

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17200

研究課題名（和文）アポトーシス調整因子を標的とした非小細胞肺癌の新規治療法の開発～根治を目指して～

研究課題名（英文）Novel strategy targeting apoptosis regulators for non-small cell lung cancer

研究代表者

中道 真仁（Nakamichi, Shinji）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10837446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：予後不良である進行非小細胞肺癌の耐性メカニズムを細胞死（アポトーシス）の観点から解析し、新規治療法を開発することを目的とした。EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌細胞株を用いてEGFRチロシンキナーゼ阻害剤のオシメルチニブ耐性細胞を作成し、耐性細胞においてリン酸化ERKの発現が有意に上昇していることに注目し、FOXO3aがBIMを通じたアポトーシス抵抗性と関連することを確認した。FOXO3a阻害作用のあるカルノシン酸、ERK阻害剤、プロテアソーム阻害剤が有望な新規治療法である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行肺癌の薬物治療において分子標的治療は劇的な効果を示すが、その薬剤獲得耐性が問題であり、以前として予後は厳しいままである。本研究は、アポトーシスに着目したこれまでの治療と異なる新しい視点から、肺癌において分子標的薬剤の獲得耐性の分子病態メカニズムを解明し、薬剤耐性を克服する新規薬物療法戦略を提案した点において学術的意義や社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Molecular targeted therapy has shown dramatic efficacy in the treatment of lung cancer. However, drug resistance is a critical problem, and the prognosis of lung cancer remains poor. This study aimed to analyze the resistant mechanism of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) from the point of apoptosis and to develop a novel therapeutic strategy. Using EGFR mutation-positive NSCLC cells, we generated osimertinib-resistant cells. We confirmed that the expression of phosphorylated ERK was significantly upregulated in all resistant cells and associated with resistance to apoptosis through BIM. The efficacy of carnosic acid, ERK inhibitor, and proteasome inhibitor on resistant cells was confirmed. Our data suggested that FOXO3a is associated with apoptosis resistance, and these drugs may be promising new therapies.

研究分野：肺癌、薬剤耐性、抗悪性腫瘍薬、薬物療法

キーワード：肺癌 薬剤耐性 薬物療法 分子標的薬

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。

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の肺癌の死亡数は2016年度には73838人であり、全がん死亡例の第1位で約20%を占める。非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer: NSCLC) は、肺癌の約85%を占め、肺癌に伴う症状を契機に発見された場合の多くは切除不能 III 期、IV 期の進行がんであり、薬物療法での根治は不可能である。

進行 NSCLC 患者に対する新規薬物療法であるドライバー遺伝子に対する分子標的薬の登場により治療成績は著しく改善し、分子標的治療薬の有効性を検証する臨床試験では2-3年以上の全生存期間中央値にまで延長した。その後、免疫チェックポイント阻害剤による免疫療法の普及もあり、治療成績はさらに進歩しつつあるものの、薬物療法のみで根治は不可能であり、薬剤獲得耐性が不可避であることもわかってきた。NSCLC の約50%に見られる EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) や約3-5%に見られる ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する ALK 阻害剤の耐性メカニズムについては、二次変異、バイパス経路、上皮間葉移行、癌幹細胞などが報告されている。獲得耐性となった肺癌の新たな標的分子を別の薬剤でさらに抑制したとしても、またその薬剤に対する耐性の問題が生じるため、イタチごっこの状態になっており、現状の治療方法とは全く別の根本的な新規薬物治療戦略が求められている。

抗癌薬物療法において、アポトーシスとその制御メカニズムは、非常に重要な役割を果たしており、従来のシスプラチンなどの細胞傷害性抗癌剤では、DNA 損傷を引き起こし、内因性経路を通じてアポトーシスを誘導することがわかっている。EGFR 陽性肺癌においては、アポトーシス抵抗性が EGFR-TKI 耐性を早期に誘導する因子として報告されており、BIM が中心的な役割を担うことが報告されている (PLoS Med 2007;4:1669-79, Clin Cancer Res 2017;23:3139-3149)。また、BIM 遺伝子に特定の多型を有すると活性型 BIM タンパクの発現が低下し、EGFR-TKI によるアポトーシスに抵抗性を示すことも報告されており (Nat Med 2012;18:521-8)、BIM 遺伝子多型を有する EGFR 陽性肺癌に対して EGFR-TKI と HDAC 阻害剤併用治療の有効性も報告されている (Cancer Res 2013;73:2428-34)。しかし、BIM 遺伝子多型に起因しないアポトーシス抵抗性の分子機構についてははっきりしない点も多い。分子標的薬の耐性メカニズムとアポトーシス抵抗性の分子病態に基づく標的因子に対する治療戦略は現在まで提案されておらず、アポトーシスに着目した新規治療戦略は、肺癌においては全く異なる視点からの新規治療となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

