

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08580

研究課題名（和文）細胞骨格-YAP系による肺癌治療抵抗性の解明と治療戦略への展開

研究課題名（英文）Cytoskeleton-YAP axis regulates lung cancer resistanc: From mechanism to therapy

研究代表者

福原 達朗（Fukuhara, Tatsuro）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：80400365

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）：増殖因子受容体は、増殖シグナルと同時に形態変化や移動性などからなる機械的シグナルを伝えることで、癌としての力学的環境を維持している。本研究ではEGFR変異細胞を用いたYAPの解析から、YAPの活性化が示唆された。YAPの標的遺伝子を定量したところ、EGFRシグナルにより転写活性化が認められた。一方で細胞骨格を阻害すると、細胞ストレスが高まり、同時に細胞の遊走、浸潤、拡散が阻害された。これらの結果から、YAP がアクチン細胞骨格と連携して肺がんの悪性形質を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肺がんと細胞骨格の関連に関する示唆に富む結果を得た。肺がんは治療抵抗性が問題となっており、本研究により明らかとなった細胞骨格によるアポトーシス抵抗性の発揮は、新たな治療戦略の設定に寄与する可能性がある。肺がんの新たな治療法開発に繋がれば社会的貢献となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The receptors for growth factors play a role in controlling the physical environment of cancer by transmitting mechanical signals, such as changes in cell shape and movement, in addition to signals that promote cell growth. Based on the analysis of YAP in cells with mutated EGFR, YAP is activated by EGFR. Studying YAP target genes also showed that EGFR signals activate the transcription of these genes. On the other hand, when the cytoskeleton is inhibited, it causes an increase in cell stress and, at the same time, inhibits cell movement, invasion, and growth. These findings suggest that YAP collaborates with the actin cytoskeleton to enhance the harmful characteristics of lung cancer.

研究分野：がん治療学

キーワード：がん 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EGFR を標的としたチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)による治療では、獲得耐性が問題となっている。原因として、Driver の 2 次的変異 (EGFR-T790M, 同 C797S など) や、代替分子の活性化が判明している。次世代 TKI を用いても耐性の克服は不十分であり喫緊の課題である。

EGFR や ALK などの増殖因子受容体は、増殖シグナルと同時に形態変化や移動性などからなる機械的シグナルを伝えることで、癌としての力学的環境を維持している。実際に、多くの変異 EGFR 肺癌において細胞骨格系の異常が共存する。一方、野生型 EGFR を発現する肺癌においても細胞骨格の活性化が高頻度で認められる。以上の事実は、肺癌における細胞骨格系の活性化が治療抵抗性の獲得に何らかの役割を果たしていることを強く示唆している。細胞骨格は Tubulin と Actin から構成され、重合と解離を繰り返す。しかしながら、なぜ細胞骨格が耐性獲得を誘導するか? という問いに対する分子基盤は不明であった。近年、細胞骨格系の下流にあった機械的張力をモニターする分子として YAP が報告された。YAP は細胞質に存在し、細胞内骨格から入力されるメカニカルテンションを検知し核移行して標的遺伝子の転写を活性化させる。その結果、増殖、細胞運動性、アポトーシス抵抗性、を誘導することによって悪性度を加速させる。興味深いことに、肺癌においては YAP が高発現しており、増殖・転移を誘導している可能性が高い。これらの状況証拠を合わせると、YAP は変異 EGFR シグナルのみならず、癌細胞の微小環境に由来する機械的ストレスを増殖・生存シグナルに変換しており、難治性肺癌の増殖と運動性を誘導し、化学療法薬による細胞死回避も同時に行うことで治療抵抗性を支える、という可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究課題では肺癌細胞が細胞骨格系を介して増殖・転移を誘導する分子基盤を解明するため、YAP 蛋白質の役割を明らかにする。EGFR シグナルによる YAP 遺伝子の転写促進、および YAP 遺伝子の増幅が増殖と運動性に与える影響を同時に解析し、EGFR 変異と治療抵抗性の関連性を明らかにする。さらに、in vitro, in vivo モデルを駆使して YAP の抑制による影響を解明するとともに、その成果を応用した難治性肺癌の治療に向けた新たな基盤技術開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

