

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16385

研究課題名(和文) エクソソームを活用した第三世代EGFR-TKI耐性化バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Development of an exosome-based biomarker for third-generation EGFR-TKI resistance

研究代表者

新谷 拓也 (Shintani, Takuya)

大阪大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：40762076

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)：上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)の耐性獲得は肺がん薬物療法の課題であり、その診断には患者負担の大きい組織生検が必要である。低侵襲に診断可能なバイオマーカー開発を目指し、エクソソーム(EVs)に着目して耐性獲得に寄与する因子の同定を試みた。ヒト肺がん細胞(PC9)と、第三世代EGFR-TKI(オシメルチニブ)に耐性獲得した細胞(PC90R)が放出したEVsを解析した結果、PC90R由来EVsに発現増加を認める6つのmiRNAを同定し、中でもmiR-130a-3pがオシメルチニブ耐性獲得に関わる重要な分子であ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

本研究で、新たにエクソソーム中miR-130a-3pが、複数のヒト肺がん細胞株においてオシメルチニブ耐性を誘導することを示した。エクソソーム中miRNAは、病態を表す低侵襲な診断ツールとして期待されている。がん細胞が放出するエクソソームは血中に移行し、全身を循環すると考えられており、血中のmiR-130a-3pはEGFR-TKIの薬効を予測する新規バイオマーカーとなりうる可能性があり、肺がん薬物療法の個別適正化・医療経済効果への波及も考えられる。また、miR-130a-3pを標的とした新規治療法の開発は、EGFR-TKI耐性の克服にも寄与する可能性もあり、今後の更なる研究の発展に期待される。

研究成果の概要(英文)：The acquisition of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) is one of the major problems in lung cancer pharmacotherapy. Since the diagnosis of resistance requires patient-intensive tissue biopsy, we conducted this study to develop a new biomarker utilizing extracellular vesicles (EVs), which is useful for liquid biopsy. Using human EGFR mutation-positive lung cancer cells (PC9) and third-generation EGFR-TKI (osimertinib)-resistant cells (PC90R), we found that PC90R-EVs and EVs-miRNAs induced osimertinib resistance. Microarray analysis identified six miRNAs (miR-18a-5p, miR-20b-5p, miR-130a-3p, miR-378a-3p, miR-378f, and miR-424-3p) that were upregulated in PC90R-EVs. We showed that miR-130a-3p was also upregulated in EVs derived from other resistant cells and induced osimertinib resistance. The pathway analysis suggested the involvement of TSC1/mTOR signaling as a mechanism. Our study is expected to contribute to the individualized medication of lung cancer.

研究分野：医療薬学

キーワード：miR-130a-3p オシメルチニブ耐性 EGFR-TKI エクソソーム 肺がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子変異陽性の肺癌において、EGFR-TKI は高い有効性が示されているが、一定期間投与を継続すると癌細胞は耐性を獲得し、進行再発を来することが知られている。第一世代・第二世代 EGFR-TKI 耐性化機序として EGFR 遺伝子の「T790M 変異」が広く知られており、T790M を標的とした第三世代 EGFR-TKI オシメルチニブが開発された。近年、オシメルチニブは適応拡大に伴い初期治療からでも使用可能となったことから、肺癌診療ガイドライン 2018 年 ver1.1 においても一次治療に推奨されている。一方、T790M 変異とは別のオシメルチニブ特有の耐性獲得機構の存在が明らかとなりつつあるが、その全容の解明には至っていない。

近年、疾患部位の組織採取を行わず、体液を用いることで、低侵襲的にバイオマーカーを測定・診断する liquid biopsy が注目されている。liquid biopsy の解析対象としては、血中循環腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cells) もしくは癌細胞に由来する DNA (ctDNA; Circulating tumor DNA) がよく知られている。CTC や ctDNA は癌細胞が転移する際に検出されることが予想されるため、早期診断には不向きと考えられている。この課題を克服する可能性があるとして細胞外小胞;エクソソームが注目されている。癌細胞のエクソソームを介した薬剤耐性化は、複数の癌種、薬剤について報告されており、エクソソームは薬剤耐性の予測バイオマーカーとして有効な可能性があると考えられる。ただし、オシメルチニブ耐性へのエクソソームの関与についての報告は存在しない。

