

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08559

研究課題名（和文）長鎖非コードRNAを標的としたEGFR-TKI耐性肺癌に対する新規治療法の創出

研究課題名（英文）Attempt to establish a novel therapeutic approach targeting long non-coding RNAs for EGFR-TKI-resistant lung cancer

研究代表者

邵力（SHO, Ri）

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80344787

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）：非小細胞肺癌の分子標的治療において、獲得耐性が問題となっている。申請者らは新規lncRNA S180122が薬剤耐性に関与することを示唆した。本研究では、患者由来肺癌オルガノイドを作製し、オルガノイドを用いてlncRNA S180122阻害剤の薬剤耐性克服効果を検討した。結果として、耐性細胞株では阻害剤によりEGFR-TKI耐性が減弱したが、オルガノイドでは有意な形態的・遺伝子的変化が見られなかった。今後は、核酸薬デリバリー法の改良と3次元培養モデルを活用した耐性克服薬の探索・評価が求められる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子標的治療における耐性化機構の解明と克服薬の探索は、肺癌治療成績のさらなる向上につながる重要な課題である。本研究ではlncRNAを標的としたEGFR-TKI耐性肺癌に対する新規治療法の創出を目指したが、最終目標は達成できなかった。しかし、短期間で患者由来肺癌オルガノイドの作製方法を確立したことは、今後の肺癌創薬研究開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Acquired resistance remains a major obstacle to targeted therapies for non-small-cell lung cancer (NSCLC). This study aimed to investigate the potential of lncRNA S180122 inhibitors in overcoming drug resistance using patient-derived lung cancer organoids and cell line-derived spheroids. The results demonstrated that the inhibitor could attenuate EGFR-TKI resistance in resistant cell lines. However, no significant morphological or genetic changes were observed in organoids/spheroids, suggesting delivery challenges. Further optimization is needed to effectively deliver inhibitors to 3D tumor models for overcoming clinical drug resistance.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：lncRNA 肺癌 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドライバー遺伝子変異/転座陽性の非小細胞肺癌に対する分子標的治療は進歩を続けており、患者予後も着実に改善している。しかし、獲得耐性により再発することが問題となっている。薬剤耐性の克服または治療を目指した治療戦略が模索されている¹⁾。

EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)に対する獲得耐性のメカニズムは複雑である。最も代表的なメカニズムはEGFRのT790M二次変異、c-Met遺伝子の増幅、肝細胞増殖因子(HGF)の過剰発現などが知られているが、他の耐性因子も併せ持つことで、がん細胞が生存に必要な代替シグナル伝達経路を獲得し、薬剤耐性を示すようになるとも考えられる²⁾。

近年の癌ゲノム解析の結果、従来同定されてきた癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異だけではなく、タンパク質を翻訳しない非コードRNA(non-coding RNA)の変異や発現異常も、癌の発症・進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなった³⁾。申請者らは、既存RNA-Seqデータ解析で示唆された、肺癌組織で高発現する新規lncRNA S180122が、非小細胞肺癌細胞株において過剰発現することを確認した。また、機能解析によりlncRNA S180122が癌遺伝子として機能し、肺癌の転移プロセスおよび薬剤耐性獲得に関する上皮間葉転換(EMT)に影響を及ぼすことが示唆された。以上の知見から、lncRNA S180122が非小細胞肺癌の獲得耐性・再発を克服するための新たな診断・治療において、有望な新たな分子標的となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、我々が新規に同定した肺癌進展に関連するlncRNA S180122に着目して、薬剤耐性を獲得した非小細胞肺癌患者由来の癌組織細胞を用いた3次元培養系で、獲得した薬剤耐性を克服するための、lncRNAを標的とした核酸医薬の探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体の収集

大学附属病院で肺癌手術を受けた患者から、術前後の血液検体と、摘出された肺癌組織及び周辺の正常組織を採取する。肺癌組織はすぐに抗生物質入り培地に入れて氷冷保存し、速やかにオルガノイドの作製を行う。

(2) 肺癌細胞株の培養とEGFR-TKI耐性株の樹立

非小細胞肺癌細胞株A549(RCB3677)とRERF-LC-AI(RCB0444)を理研細胞バンクから購入して実験室に維持する。また、ゲフィチニブを用いて、非小細胞肺癌細胞株RERF-LC-AIからEGFR-TKI耐性株RERF-GRを誘導・樹立する。

