

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08518

研究課題名（和文）がん幹細胞と老化細胞を標的とした分子標的治療薬耐性の克服

研究課題名（英文）Overcoming resistance to molecular targeted drugs targeting cancer stem cells and senescent cells

研究代表者

立原 素子 (Tachihara, Motoko)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：40448626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：EGFR-TKI投与後に残存する薬剤耐性クローン（DTPs）は耐性化の原因の一つとして考えられている。EGFR-TKIと同様、ALK-TKIにおいても、治療数年後に薬剤耐性の獲得が起こることが知られている。ALK-TKIにより形質転換が起こった組織で幹細胞のマーカーであるCD133やSOX-2と老化細胞のマーカーであるBCL-2を発現していること明らかにしてきた。そこで、『分子標的治療薬の耐性機序として重要な形質転換は、肺がんがDTPsの状態であるがん幹細胞と老化細胞を経て、がん幹細胞から神経内分泌腫瘍へ分化しているのではないか』という仮説を明らかにするために本研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DTPsにはがん幹細胞と老化細胞が含まれており、形質転換を起こしたがん細胞もDTPsのプロファイルを示すことを明らかにした。現在のところ、耐性株を標的とした薬剤開発が進んでいるが（Nature. 462:1070-4,2009）、未だ十分な成果は得られておらず、耐性株の出現を防止する治療法の実現も進んでいないのが現状である。これまでDTPsを標的とした治療戦略は存在せず、DTPsの解析についてもほとんどなされていない。この研究を通じて肺がんの発生機序の解明と肺がん死の克服が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Drug tolerant persisters (DTPs) remaining after EGFR-TKI administration are considered to be one of the causes of drug resistance. ALK-TKIs are also known to develop drug resistance several years after treatment. We have revealed that stem cell markers CD133 and SOX-2 and senescent cell marker BCL-2 are expressed in tissues transformed by ALK-TKI. Therefore, it is suggested that the transformation, which is important as a resistance mechanism of molecular-targeted drugs, is generated from the differentiation of lung cancer consisted of cancer stem cells to neuroendocrine tumors. Therefore, this research was conducted to clarify the this hypothesis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺がん ALK-TKI 幹細胞 老化細胞

1. 研究開始当初の背景

1. 分子標的治療薬と耐性化

肺がんは本邦でのがん関連死の第一位の原因であり、その治療法の開発は喫緊の課題である。非小細胞肺がんの治療においては、2009年に上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)がEGFR遺伝子に変異を有する非小細胞肺がんに劇的な効果をもたらすことが示されてから、治療法に大きな進歩がみられた。しかし、分子標的治療薬は著効しても、ほぼ全例で数年後に肺がん組織において薬剤耐性の獲得が起こり、再発することが知られており、根治は依然として困難な状況である。EGFR-TKI投与後に残存する薬剤耐性クローン(DTPs、Cell.141:69-80,2010)は耐性化の原因の一つとして考えられており、がん幹細胞としての振る舞いを有するために根治が不可能となっていることが示唆されている。申請者は、EGFR-TKI投与後に残存するDTPsが、がん幹細胞と細胞老化を起こした細胞の少なくとも2種の異なる細胞群で形成されることを発見し、老化細胞がsenescence-associated secretory phenotype(SASP)と呼ばれる現象を通して幹細胞の維持に働いていることを見出した。さらに、それぞれウィザフェリンAと糖代謝阻害剤により細胞死を誘導することができ、遷移段階であるDTPsを標的とした治療がEGFR-TKIに耐性の肺がんの有用な治療法であることを報告した(図1、Cancer Sci. 108:1368-1377,2017)。