### 2. 研究の目的

オシメルチニブの薬効予測バイオマーカーの開発を目指し、エクソソームを活用した新たな耐性化関連因子を同定する。

### 3. 研究の方法

#### 1) オシメルチニブ耐性培養細胞の樹立

2 種類のヒト EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌細胞株 (PC9, H1975) について、オシメルチニブ 5nM を含む培地で培養し、6 か月かけて 1 $\mu$ M まで漸増することでオシメルチニブ耐性細胞株 (PC9OR, H1975OR) を樹立した。オシメルチニブに対する感受性は、生細胞内の ATP 量の定量にて、オシメルチニブ添加後の細胞生存率を測定することで評価した。また、ルシフェラーゼ結合アネキシン V を用いて、オシメルチニブ添加後の経時的なアポトーシスレベルについても定量評価した。耐性細胞のプロファイルについては、ウエスタンブロット法、サンガー法によるシーケンズ解析を行い、既知の耐性化メカニズムを検討した。

#### 2) エクソソームの単離

PC9 及び PC9OR 細胞をエクソソーム不含有 10%FBS 入り RPMI1640 培地で 7 日間培養し、培養上清を回収後、ポリマー沈降法を用いてエクソソームを分離した。分離したエクソソームはマーカータンパク質である CD9 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法によって形態を観察し、CD9 及び CD81 抗体を用いたウエスタンブロット法にて存在の確認を行った。また、ナノ粒子解析装置を用いて、分離したエクソソームの粒子数や粒子径とそれらの分布を解析した。BSA 法にて回収したエクソソームのタンパク質量を定量し、CD9 及び CD63 抗体を用いたエクソソーム数計測システムを用いてエクソソーム数を測定した。

#### 3) エクソソームの機能解析

PC9OR 細胞の培養上清から回収したエクソソームが、PC9 細胞に取り込まれることを確認するために、PC9OR 細胞由来エクソソーム 5 $\mu$ g について膜特異的な蛍光染色後、PC9 細胞に添加し、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。またエクソソームのオシメルチニブ感受性への影響を検討するために、PC9 細胞 (細胞数 5000/well) を 96well プレートに播種の際に、PC9 細胞または PC9OR 細胞由来エクソソーム 5 $\mu$ g を加え、24 時間後にオシメルチニブを添加し、72 時間後の細胞生存率を ATP 量の定量にて算出した。また、エクソソーム由来 miRNA の影響については、エクソソームから Total miRNA を抽出し、トランスフェクション試薬を用いて PC9 細胞に導入後、同様に細胞生存率を算出することで評価した。

#### 4) 候補 miRNA の同定

PC9 及び PC9OR 細胞培養上清から単離したエクソソームから miRNA を抽出し、Total miRNA 400ng を用いて、miRNA アレイ解析を行った。測定結果の Quality をパスした homo sapiens の miRNA について、PC9OR/PC9 の比率の高い上位 12miRNA について、特異的なプライマーを作成し、real time RT-PCR 法を用いてバリデーションを行った。内在性コントロールとして U6 を用いた。PC9OR 由来エクソソームで有意な上昇があった miRNA について、PC9 と PC9OR 細胞内の miRNA の解析及び別の耐性細胞株 (H1975OR) 由来エクソソーム内の miRNA について解析を加え、候補 miRNA の絞り込みを行った。