進行 NSCLC は、薬物療法にては根治せず、獲得耐性が不可避であり、予後も短い。どのような薬物療法においても、薬剤の獲得耐性が不可避であるため、従来の治療戦略とは全く別の根本的な新規治療戦略が求められている。

本研究の目的は、分子標的薬耐性非小細胞肺癌に対するアポトーシスに着目した抜本的な新規治療戦略を発見することである。本研究では、BIM を調節する転写因子の FOXO (Forkhead Box 0) に着目する。FOXO は DNA 結合ドメイン FOX (Forkhead box) を持つ Forkhead ファミリーのサブグループ "0" に属する転写因子であり、哺乳類では FoxO1, FoxO3a, FoxO4, FoxO6 があり、アポトーシスに関連する多くの遺伝子発現の促進機能が知られている。FOXO3a の抑制が EGFR-TKI の一つであるゲフィチブ耐性を誘導する報告 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:E2526-35.) や、ERK によりリン酸化された FOXO3a が核外 (細胞質) へ移行して MDM2 によるユビキチン化により分解され、FOXO3a の転写活性が抑制され、BIM の発現が低下し、アポトーシス抵抗性となる報告 (Nat Cell Biol 2008;10:138-48) がされている。

本研究では、現在 EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の第一選択薬であるオシメルチニブ耐性が誘導されるメカニズムを、FOXO3a を中心としたアポトーシス抵抗性の分子病態を解析することで解明し、薬剤耐性を克服する新規治療法を模索し提案することを目的とした。

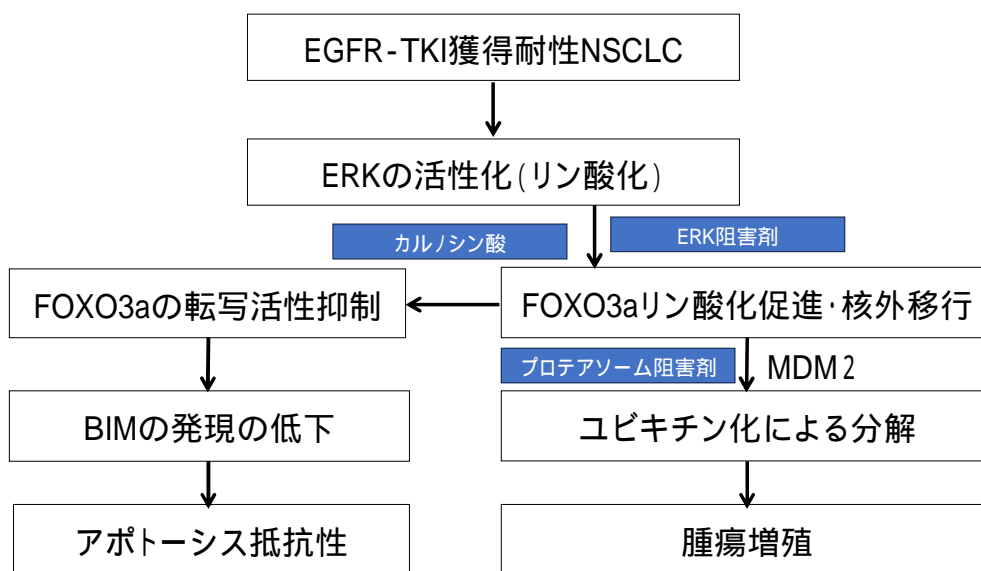
## 3. 研究の方法

- (1) オシメルチニブ耐性 NSCLC 細胞の作成
  1. EGFR 陽性 NSCLC 細胞株 (PC9, HCC827, H1975, H1650) を用いる
  2. ステップワイズ法にてオシメルチニブに対する薬剤耐性細胞をそれぞれ作成する。
- (2) オシメルチニブ耐性化の確認
  1. Cell counting kit 8 を用いた Cell viability assay にて、オシメルチニブ耐性細胞の薬剤感受性と IC50 を測定・計算し、オシメルチニブに対する耐性化を確認する。
  2. オシメルチニブ耐性細胞における EGFR 遺伝子変異の点突然変異の有無の確認とバイパス経路と考えられるパスウェイのタンパク発現解析をウェスタンブロットにて行う。
- (3) アポトーシス関連因子の解析