(3) 肺癌組織細胞や細胞株の3次元培養

薬剤応答試験プレートフォームを作製するために、以下の手順を行う。

患者から採取した腫瘍検体を1mm³に細切した後、酵素処理により単離細胞に分散させる。得られた組織・細胞懸濁液を70µmのセルストレーナーを通して単細胞懸濁液を調製し、96-wellスフェロイドプレートに播種する。Advanced Suspension Medium(ASM)を用いて肺癌オルガノイドを作製・培養する。

肺癌細胞株RERF-LC-AI及びEGFR-TKI耐性株RERF-GR細胞をスフェロイドプレートに播種し、ASMを用いて肺癌スフェロイドを作製・培養する。

(4) オルガノイド/スフェロイド薬剤応答試験

作製したオルガノイド/スフェロイドを3次元培養Matrigelプレートに播種する。播種後各wellにlncRNA S180122特異的阻害剤(アンチセンスオリゴ核酸si63)をトランスフェクション試薬Lullabyと共に投与して、2~4週間培養後にオルガノイド/スフェロイドの増殖率・遊走率・形態・関連遺伝子発現の変化を観察し、negative control(NC)と比較評価する。

(5) lncRNAを含む肺癌関連遺伝子発現解析

患者の血漿サンプル、腫瘍組織、作製した肺癌オルガノイド、または細胞株由来の肺癌スフェロイドを用いて、total RNAを抽出した後、リアルタイムRT-PCR法によりlncRNA S180122及び肺癌関連遺伝子の発現を定量的に測定する。オルガノイドサンプル中のEMT関連蛋白質の発現レベルをWestern Blotting法で解析する。

(6) 病理解析

培養中及び薬剤応答試験前後のオルガノイド/スフェロイドをiPGeII試薬でゼリー化し、組織固定・包埋・切片・染色の手順で病理組織画像を解析する。

4. 研究成果

(1) 患者肺癌組織に由来するオルガノイド作製の成功

薬剤応答試験プレートフォームを樹立するために、研究期間中に25例の非小細胞肺癌患者から採取した肺癌組織を用いて、オルガノイド作製方法を検討し、3次元培養条件を最適化した上で、21例肺癌オルガノイドの作製に成功した。そのうちの半数以上が長期間(12

ヶ月以上培養できた。中短期間(2-6ヶ月)培養されたオルガノイドでは、元の腫瘍と類似した形態と遺伝子発現パターンが確認された(図1)。また、作製に成功した強い増殖能を持つオルガノイドを用いて、培養条件や薬剤応答試験を検討したところ、次の結果が得られた。オルガノイドの短期作製にはASM培地の使用が有効であるが、長期培養・増殖維持にはMatrigelの利用や培地中のニッチ因子の調整が必要であること。5種類のトランスフェクション試薬から、IncRNA阻害剤をオルガノイドに最も効率よく導入できるのはLullabyであること。臨床検体から作製した肺癌オルガノイドを用いて、EGFR-TKI感受性試験が実施できること(図2)。

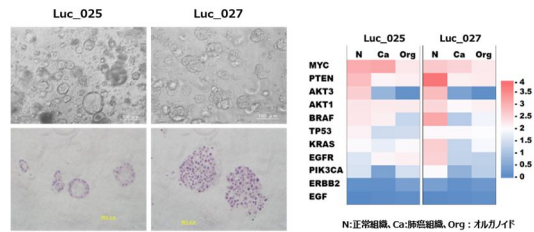


図1 肺癌オルガノイドの形態と遺伝子発現ヒートマップ

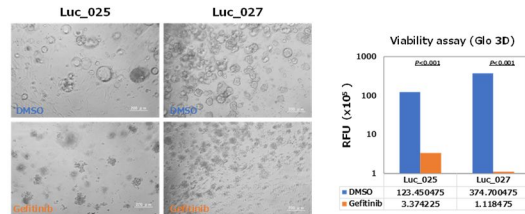


図2 肺癌オルガノイドを用いたEGFR-TKI感受性試験

(2) EGFR-TKI 耐性株 RERF-GR の樹立

EGFR-TKI 耐性を獲得した患者由来のオルガノイドを用いて IncRNA S180122 阻害剤の効果を評価する計画であったが、経気管支肺生検から研究用標本を取得することが困難であったため、代替としてゲフィチニブを用いて肺癌細胞株 RERF-LC-AI から EGFR-TKI 耐性株 RERF-GR を誘導・樹立した。親株と比較した結果、RERF-Gr 細胞がゲフィチニブに、IncRNA S180122 阻害剤が薬剤耐性に与える影響 10 倍を超える高い耐性を示し、IncRNA S180122 や EMT 関連遺伝子の発現亢進も判明された(図3)。