2. 形質転換と耐性化

EGFR-TKIと同様、ALK-TKIにおいても、治療数年後に薬剤耐性の獲得が起こることが知られている。その薬剤耐性機序として、神経内分泌腫瘍への形質転換が起こることが双方のTKIで報告されている。申請者はALK-TKIにより形質転換が起こった組織で幹細胞のマーカーであるCD133やSOX-2と老化細胞のマーカーであるBCL-2を発現していることを発見した(Pathol Int. 69:294-299,2019)。そこで、申請者は『分子標的治療薬の耐性機序として重要な形質転換は、肺がんがDTPsの状態であるがん幹細胞と老化細胞を経て、がん幹細胞から神経内分泌腫瘍へ分化しているのではないか』という仮説を立て、その仮説を明らかにするために本研究を立案した。今回の科研費を獲得することで、上記の知見を補填する研究を行い、幹細胞と老化細胞を標的とする治療が、形質転換を含めた薬剤耐性の克服につながるかどうかを明らかにする先駆的な臨床研究につなげていく。

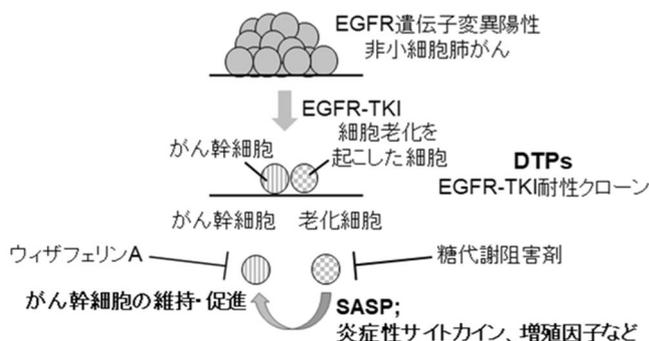


図1. EGFR耐性クローンに対する治療戦略

2. 研究の目的

EGFRなどの特定の遺伝子の変異によって生じる肺がんに対して、そのTKIは劇的な効果を示すことが証明されたが、依然として根治は不可能である。申請者らはEGFR-TKI投与後に残存するDTPsががん幹細胞と細胞老化を起こした細胞の少なくとも2種の異なる細胞群で形成されることを発見した。本研究は、薬剤耐性の機序として重要な、非小細胞肺がんから小細胞肺がんへの形質転換におけるがん幹細胞の役割や、がん幹細胞から小細胞肺がんへ分化する機序を解明し、治療法の開発に結びつけることを主な目的としている。本研究により形質転換が関与する薬剤耐性に関しては、薬剤耐性の克服により非小細胞肺がんの生存率が改善すること、小細胞肺がんの発症機序を解明することで、極めて予後不良な小細胞肺がんの生存率が改善することが期待される。