細胞培養：293T 細胞および H1975 細胞は ATCC から入手し、10%FBS/DMEM 培地で培養した。プラスミド DNA の一過性発現は、Polyethylenimine (PEI) を用いた。S100AX の発現抑制には、shRNA 発現ベクター-LT3GEPiR を用いた。蛋白質の発現確認は、ウェスタンブロット法を用い、phospho-EGFR (Y1068), phospho-YAP(CST 社) 抗体等を用いた。mRNA 調整は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いた。創傷治癒アッセイでは、H1975 細胞を 12 ウェル プレートに播種し、コンフルエンスに達するまで放置して単層を作成し、実験の 2 時間前に 8 ug/ml のマイトマイシン C で処理した。ピペット チップで単層をスクラッチして創傷を作成し、指定された時間ポイントでインキュベートした後、24 時間の画像を取得した。トランスウェル浸潤アッセイでは、8.0 μm の孔径を持つ Corning BioCoat Matrigel Invasion Chambers を用いて浸潤を評価した。化学誘引物質として 10% FBS 培地を下部コンパートメントに分注し、細胞を上部コンパートメントに

追加した。細胞を 24 時間遊走させた後、チャンバーの底に移動した細胞を固定し、DiffQuick で染色した。

4 . 研究成果

肺癌における細胞骨格-YAP 系の活性化の仕組みの解明として、EGFR シグナルによる YAP 活性化を解析した。EGFR 変異 (L858R/T790M) を有する H1975 細胞を用いて、Actin と Tubulin (細胞骨格マーカー) および細胞質および核移行した YAP を解析したところ、細胞質分画および核分画において YAP が検出された。これらの量比は他の細胞より高く、EGFR シグナルによる YAP 活性化が起こっている可能性が示唆された。

肺癌における細胞骨格-YAP 系の活性化の仕組みの解明として、細胞骨格-YAP 系による治療抵抗性の解析を行った。アポトーシス抵抗性は EGFR-TKI や化学療法の効果を決定する重要な因子であることから、細胞骨格を阻害し、抗癌剤含むストレス与え細胞死を検討した。その結果、骨格系阻害が細胞ストレスを大幅に高めることを見出した。さらに同系による癌細胞に対する治療抵抗性克服を明らかにすることが必要と考えられたため、細胞骨格-YAP ノックアウト細胞の樹立を試みたが、クローンの獲得ができなかった。一方、細胞骨格を制御する分子 (S100AX) を用いた YAP 制御を試みた。制御分子の枯渇は細胞の遊走、浸潤、拡散を阻害した。S100AX ノックアウトは YAP 活性を阻害し、YAP 標的の発現を減少させた。S100AX、F-アクチン、コルタクチン、および Arp2 の動態を調べると、S100AX とこれらの細胞骨格成分との関連が明らかとなった。イオノマイシン刺激時の S100AX 動態では、同分子が細胞周縁部に非対称に移動し、F-アクチンの逆行運動を彷彿とさせる動態を反映した。全体として、我々の結果は、YAP が S100AX と連携して、アクチン細胞骨格のリモデリングに関与することにより悪性肺腺癌の特性を促進することが示唆された。