#### 5) 候補 miRNA の機能解析

候補 miRNA のミミック (10nM) を、PC9 及び H1975 細胞にトランスフェクションし、24 時間後にオシメルチニブを添加、72 時間後に細胞生存率を測定し、オシメルチニブ感受性に与える影響を検討した。また、miRNA ミミックをトランスフェクションし、オシメルチニブ添加後、経時的なアポトーシスレベルを定量することによって評価した。候補 miRNA のターゲット遺伝子は、miRDB (<https://mirdb.org/>) 及び TargetScan ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) を用いて同定した。推定されたターゲット遺伝子群について、DAVID gene annotation tool (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて、KEGG パスウェイ解析を実施した。候補 miRNA との結合が予測される遺伝子については、候補 miRNA のミミックを導入後、ウエスタンブロット法にてターゲットとなるタンパク質を解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) オシメルチニブ耐性培養細胞の樹立

オシメルチニブ耐性細胞株 (PC9OR, H1975OR) は、オシメルチニブ処理後の細胞生存率が有意に増加していた。また、PC9OR は、PC9 に比較して、オシメルチニブ 1 $\mu$ M 添加後 48 時間、72 時間後のアポトーシスレベルが有意に低下していた。EGFR 遺伝子のチロシンキナーゼドメイン (exon18-21) についてシークエンス解析を行ったところ、PC9 と PC9OR の遺伝子配列に差は認めなかった。一方、PC9OR は P-Akt レベルが増加しており、EGFR 経路以外のバイパスシグナルの活性化によってオシメルチニブ耐性が生じていることが示唆された。

##### 2) エクソソームの単離

PC9 及び PC9OR 細胞の培養上清からエクソソームを単離し、免疫電子顕微鏡法によって膜表面の CD9 に結合した金コロイド粒子を含む直径およそ 100nm の二重膜を持つ小胞の存在を確認した。また、ウエスタンブロット法にて、CD9 及び CD81 抗体のバンドを確認した。エクソソームの粒子径やその分布については、PC9 と PC9OR と同様の結果が得られた。一方、エクソソームのタンパク質量は、PC9 に比べ、PC9OR で有意に高く、CD9/CD63 陽性のエクソソーム数も有意に高値を認めた。以上から、オシメルチニブ耐性細胞ではより多くのエクソソームを放出していることが示唆された。

##### 3) エクソソームの機能解析

PC9OR 細胞の培養上清から回収したエクソソームを蛍光染色し、PC9 細胞に処理したところ、PC9 細胞上に蛍光が局在しており、PC9OR 細胞由来のエクソソームの PC9 細胞への取り込みが確認できた。次に、PC9OR 細胞由来エクソソームを PC9 細胞に処理したところ、オシメルチニブ添加後の細胞生存率が有意に増加した。PC9OR 細胞由来エクソソーム中の Total miRNA レベルは PC9 細胞に比べ有意に高いことが確認できたため、PC9OR 細胞由来エクソソーム中の Total miRNA を PC9 細胞に導入したところ、オシメルチニブ添加後の細胞生存率が Total miRNA の用量依存的に増加した。以上から、オシメルチニブ耐性細胞から放出されるエクソソーム内の miRNA はオシメルチニブ耐性を誘導する機能を有していることが示唆された。

##### 4) 候補 miRNA の同定

PC9 及び PC9OR 細胞由来エクソソームの miRNA Array 解析の結果、6599 の miRNA が同定された。PC9OR 細胞由来エクソソーム中に高発現していた上位 12 の miRNA について real time RT-PCR 解析を行ったところ、miR-18a-5p、miR-20b-5p、miR-130a-3p、miR-378a-3p、miR-378f、miR-424-3p が有意に高発現していることが明らかとなった。PC9OR 細胞内の上記 6 つの miRNA を定量したところ、miR-130a-3p、miR-378a-3p、miR-424-3p が PC9OR 細胞内でも高発現していることを見出した。また、H1975OR 細胞由来エクソソーム中の miRNA を定量したところ、miR-130a-3p のみが高発現していることを明らかにした。