3. 研究の方法

実験1. DTPsの作成

ALK遺伝子陽性肺がん細胞株H2228にALK-TKIとしてAlectinib(3.2 μM)を投与し、DTPsを作成する。

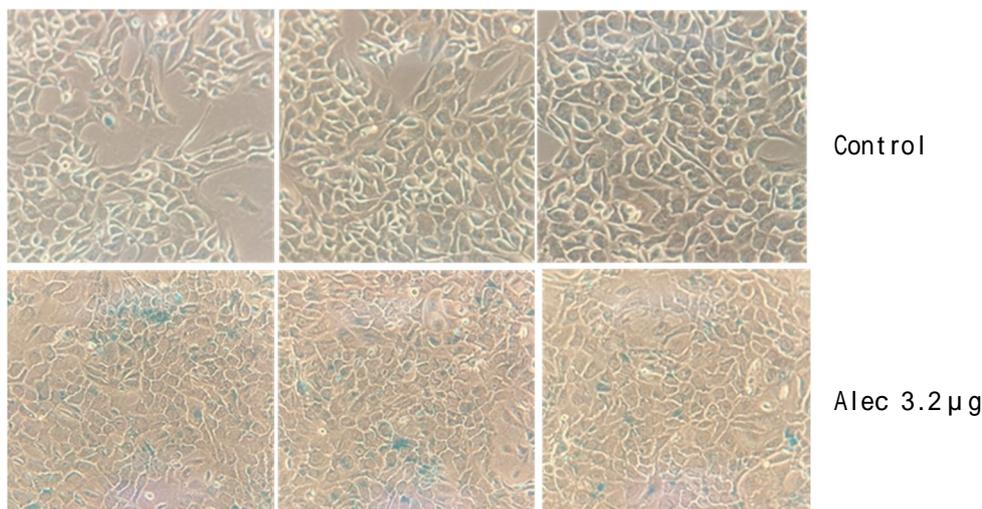
実験2. 老化細胞の確認

DTPsをガラクトシダーゼ染色を行い、老化細胞を確認する。

4. 研究成果

ALK遺伝子陽性肺がん細胞株H2228にALK-TKIとしてAlectinib(3.2 μM)を投与し、DTPsを作成する。

H2228 に Alectinib を投与しないコントロール群と DTPs を作成した群で、それぞれ 10 日後にガラクトシダーゼ染色を行い、DTPs 群で、青く染色された老化細胞が増加していることを光学顕微鏡で確認した。



今後の方針として、がん幹細胞の表面マーカーのひとつである CD133 を用いて、DTPs より CD133 high/low の細胞群に分離し、CD133 high 群の細胞集団ががん幹細胞の特性を有すること、CD133 low 群の細胞集団が細胞老化を起こした細胞の特性を有することを検討し、それぞれ、ウィザフェリン A と糖代謝阻害剤により細胞死を誘導することができるかを確認する。また、幹細胞を神経内分泌細胞に分化させる因子が何かについてまで明らかにすることを目指す。

具体的には、以下の実験を進めていく。

実験 1. DTPs からのがん幹細胞の単離

ALK 遺伝子陽性肺がん細胞株 H2228 に ALK-TKI として Alectinib (3 μ M) を投与し、DTPs を作成する。Alectinib 誘導性 DTPs を用いて、幹細胞の表面マーカー CD133 (Cell, 141:69-80, 2010) にてフローサイトメトリーを行うことで CD133 high/low の細胞グループを選別する。CD133 high グループに幹細胞が多く含まれていることが期待される。

実験 2. CD133 low 群における細胞老化特性の評価

CD133 low 群には細胞老化を起こした細胞が多く含まれることが予想される。そのため、CD133 high 群、low 群細胞のタンパクを抽出し、細胞老化現象に関わるとされる p16, p21, phospho-Rb, p53 の発現をウェスタン・ブロットにて解析を行う。

実験 3. CD133 low 群における SASP およびニッチ形成因子の解析

CD133 low 群において細胞老化が起きている場合、同細胞で SASP が認められる可能性がある。CD133 low 群の細胞から mRNA を抽出し、qRT-PCR にて IL-6, IL-1, IL-8, CXCL9, プロテアーゼ、PAI-1 といった SASP のタンパクの発現やニッチ形成因子を評価する。

実験 4. CD133 high 群の腫瘍形成能の評価

CD133 high 群をヌードマウスに移植し、経時的に腫瘍系を評価する。CD133 high 群にがん幹細胞が多く含まれているとすれば、同細胞群より腫瘍形成が生じるものと思われる。

実験 5. CD133 low 群における代謝機能の解析

CD133 low 群の細胞で Warburg 効果として知られる解糖系亢進状態が更に増強される SASP という現象が起きているかを検討するために、Phloretin, Cytochalasin B, Sodium oxamate などで糖代謝を抑制し、生存率の差を評価する。また糖代謝機能を抑制することで、生存率に影響するかを評価する。これらの実験により CD133 low 細胞群が senescence-related metabolic reprogramming に依存しているかどうかを評価できる。

