有効性は限定的である。EZH2 阻害療法がより有効となる併用療法やバイオマーカーが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、SWI/SNF 異常に対する EZH2 阻害療法の最適化を目的とする。SWI/SNF はサブユニットの構成成分により H3K27ac、H3K4me1、H3K4me3 が存在するエンハンサーやプロモーターに結合する。H3K4me3 が KDM5 によって脱メチル化されると、がん抑制に関わる標的遺伝子が転写抑制され、幹細胞プログラムが活性化することが知られている。SWI/SNF のプロモーターにおける H3K4me3 との結合性を踏まえ、KDM5 は SWI/SNF とエピジェネティックな拮抗作用を有している可能性があり、SWI/SNF 異常を有する腫瘍細胞に対する EZH2 阻害薬と KDM5 阻害薬との併用療法の有効性を検討する。なお、KDM5 との併用効果が得られない場合は、EZH2 阻害薬以外を含めたエピジェネティクス治療薬と分子標的治療薬の併用効果を検討する。また、治療効果を高める SWI/SNF の状態と併用療法に関する検討を行う。

3. 研究の方法

(1) SWI/SNF 異常を有する細胞 (A549, H460, H1299) と有さない腫瘍細胞 (PC9) を用いて、EZH2 阻害薬 tazometostat と KDM5 阻害薬 (PBIT または CPI-455) の抗腫瘍効果を clonogenic 法で検討した。

(2) EZH2 阻害薬以外を含めたエピジェネティクス治療薬と分子標的薬の併用療法の有効性を clonogenic 法で検討した。

(3) 有効な併用療法について soft agarose 法での効果を検討した。

(4) 遺伝子変異や RNA 発現データを Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) から入手し、相乗効果を認めた細胞グループと認めなかった細胞グループでの違いを比較した。

(5) SWI/SNF の主要因子である SMARCA4 に着目し、SMARCA4 変異陽性肺がん細胞 (H520, H1299) と同変異陰性肺がん細胞 (H1975, PC9, H460) の RNA 発現データを CCLE から入手し、2 つの細胞グループで Gene Set Enrichment 解析を行った。SMARCA4 変異陽性細胞で発現亢進が認められた MTOR 経路の阻害薬 everolimus の抗腫瘍効果を Clonogenic 法および Soft agarose 法で検討した。

4. 研究成果

(1) SWI/SNF 遺伝子異常を有する肺癌細胞株 A549、H1299、H460 と、SWI/SNF 異常を有さない PC9 を用いて、EZH2 阻害薬 Tazometostat と KDM5 阻害薬 PBIT または CPI455 の併用効果を clonogenic 法で検討したが、いずれの細胞株も両薬剤に感受性を示さなかった。

(2) PBIT または CPI455 と、他のエピジェネティクスを標的とする HDAC 阻害薬 SAHA を用いて検

討したところ、いずれの細胞も SAHA に感受性を示したが、PBIT または CPI455 との相乗効果を認めなかった。

(3) HDAC 阻害薬は、サイクリン E/CDK2 ならびにサイクリン D/CDK4/6 複合体の活性を阻害する p21 の発現を増強することが知られているため、HDAC 阻害薬 SAHA と CDK4/6 阻害薬 Palbociclib との併用効果を、上記細胞を含めた 9 種類の細胞で検討したところ、5 種類の細胞 H1299, H460, A549, H1915, H2444 で相乗効果が認められた。4 種類の細胞株 H226, H2291, H441, HARA には相乗効果を認めなかった。SWI/SNF の異常は相乗効果を示した 3 種類の細胞 (H1299, H460, A549) に認められた。両薬剤の相乗効果を soft agarose 法によるクローン形成能によって解析した。Clonogenic 法と同様、5 種類の細胞 H1299, H460, A549, H1915, H2444 に相乗効果を認め、4 種類の細胞 H226, H2291, H441, HARA には認めなかった (図 1)。