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 10件）

1. 著者名 Miyamoto Masahiko, Himeda Toshiki, Ishihara Kazuki, Okuwa Takako, Kobayashi Daiki, Nameta Masaaki, Karasawa Yu, Chunhaphinyokul Benyapa, Yoshida Yutaka, Tanaka Nobuyuki, Higuchi Masaya, Komuro Akihiko	4. 巻 210
2. 論文標題 Theilovirus 3C Protease Cleaves the C-Terminal Domain of the Innate Immune RNA Sensor, Melanoma Differentiation-Associated Gene 5, and Impairs Double-Stranded RNA-Mediated IFN Response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 335 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2200565	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 Oizumi Satoshi, Takamura Kei, Harada Toshiyuki, Tachihara Motoko, Morikawa Naoto, Honda Ryoichi, Watanabe Satoshi, Asao Tetsuhiko, Kunisaki Mamoru, Fukuhara Tatsuro, Noro Rintaro, Kikuchi Eiki, Tsutani Yasuhiro, Tenma Toshiyuki, Kobayashi Kunihiko, Dosaka-Akita Hiroto	4. 巻 27
2. 論文標題 Phase II study of carboplatin+paclitaxel alone or with bevacizumab in advanced sarcomatoid carcinoma of the lung: HOT1201/NEJ024	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 676 ~ 683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-02113-5	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 Kobayashi Maki, Kojima Katsuhiko, Murayama Kazutaka, Amano Yuji, Koyama Takashi, Ogama Naoko, Takeshita Toshikazu, Fukuhara Tatsuro, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 MK 6, a novel not IL 2, elicits a potent antitumor activity by improving the effector to regulatory T cell balance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4478 ~ 4489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15127	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 Takeda Yuji, Kurota Yuta, Kato Tomoyuki, Ito Hiromi, Araki Akemi, Nara Hidetoshi, Saitoh Shinichi, Tanaka Nobuyuki, Tsuchiya Norihiko, Asao Hironobu	4. 巻 22
2. 論文標題 GPI-80 Augments NF- κ B Activation in Tumor Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12027 ~ 12027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222112027	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 Tanaka Hisashi, Hasegawa Yukihiro, Fujita Yuka, Nakamura Atsushi, Kikuchi Eiki, Kawai Yasutaka, Harada Toshiyuki, Watanabe Naomi, Yokouchi Hiroshi, Usui Kazuhiro, Saito Ryota, Watanabe Hiroshi, Masuda Tomomi, Fukuhara Tatsuro, Kudo Keita, Honda Ryoichi, Oizumi Satoshi, Maemondo Makoto, Inoue Akira, Morikawa Naoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Randomized phase 2 study comparing irinotecan versus amrubicin as maintenance therapy after first line induction therapy for extensive disease small cell lung cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2113~2121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14048	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 Satouchi Miyako, Nosaki Kaname, Takahashi Toshiaki, Nakagawa Kazuhiko, Aoe Keisuke, Kurata Takayasu, Sekine Akimasa, Horiike Atsushi, Fukuhara Tatsurora	4. 巻 112
2. 論文標題 First line pembrolizumab vs chemotherapy in metastatic non small cell lung cancer: KEYNOTE 024 Japan subset	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 5000~5010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15144	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 Izumi Hiroki, Matsumoto Shingo, Liu Jie, Tanaka Kosuke, Mori Shunta, Hayashi Kumiko, Kumagai Shogo, Shibata Yuji, Hayashida Takuma, Watanabe Kana, Fukuhara Tatsuro	4. 巻 600
2. 論文標題 The CLIP1-LTK fusion is an oncogenic driver?in non small cell lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 319~323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04135-5	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 Oizumi Satoshi, Takamura Kei, Harada Toshiyuki, Tachihara Motoko, Morikawa Naoto, Honda Ryoichi, Watanabe Satoshi, Asao Tetsuhiko, Kunisaki Mamoru, Fukuhara Tatsuro, Hokkaido Lung Cancer Clinical Study Group	4. 巻 27
2. 論文標題 Phase II study of carboplatin-paclitaxel alone or with bevacizumab in advanced sarcomatoid carcinoma of the lung: HOT1201/NEJ024	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 676~683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-02113-5	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 O'Byrne K.J., Lee K.H., Kim S.-W., Park K., Nishio M., Sakai H., Ohe Y., Fukuhara T., Kang J.-H., Daga H., Yu C.-J., Hotta K., Tanaka H., Takeda M., Yokoyama T., Nathan F.E., Lee J.-S.	4. 巻 7