##### 5) 候補 miRNA の機能解析

miR-130a-3p ミミックを、PC9 及び H1975 細胞に導入し、オシメルチニブ添加後の細胞生存率を解析した結果、どちらの細胞でも有意に細胞生存率が上昇した。さらに、miR-130a-3p ミミックの導入は、PC9 及び H1975 細胞のオシメルチニブで誘発したアポトーシスレベルを有意に低下させた。以上から、オシメルチニブ耐性細胞が放出するエクソソームに内包される miR-130a-3p がオシメルチニブ耐性を誘導する可能性が示唆された。miR-130a-3p のターゲット遺伝子は、miRDB 及び TargetScan にて予測精度の上位 300 遺伝子を同定し、各データベースに共通する 148 遺伝子を絞り込み、これらの 148 遺伝子について KEGG パスウェイ解析を実施した。その結果、mTOR シグナル、オートファジー、AMPK、FoxO などのシグナルへの関与が示唆された。mTOR シグナルを負に制御する TSC1 遺伝子に着目し、PC9 細胞へ miR-130a-3p ミミック導入後の TSC1 発現をウエスタンブロット法にて確認したところ、TSC1 の有意な減少を示し、miR-130a-3p の TSC1/mTOR シグナルへの関与が示唆された。

以上から、オシメルチニブ耐性細胞が放出するエクソソーム内に含まれる miR-130a-3p はオシメルチニブを誘導する機能を有しており、そのメカニズムの一つとして TSC1/mTOR シグナルへの関与が示唆された。本研究成果は、オシメルチニブ耐性の新たなメカニズムを解明し、バイオマ

ーカーや新規治療法の開発の基盤となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 MIHO TAKEMURA, KENJI IKEMURA, TETSUHIRO YOSHINAMI, YUJI TOYOZUMI, TAKUYA SHINTANI, MIKIKO UEDA, KENZO SHIMAZU, MASAHIRO OKUDA	4. 巻 42
2. 論文標題 Proton Pump Inhibitors Ameliorate Capecitabine-induced Hand-Foot Syndrome in Patients With Breast Cancer: A Retrospective Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 2591-2598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.15737	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 Haruka Yokoyama, Wataru Shioyama, Takuya Shintani, Shinichiro Maeda, Sachiko Hirobe, Makiko Maeda, Yasushi Sakata, Yasushi Fujio	4. 巻 62(6)
2. 論文標題 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitors Impair Left Ventricular Diastolic Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 1297-1304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.21-307	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 Lin Ying, Higashisaka Kazuma, Shintani Takuya, Maki Ayaka, Hanamuro Sachiyo, Haga Yuya, Maeda Shinichiro, Tsujino Hirofumi, Nagano Kazuya, Fujio Yasushi, Tsutsumi Yasuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Progesterone receptor membrane component 1 leads to erlotinib resistance, initiating crosstalk of Wnt/ -catenin and NF- B pathways, in lung adenocarcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61727-3	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