1. 親細胞株と作成したオシメルチニブ耐性細胞を用いて、ERK、pERK、FOXO3a、pFOXO3a、BIMを含むアポトーシス関連因子のタンパクレベルとRNAレベルでの発現差比較と機能解析を、RNAを用いたqRT-PCRとウェスタンブロットを中心に行う。
  2. 親細胞株とオシメルチニブ耐性細胞におけるオシメルチニブ暴露によるアポトーシス発現を免疫蛍光染色やフローサイトメトリーを用いて確認する
- (4) FOXO3aの機能解析
1. 免疫蛍光細胞染色を行い、Foxo3aのリン酸化促進と核外への移行を蛍光顕微鏡にて確認する。
  2. siFoxo3aを用いてFoxo3をノックダウンすることにより、Foxo3aに関連する因子の変化をウェスタンブロットにて確認する。
- (5) 治療候補薬剤の同定
1. Foxo3a、2. ERK、3. pFoxo3aのコビキチン化、それぞれを対象とした治療候補薬剤（カルノシン酸、SCH240205、ボルテゾミブ）を用いて、親細胞とオシメルチニブ耐性細胞における感受性を測定し、最適な治療方法の検討を行う。

#### 4. 研究成果

- (1) EGFR遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌細胞株4種類(PC9、H1975、HCC827、H1650)を用いて、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるオシメルチニブ耐性細胞をステップワイズ法にてそれぞれ作成した。
- (2) 作成した耐性細胞を用いて薬剤感受性とIC50を計算し、オシメルチニブに対する耐性化を確認した。いずれもオシメルチニブに対する感受性は親株と比較して、10倍以上と良好であった。
- (3) 親細胞株と耐性細胞における、ERK、FOXO3a、BIMを含むアポトーシス関連因子の発現をウェスタンブロットで確認した。全ての耐性細胞において、リン酸化ERKの発現が有意に上昇していることを確認した。一部の耐性細胞においては、リン酸化FOXO3aが核外(細胞質)へ移行してMDM2によるユビキチン化により分解され、FOXO3aの転写活性が抑制されることで、BIMの発現が低下し、アポトーシス抵抗性となっていることを確認した。
- (4) 耐性細胞に対するFOXO3a阻害作用のあるカルノシン酸、ERK阻害剤、プロテアソーム阻害剤(ボルテゾミブ)の効果をCell viability assayとウェスタンブロットにより確認し、新規治療戦略としての薬剤の候補であることを確認した(図1)



(図1: Foxo3aを中心とした薬剤耐性メカニズムと新規治療戦略)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 TAKANO NATSUKI, SEIKE MASAHIRO, SUGANO TEPPEI, MATSUDA KUNIKO, HISAKANE KAKERU, YOSHIKAWA AKIKO, NAKAMICHI SHINJI, NORO RINTARO, GEMMA AKIHIKO	4. 巻 42
2. 論文標題 A Novel Molecular Target in EGFR-mutant Lung Cancer Treated With the Combination of Osimertinib and Pemetrexed	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 709 ~ 722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15529	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 Hisakane Kakeru, Seike Masahiro, Sugano Teppei, Matsuda Kuniko, Kashiwada Takeru, Nakamichi Shinji, Matsumoto Masaru, Miyanaga Akihiko, Noro Rintaro, Kubota Kaoru, Gemma Akihiko	4. 巻 857
2. 論文標題 Serum-derived exosomal miR-125a-3p predicts the response to anti-programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 monotherapy in patients with non-small cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 147177 ~ 147177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2023.147177	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 TAKANO NATSUKI, SEIKE MASAHIRO, SUGANO TEPPEI, MATSUDA KUNIKO, HISAKANE KAKERU, YOSHIKAWA AKIKO, NAKAMICHI SHINJI, NORO RINTARO, GEMMA AKIHIKO	4. 巻 42
2. 論文標題 A Novel Molecular Target in <i>EGFR</i> -mutant Lung Cancer Treated With the Combination of Osimertinib and Pemetrexed	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 709 ~ 722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15529	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Satoshi, Noro Rintaro, Seike Masahiro, Zeng Chao, Matsumoto Masaru, Yoshikawa Akiko, Nakamichi Shinji, Sugano Teppei, Hirao Mariko, Matsuda Kuniko, Hamada Michiaki, Gemma Akihiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Long Non-Coding RNA CRNDE Is Involved in Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor in EGFR-Mutant Lung Cancer via eIF4A3/MUC1/EGFR Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4005 ~ 4005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22084005	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 該当する