なお、Tazemetostat, PBIT または CPI455 と、Palbociclib との間に相乗効果は認められなかった。

(4) 遺伝子変異や RNA 発現データを Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) から入手し、相乗効果を認めた細胞グループと認めなかった細胞グループでの違いを比較した。相乗効果のある 5 細胞株の中 4 細胞株に共通する遺伝子変異を 4 つ認めたが、全てに共通する遺伝子異常は認めなかった。一方、RNA 発現について Volcano plot で検討したところ、相乗効果の有無により発現比の顕著な遺伝子を複数認めた (図 2)。このうち、相乗効果のある細胞株全てに高発現している遺伝子 (Gene X) も見出された (図 3)。

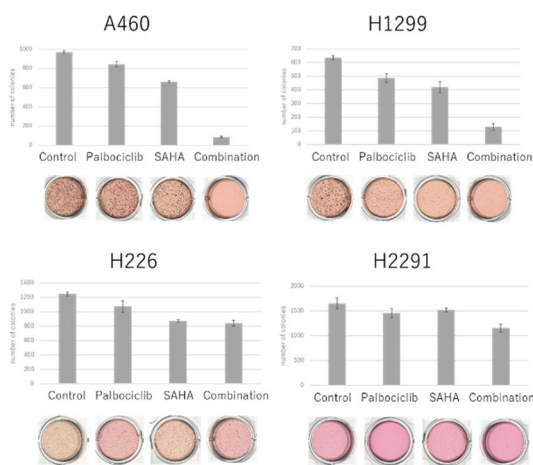


図1 HDAC阻害薬SAHAとCDK4/6阻害薬Palbociclibによる colony抑制効果 (soft agarose法) (Representative cases)。上段: 相乗効果あり 下段: 相乗効果なし

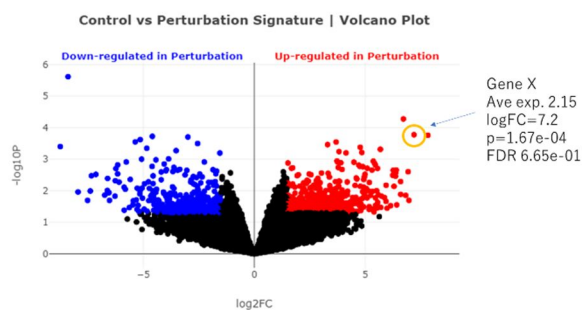


図2 CCLEで公表されている各細胞株のRNAseqのデータを元にしたVolcano plot解析。Control: H226, H2291, H441, HARA。Perturbation: A549, H460, H1299, H1915, H2444

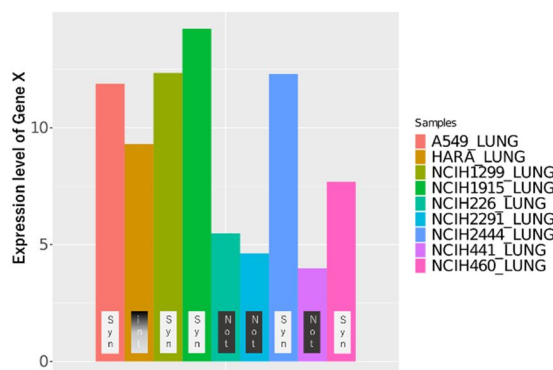


図3 相乗効果を有する細胞と有さない細胞におけるGene Xの発現量

(5) MTOR 経路 (TSC1/TSC2 または MTOR) に遺伝子変異がある固形腫瘍に対する MTOR 阻害薬 everolimus の第 11 相試験のバイオマーカー解析の結果に着目した (Clin Cancer Res 2021;27:3845-53)。奏効例は 30 例中 2 例のみで、その両者に SWI/SNF の主要因子である SMARCA4 の遺伝子変異を認めた。一方、非奏効例 28 例における同変異は 1 例のみであり、SMARCA4 の遺伝子変異が everolimus の効果予測バイオマーカーとなる可能性があると考えられた。当院で保有する SMARCA4 変異陽性肺がん細胞 (H549, H1299) と同変異陰性肺がん細胞 (H1975, PC9, H460) の RNA 発現データを CCLE から入手し、2 つの細胞グループで MTOR 経路の Gene set enrichment 解析を行ったところ、SMARCA4 変異陽性細胞で、MTOR 経路の発現亢進が認められた (図 4)。