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前谷 一仁、新谷 拓也、池村 健治、渡邊 梓、山本 智也、奥田 真弘
2. 発表標題 抗PD-1抗体薬の長期投与を予測する治療前検査値に関する探索的研究
3. 学会等名 第32回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村山 真人、新谷 拓也、白山 敬之、池村 健治、有持 潤子、山本 智也、奥田 真弘
2. 発表標題 肺がん患者における免疫チェックポイント阻害薬併用レジメンの治療効果に対する胃酸分泌抑制薬の影響
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 伸輔、田中 晃司、新谷 拓也、廣部 祥子、山本 智也、奥田 真弘
2. 発表標題 切除不能進行・再発食道癌に対するパクリタキセル+S-1併用療法の安全性と治療効果に関する後方視的検討
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuji Toyozumi, Takuya Shintani, Yu-Ting Shun, Kenji Ikemura, Masahiro Okuda
2. 発表標題 Extracellular vesicle-derived miR-130a-3p regulates osimertinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines
3. 学会等名 第16回 次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勇 佳菜江、新開 裕幸、新谷 拓也、徳永 あゆみ、北村 温美、中島 和江
2. 発表標題 医療安全活動における看護師及び薬剤師GRMとの協働によるシナジー効果
3. 学会等名 第17回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新谷 拓也、佐藤 仁、中村 京太、木下 徳康、勇 佳菜江、西本 真太郎、宇留野 達彦、平野 匠、徳永 あゆみ、中島 和江
2. 発表標題 薬剤師と多職種をつなぐ：薬剤師向け急変対応教育の実践
3. 学会等名 第17回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹村 美穂、池村 健治、新谷 拓也、上田 幹子、奥田 真弘
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病患者におけるダサチニブの治療効果に及ぼすフェブキソスタット併用の影響
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yu-Ting Shun, Takuya Shintani, Yuji Toyozumi, Kenji Ikemura, Masahiro Okuda
2. 発表標題 Extracellular vesicle-derived miRNAs regulate osimertinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines
3. 学会等名 the 21st Asian Conference on Clinical Pharmacy (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 伸輔、新谷拓也、山本智也、奥田真弘
2. 発表標題 肝細胞癌におけるレンパチニブ副作用発現予測補助ツールの実用性に関するパイロット調査
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原伸輔、坂井大介、新谷拓也、山本智也、佐藤太郎、奥田真弘
2. 発表標題 トリフルリジン / チピラシルの投与スケジュール変更における有効性と安全性の後視的検討
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷 拓也,北村 温美,門脇 裕子,奥田 真弘,中村 京太,中島 和江
2. 発表標題 免疫抑制・化学療法によるB型肝炎の再活性化予防対策に関する実態調査
3. 学会等名 第16回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下徳康、新谷拓也、廣部祥子、中村京太、前田真一郎、奥田真弘
2. 発表標題 アクティブラーニングを取り入れた薬学生医療安全教育プログラムの開発及びテキストマイニングを用いた評価
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷拓也、木下徳康、百田真弓、徳永あゆみ、新開裕幸、北村温美、奥田真弘、中村京太
2. 発表標題 多職種協働で作成した内服薬経管投与に関するe-ラーニング教材の有用性
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 西本真太郎、中村京太、北村温美、徳永あゆみ、上間あおい、新谷拓也、佐々木一樹、新開裕幸、百田真弓、中島和江
2. 発表標題 「安全なワクチン接種のための11 Tips」の開発
3. 学会等名 第16回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 百田真弓、新開裕幸、新谷拓也、上間あおい、佐々木一樹、徳永あゆみ、北村温美、佐藤仁、中村京太
2. 発表標題 当院におけるインシデントレポートを有効活用するための取り組み インシデントレポートモニター制度についてー
3. 学会等名 第16回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷拓也、横山晴香、渡邊梓、山本智也、門脇裕子、藤尾慈、奥田真弘
2. 発表標題 低心機能症例における経口VEGF経路阻害剤の安全性に関する検討
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口尋子、新谷拓也、原伸輔、山本智也、門脇裕子、坂井大介、佐藤太郎、奥田真弘
2. 発表標題 レゴラフェニブによる肝障害のリスク因子の探索
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河越千恵、新谷拓也、原伸輔、山本智也、門脇裕子、坂井大介、佐藤太郎、奥田真弘
2. 発表標題 大腸癌における抗EGFR抗体薬による皮膚障害に対するミノサイクリンの投与量及び開始時期に関する研究
3. 学会等名 第42回日本病院薬剤師会近畿学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山晴香、新谷拓也、前田真一郎、廣部祥子、前田真貴子、藤尾慈
2. 発表標題 血管内皮増殖因子受容体阻害薬が左室拡張機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新谷 拓也、木下 徳康、原 伸輔、徳永 あゆみ、北村 温美、奥田 真弘、 中村 京太
2. 発表標題 薬剤師外来による長期介入の現状とその意義
3. 学会等名 第15回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下徳康、北村温美、徳永あゆみ、新谷拓也、中村京太、中島和江
2. 発表標題 免疫抑制剤・化学療法に伴うB型肝炎ウイルス再活性化予防システムの評価と課題
3. 学会等名 第15回医療の質・安全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富原莉穂子、新谷拓也、原伸輔、山本智也、門脇裕子、奥田真弘
2. 発表標題 外来化学療法のレジメン監査における事前疑義照会の意義の検証
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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