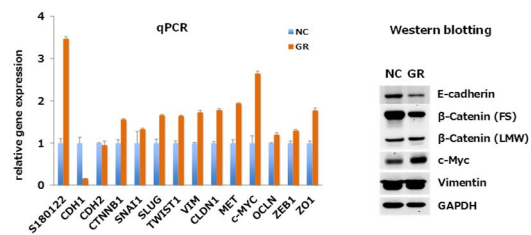


図3 EGFR-TKI耐性株RERF-GRのがん関連遺伝子の発現

(3) IncRNA S180122 阻害剤による肺癌細胞の EGFR-TKI 耐性に与える影響

EGFR-TKI 耐性株 RERF-GR に IncRNA S180122 阻害剤を導入すると、培養細胞とコントロールを比較して、ゲフィチニブ(50 μM)を負荷した際に、細胞増殖が有意に減少することが示された(図4)。E-cadherin、claudin、vimentin など EMT 関連遺伝子の発現も変化し、IncRNA S180122 発現の抑制が RERF-GR 細胞のゲフィチニブ感受性を高めることが認められた。一方で、RERF-GR スフェロイドに IncRNA 阻害剤を導入した場合、そのゲフィチニブに対する感受性の変化は再現できなかった。さらに、薬剤応答試験結果によって得た EGFR-TKI 耐性を示した患者由来のオルガノイドを用いて、IncRNA S180122 阻害剤が薬剤耐性に与える影響を検討した。IncRNA 阻害剤を投与したオルガノイドとコントロールを比較したところ、ゲフィチニブに対する感受性に統計的に有意な変化は認められなかった。これは阻害剤の3次元培養スフェロイド/オルガノイドへのデリバリー問題だと考えられ、今後の検討課題である。

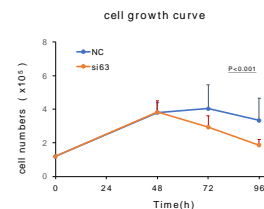


図4 IncRNA阻害剤による細胞株のEGFR-TKI耐性に与える影響

本研究では、IncRNA S180122 を標的とした EGFR-TKI 耐性肺癌に対する新規治療法の開発を最終目標としていたが、達成することはできなかった。しかし、以下の知見が得られた。耐性肺癌細胞株に対し IncRNA S180122 阻害剤を導入することで EGFR-TKI 耐性が減弱した。耐性克服のための核酸新薬を創出する可能性が示唆された。適切な検体処理と培養条件を整えれば、約 80%の肺癌患者からオルガノイドを作製可能であった。肺癌オルガノイドを用いた薬剤感受性試験の臨床応用は可能であり、核酸薬の有効性・感受性試験の展開には、核酸薬デリバリー技術の改良が必要である。

<引用文献>

1. Passaro A et al. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. Nat Cancer. 2(4):377-91,2021
2. Meador CB et al. Acquired resistance to targeted therapies in NSCLC: Updates and evolving insights. Pharmacol Ther. 210:107522, 2020
3. Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. Nat Med. 21(11):1253-61,2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 邵力, 張 旭紅, 鈴木 潤, 渡辺 光, 塩野 知志, 千田 邦明, 伊藤 吏, 惣宇利 正善, 今田 恒夫
2. 発表標題 治療用RNAのスクリーニングのための患者由来の腫瘍オルガノイドの確立における課題
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 邵力、張旭紅、鈴木潤、高森聡、塩野知志、惣宇利正善、今田恒夫.
2. 発表標題 薬物反応試験のための患者由来の肺癌オルガノイドモデルの構築
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1.邵力、張旭紅、鈴木潤、鈴木克幸、高森聡、大泉弘幸、惣宇利正善、今田恒夫
2. 発表標題 ゲフィチニブ耐性非小細胞肺癌細胞株における lncRNA S180122の発現亢進と上皮間葉転換の促進
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sho R, Zhang XH, Suzuki J, Osaki T, Souri M, Konta T.
2. 発表標題 LncRNA S180122 modulates EMT in human non-small cell lung cancer cells.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 2. Tachibana H, Sho R, Zhang XH, Ozaki H, Koike S, Karakami K, Konta T.
2. 発表標題 Establishment of Patient-Derived Oral Cancer Organoid Cultures.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
研究分担者	鈴木 潤 (Suzuki Jun) (70533925)	山形大学・医学部・助教 (11501)	
研究分担者	張 旭紅 (Sho Kyoko) (10292442)	山形大学・大学院医学系研究科・助教 (11501)	
研究分担者	濱田 顕 (Hamada Akira) (80772954)	近畿大学・大学病院・助教 (34419)	

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