Clonogenic 法および Soft agarose 法で、everolimus の抗腫瘍効果の検討を行ったところ、H549 と H1299 では everolimus 10nM 以下でコロニー形成が抑制されたが、H1975、PC9 および H460 では 100nM においても抑制されなかった (図 5)。

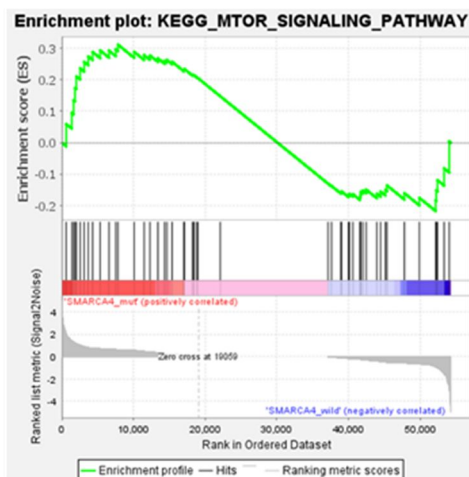


図4 MTOR経路のGene set enrichment 解析。SMARCA4変異陽性細胞 (H549, H1299) と SMARCA4野生型細胞 (H1975, PC9, H460) で比較した。

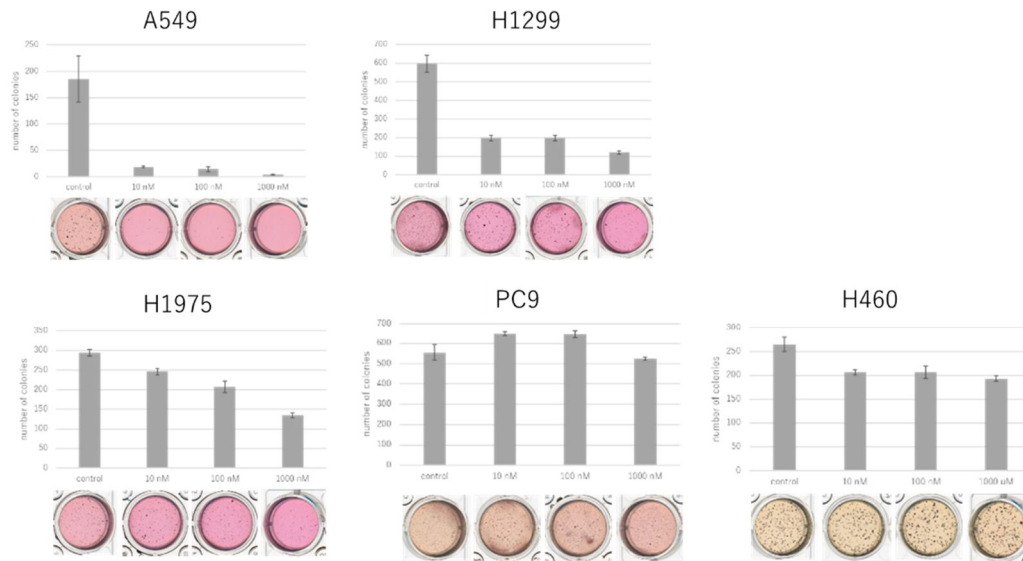


図5 everolimus単剤によるcolony抑制効果 (soft agarase法)
 上段: SMARCA4変異陽性細胞 (A549, H1299) 下段: SMARCA4野生型細胞 (H1975, PC9, H460)