実験 6. DTPs の排除による腫瘍再発抑制の解析

幹細胞に対するウィザフェリン A と老化細胞に対する糖代謝阻害剤により細胞死が誘導されるかを、DTPs をヌードマウスへ移植し、腫瘍径と体重を評価する。

実験 7. 幹細胞から神経内分泌細胞へ分化させる因子の検討

EGFR-TKI あるいは ALK-TKI 誘導性の DTPs に小細胞がん細胞株の培養上清を撒き、神経内分泌系へ分化するかを神経内分泌マーカーの発現により評価する。また、小細胞がん細胞株の培養上清中の extracellular vesicles (EVs) を回収し、成分を解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 TANDA MASAOKI, YAMAMOTO KAZUHIRO, HORI TOMOKI, NISHIGUCHI HIROKI, YAGI MIKI, SHIMIZU MICHIKO, KONISHI TORU, OZAKI TOMONORI, YOSHIOKA NATSUE, TACHIHARA MOTOKO, ITO TAKEFUMI, IKUSHIMA SHIGEKI, OMURA TOMOHIRO, YANO IKUKO	4. 巻 43
2. 論文標題 Association of STAT3, CYP3A5, and ABCG2 Polymorphisms With Osimertinib-induced Adverse Events in NSCLC Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1775 ~ 1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.16331	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 Mimura Chihiro, Kaneshiro Kazumi, Fujimoto Shodai, Dokuni Ryota, Iwamoto Natsuhiko, Matsumura Kanoko, Hatakeyama Yukihisa, Kono Yuko, Tachihara Motoko	4. 巻 14
2. 論文標題 TAPO in first line osimertinib therapy and continuation of osimertinib	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 584 ~ 591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14782	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 Suraya Ratoo, Tachihara Motoko, Nagano Tatsuya, Nishimura Yoshihiro, Kobayashi Kazuyuki	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Immunotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancers: Current Status and Updates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Management and Research	6. 最初と最後の頁 2079 ~ 2090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CMAR.S366738	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 Nagano Tatsuya, Tachihara Motoko, Tanaka Yugo	4. 巻 14
2. 論文標題 Future prospects of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) and surgery for non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 809 ~ 811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd-22-57	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 Shimizu N, Tanaka Y, Tachihara M, Maniwa Y	4. 巻 67(4)
2. 論文標題 ROS1-Rearranged Lung Cancer Successfully Resected after Response to Crizotinib: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci	6. 最初と最後の頁 E143-E145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Fukui Takafumi, Tachihara Motoko, Nagano Tatsuya, Kobayashi Kazuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Review of Therapeutic Strategies for Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14051184	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Chihiro Mimura, Motoko Tachihara, Kazumi Kaneshiro, Yuko Kono, Shodai Fujimoto, Yukihisa Hatakeyama, Ryota Dokuni, Natsuhiko Iwamoto, Kanoko Matsumura, Kazuyuki Kobayashi
2. 発表標題 A multicenter study of incidence of drug-induced lung disease in first-line osimertinib therapy and continuation of osimertinib administration
3. 学会等名 ESMO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田 真幸, 下川 元継, 中村 敦, 野崎 要, 渡辺 恭孝, 加藤 晃史, 早川 乃介, 田中 洋史, 高橋 利明, 立原 素子, 林 秀敏, 藤本 大智, 山口 寛博, 山本 将一朗, 岩間 映二, 東 公一, 沖 昌英, 長谷川 一男, 山本 信之, 中川 和彦
2. 発表標題 第1・2世代 EGFR-TKI およびプラチナ PD (T790M 陰性) を示した EGFR 陽性 NSCLC に対するオシメルチニブの第2相試験
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三村千尋、立原素子、福井崇文、山田潤、矢谷敦彦、福田貴与子、羽間大祐、桂田直子、永野達也、山本正嗣、小林和幸
2. 発表標題 免疫組織化学法とマルチプレックス検査によるALK融合遺伝子発現の検討
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大木元愛子、桂田直子、立原 素子、山本 正嗣、矢谷 敦彦、羽間 大祐、小林 和幸
2. 発表標題 ALK-TKI治療中にBRAF V600E変異が検出された若年発症HIP1-ALK陽性肺癌の一例
3. 学会等名 第117回日本肺癌学会関西支部学術集会
4. 発表年 2023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	西村 善博 (Nishimura Yoshihiro) (20291453)	神戸大学・医学部附属病院・名誉教授 (14501)	
研究 分担者	山本 正嗣 (Yamamoto Masatsugu) (40542139)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究 分担者	小林 和幸 (Kobayashi Kazuyuki) (50403275)	神戸大学・医学部附属病院・特命教授 (14501)	

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	永野 達也 (Nagano Tatsuya) (80624684)	神戸大学・医学研究科・講師 (14501)	

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