1. 著者名 Nakajima Wataru, Nakamichi Shinji, Suzuki Hidenori, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibitory Effect of Cytoprotective Autophagy Against the Anticancer Activity of Tyrosine Kinase Inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nihon Ika Daigaku Igakkai Zasshi	6. 最初と最後の頁 184 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/manms.16.184	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 Tozuka Takehiro, Noro Rintaro, Yoshida Keisuke, Takahashi Satoshi, Hirao Mariko, Matsuda Kuniko, Kato Yasuhiro, Nakamichi Shinji, Takeuchi Susumu, Matsumoto Masaru, Miyanaga Akihiko, Kunugi Shinobu, Honda Kazufumi, Adachi Jun, Seike Masahiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Phosphoproteomic Analysis Identified Mutual Phosphorylation of FAK and Src as a Mechanism of Osimertinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JTO Clinical and Research Reports	6. 最初と最後の頁 100668 ~ 100668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtocrr.2024.100668	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 Onda Naomi, Nakamichi Shinji, Hirao Mariko, Matsuda Kuniko, Matsumoto Masaru, Miyanaga Akihiko, Noro Rintaro, Gemma Akihiko, Seike Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Afinib plus PEM and CBDCA overcome osimertinib-resistance in EGFR-mutated NSCLC with high thrombospondin-1 expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
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 Kato Yasuhiro, Masaru Matsumoto, Takano Natsuki, Hirao Mariko, Matsuda Kuniko, Tozuka - Takehiro, Onda Naomi, Nakamichi Shinji, Takeuchi Susumu, Miyanaga Akihiko, Noro Rintaro, Gemma Akihiko, Seike Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Induction of resistance to neurotrophic tropomyosin-receptor kinase inhibitors by HMGS2 via a 2024年 mevalonate pathway	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中道真仁、野呂林太郎、平尾真季子、松本優、宮永晃彦、久保田馨、清家正博
2. 発表標題 AXL活性化を示すALK 阻害薬耐性肺癌に対するギルテリチニブによる新規治療戦略
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 恩田 直美、中道 真仁、松本 優、宮永 晃彦、野呂 林太郎、清家 正博
2. 発表標題 EGFR陽性肺癌に対するオシメルチニブ耐性後カルボプラチン+ペメトレキセド+アファチニブ併用の有効性
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 高野 夏希、清家 正博、大森 美和子、福泉 彩、久金 翔、中道 真仁、菅野 哲平、松本 優、宮永 晃彦、久保田 馨、弦間 昭彦
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株におけるosimertinibとpemetrexedの併用効果と分子メカニズムの検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 海 中嶋 亘・田中信之 中道真仁・清家正博
2. 発表標題 P - 19 EGFR 変異陽性非小細胞肺癌の EGFR-TKI 抵抗性に伴う SMAD6 過剰発現の分子機構の解析と治療への応用
3. 学会等名 第 88 回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋 亘, 石野孔祐, 中道真仁, 松本優, 大橋隆治, 山本林
2. 発表標題 EGFR変異陽性肺がんにおける薬剤耐性獲得機構の解明と代謝制御を利用した治療法開発
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 恩田直美, 中道真仁, 松本優, 宮永晃彦, 清家正博
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対するオシメルチニブ耐性後のカルボプラチン+ペメトレキセド+アファチニブ併用療法の有効性
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中道 真仁, 中嶋 亘
2. 発表標題 アポトーシス調整因子FOXO3aを標的とした肺癌の新規治療開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 理光, 宮永 晃彦, 松田 久仁子, 中道 真仁, 松本 優, 野呂 林太郎, 久保田 馨, 清家 正博
2. 発表標題 COPD合併肺癌に関するマイクロバイオームの探求(Lung Microbiome Associated with COPD Comorbid Lung Cancer)
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 泰裕, 松本 優, 高野 夏希, 平尾 真季子, 松田 久仁子, 戸塚 猛大, 恩田 直美, 中道 真仁, 武内 進, 宮永 晃彦, 野呂 林太郎, 弦間 昭彦, 清家 正博
2. 発表標題 HMGCS2によるメバロン酸経路を介したNTRK阻害薬に対する耐性誘導とその克服(HMGCS2 Induces resistance to NTRK inhibitors via mevalonate pathway)
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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