以上より、SWI/SNF異常を有する細胞を主体とした肺癌細胞で、HDAC阻害薬によるエピジェネティクス標的治療の抗腫瘍効果が、CDK4/6阻害薬との併用で相乗的に増強する可能性が示唆された。同併用療法において、相乗効果の見られる細胞に共通に高発現しているエフェクター分子の候補が同定された。また、SWI/SNFの主要因子であるSMARCA4遺伝子の変異を有する肺癌細胞は、clone増殖能がMTOR経路に依存し、MTOR阻害薬による抗腫瘍効果が示唆された。SMARCA4変異陽性腫瘍において、MTOR阻害薬はエピジェネティクスを標的とする治療との併用薬の候補となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shiia A, Noguchi T, Tomaru U, Ariga S, Takashima Y, Ohhara Y, Taguchi J, Takeuchi S, Shimizu Y, Kinoshita I, Koizumi T, Matsuno Y, Shinagawa N, Sakakibara-Konishi J, Dosaka-Akita H	4. 巻 114
2. 論文標題 EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancer cells perturbs innate immune signaling pathways in the tumor microenvironment.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1270-1283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15701	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 Takada K, Kubo T, Kikuchi J, Yoshida M, Murota A, Arihara Y, Nakamura H, Nagashima H, Tanabe H, Sugita S, Tanaka Y, Miura A, Ohhara Y, Ishiguro A, Yokouchi H, Kawamoto Y, Mizukami Y, Ohnishi H, Kinoshita I, Sakurai A	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of comprehensive cancer genomic profiling on therapeutic strategies and clinical outcomes in patients with advanced biliary tract cancer: A prospective multicenter study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 988527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2022.988527	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 Takahashi S, Karayama M, Takahashi M, Watanabe J, Minami H, Yamamoto N, Kinoshita I, Lin CC, Im YH, Achiwa I, Kamiyama E, Okuda Y, Lee C, Bang YJ	4. 巻 27
2. 論文標題 Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab deruxtecan with concomitant ritonavir or itraconazole in patients with HER2-expressing advanced solid tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 5771-5780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-21-1560	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 該当する

1. 著者名 Hagio K, Amano T, Hayashi H, Takeshita T, Oshino T, Kikuchi J, Ohhara Y, Yabe I, Kinoshita I, Nishihara H, Yamashita H	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of clinical targeted sequencing on endocrine responsiveness in estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87645-6	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 Kikuchi Junko, Ohhara Yoshihito, , Kinoshita Ichiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Clinical significance of comprehensive genomic profiling tests covered by public insurance in patients with advanced solid cancers in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 753-761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa277	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 Kiuchi Takayuki, Tomaru Utano, Ishizu Akihiro, Imagawa Makoto, Iwasaki Sari, Suzuki Akira, Otsuka Noriyuki, Ohhara Yoshihito, Kinoshita Ichiro, Matsuno Yoshihiro, Dosaka-Akita Hiroto, Kasahara Masanori	4. 巻 74
2. 論文標題 Expression of the immunoproteasome subunit 5i in non-small cell lung carcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 300-306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206618	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 Hayashi Hideyuki, Tanishima Shigeki, Fujii Kyoko, Mori Ryo, Okada Chihiro, Yanagita Emmy, Shibata Yuka, Matsuoka Ryosuke, Amano Toraji, Yamada Takahiro, Yabe Ichiro, Kinoshita Ichiro, Komatsu Yoshito, Dosaka Akita Hiroto, Nishihara Hiroshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Clinical impact of a cancer genomic profiling test using an in house comprehensive targeted sequencing system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3926-3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14608	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下 一郎, Garralda Elena, Hong David S., Xu Ruihua, Deeken John, Italiano Antonine, Liu Tianshu, Calvo Ferrandiz Aitana, Patel Jyoti D., Lee Dae Ho, Norenberg Ricarda, Burcoveanu Domnita-Ileana, Mussi Chiara E., Dylon Alexander, Shen Li
2. 発表標題 TRK融合陽性の消化器がん患者におけるラロトレクチニブの長期有効性と安全性
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下 一郎, Boni Valentina, Drilon Alexander, Deeken John F., Cabanas Elena G., Chung Hyun C., Oh Do-Youn, Patel Jyoti D., Xu Ruihua, Norenberg Ricarda, Brega Nicoletta, Dima Laura, Hong David S., Berlin Jordan
2. 発表標題 TRK融合陽性の消化器がん患者におけるラロトレクチニブの有効性と安全性
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 一郎
2. 発表標題 CGP 検査前後の患者に対する意思決定支援（がんゲノム医療中核拠点病院）
3. 学会等名 第6 回日本がんサポーターケア学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Kikuchi, , Ichiro Kinoshita
2. 発表標題 Clinical sequencing with insurance-covered genomic profiling tests in patients with advanced solid cancers in Hokkaido
3. 学会等名 18th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology
4. 発表年 2021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
---------	---------