2. 論文標題 First-line nivolumab+ ipilimumab in advanced NSCLC: CheckMate 227 subpopulation analyses in Asian patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ESMO Open	6. 最初と最後の頁 100394 ~ 100394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.esmoop.2022.100394	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 Ito Takashi, Nagashima Hiromi, Akiyama Masachika, Utsumi Yu, Sato Hideomi, Chiba Shinji, Sugai Mayu, Ube Kenji, Mori Yoshiaki, Watanabe Kana, Fukuhara Tatsuro, Maemondo Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Treatment with immune checkpoint inhibitors after EGFR-TKIs in EGFR-mutated lung cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 386 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14267	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 T.Fukuhara, H.Saito, N.Furuya, K.Watanabe, S.Sugawara, S.Iwasawa, Y.Tsunezuka, O.Yamaguchi, M.Okada, K.Yoshimori, I.Nakachi, A.Genma, K.Azuma, F.Kurimoto, Y.Tsubata, Y.Fijita, H.Nagashima, G.Asai, S.Watanabe, M.Miyazaki, K.Hagiwara, T.Nukiwa, S.Morita, K.Kobayashi, M.Maemondo	4. 巻 57
2. 論文標題 Evaluation of plasma EGFR mutation as an early predictor of response of erlotinib plus bevacizumab treatment in the NEJ026 study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2020.102861	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 M.Satouchi, K.Nosaki, T.Takahashi, K.Nakagawa, K.Aoe, T.Kurata, A.Sekine, A.Horiike, T.Fukuhara, S.Sugawara, S.Umemura, H.Saka, I.Okamoto, N.Yamamoto, H.Sakai, K.Kishi, N.Katakami, H.Horinouti, T.Hida, H.Okamoto, S.Atagi, T.Ohira, S.Rong Han, K.Noguchi, V.Ebiana, K.Hotta	4. 巻 111
2. 論文標題 First-line pembrolizumab vs chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer: KEYNOTE-024 japan subset.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4480-4489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14647.	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 K.Watanabe, Y.Toi, A.Nakamura, R.Chiba, M.Akiyama, J.Sakakibara-Konishi, H.Tanaka, N.Yoshimura, E.Miyauchi, T.Nakagawa, R.Igusa, H.Minemura, Y.Mori, K.Fujimoto, H.Matsushita, F.Takahashi, T.Fukuhara, A.Inoue, S.Sugawara, M.Maemonndo	4. 巻 10
2. 論文標題 Randomized phase II trial of uracil/tegafur and cisplatin versus pemetrexed and cisplatin with concurrent thoracic radiotherapy for locally advanced unresectable stage III non-squamous non-small cell lung cancer: NJLCC1001	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Lung Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 712-722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-20-721	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小林真紀、小鎌直子、小嶋克彦、福原達朗、田中伸幸
2. 発表標題 A novel not- IL-2 elicits potent anti-tumor activity in mice by improving the effector to regulatory T cell balance.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Nakagawa, T. Fukuhara, K. Imai, R. Igusa, H. Yokota, K. Watanabe, A. Suzuki, M. Morita, A. Inoue, M. Miura, Y. Minamiya, M. Maemondo
2. 発表標題 A Prospective Observational Study of Osimertinib Using Plasma Concentrations in NSCLC With Acquired EGFR T790M Mutation.
3. 学会等名 2021 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M Maemondo, T Fukuhara, H Saito, N Furuya, K Watanabe, S Sugawara, S Iwasawa, Y Tsunozuka, O Yamaguchi, M Okada, K Yoshimori, I Nakachi, A Genma, K Azuma, K Hagiwara, T Nukiwa, S Morita, K Kobayashi
2. 発表標題 Final overall survival analysis of bevacizumab plus erlotinib treatment for NSCLC patients harboring activating EGFR-mutations (NEJ026)
3. 学会等名 ASCO Annual Meeting Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 KJ O'Byrne, KH Lee, S-W Kim, K Park, M Nishio, H Sakai, Y Ohe, T Fukuhara, J Kang, H Daga, M Takeda, T Yakoyama, FE Nathan, JLee
2. 発表標題 First-line pemburilizumzb vs chemotherarapy in metastatic non-small-cerll lung cancer: KEYNOTE-024 japan subse
3. 学会等名 ESMO Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福原達朗, 古谷直樹, 齋藤春洋, 渡邊香奈, 菅原俊一, 岩沢俊一郎, 常塚宣男, 山口央, 岡田守人, 吉森浩三, 仲地一郎, 弦間昭彦, 東一, 萩原弘一, 貫輪敏博, 森田智視, 小林国彦, 前門戸任
2. 発表標題 Overall survival and ctDNA analysis of bevacizumab plus erlotinib treatment for EGFR-mutant NSCLC patients in NEJ026
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野邦夫, 渡邊香奈, 秋山真親, 千葉亮祐, 長島広相, 佐藤英臣, 菅井万優, 寺崎浩司, 福原達朗, 前門戸
2. 発表標題 EGFR阻害薬で治療された腫瘍におけるT790M耐性変異および活性型変異のシスおよびトランス頻度
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
研究分担者	田中 伸幸 (Tanaka Nobuyuki) (60280872)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長 (81303)	

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