

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16417

研究課題名(和文) 消化管間葉系肉腫における化学療法後遺残細胞の代謝変化とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Targeted therapy for drug-tolerant persister cells after imatinib treatment for gastrointestinal stromal tumours

研究代表者

石田 智 (Ishida, Tomo)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60804052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：GISTに対する分子標的治療は高い臨床効果を示す一方で奏効中の治療中止は、再燃を発症することが臨床試験の結果として示され一生涯の治療とされている。遺残細胞がその原因と考えられた。イマチニブを投与後の遺残細胞に対し、網羅的なメタボロミクス解析を実施し、発見した糖代謝に着目し、新規治療法の開発を行った。メタボロミクス解析の結果、遺残細胞内の細胞内グルタチオン濃度、NADPH濃度ともに低下がみられた。さらに細胞内へのグルコースの取り込みが遺残細胞で低下していることを確認した。酸化誘導を生じるフェロトーシス誘導剤であるGPX4阻害薬が効果を示し、新規治療法の開発につなが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

化学療法後の遺残細胞に関しては肺癌・乳癌・皮膚癌などで報告があるが、いずれも「分子標的治療薬投与後」の遺残細胞に共通する現象として捉えられている。GISTは、固形腫瘍における分子標的治療の成功モデルケースであり、その耐性メカニズムの解明は、GISTのみならず肺がん、血液がん、大腸がん等で、分子標的治療薬が用いられるすべての疾患の耐性の解明につながると考えられ非常に大きな意義があると考えられる。さらには、本治療が臨床応用されることで、中止不可能とされているGISTにおけるチロシンキナーゼ阻害剤が有効中止の可能性が社会的にも価値が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Despite the effectiveness of tyrosine kinase inhibitors (TKI), GIST develop after the withdrawal of TKI. Based on previous studies, a subpopulation of drug-tolerant cells called persister cells may be responsible for the recurrence. The metabolic changes were investigated in imatinib-derived persister GIST cells. We investigated the efficacy and the mechanism of GPX4 inhibitor, which is known as a major inducer of ferroptosis. We demonstrated a downregulation of glucose metabolism, subsequent decrease in the glutathione level and sensitivity to glutathione peroxidase 4 (GPX4) inhibitor, RSL3 in persister cells. As the cell death induced by RSL3 was found to be iron-dependent and caspase-independent, loss of GPX4 function could have possibly induced selective persister cell ferroptotic death. In the xenograft model, we confirmed the inhibition of tumour regrowth after discontinuation of imatinib treatment. RSL3 combined with TKI may be a promising therapy for GIST.

研究分野：腫瘍学

キーワード：GIST 遺残細胞 フェロトーシス 分子標的治療

### 1. 研究開始当初の背景

消化管間葉系肉腫 (GIST) は、イマチニブをはじめとする変異 KIT チロシンキナーゼを標的とした分子標的治療の開発導入により、その治療成績が著しく向上したが、一方で GIST に対するイマチニブ治療においては、投与中止後の腫瘍増大・再発が必発であり治療の終了が困難であるといった臨床上的問題点が浮き彫りになってきた。切除不能・再発 GIST 患者に対するイマチニブ治療奏効中の症例に対して、中止・継続を無作為に割り付けた臨床試験 (BFR14 試験) の結果、1年投与、3年投与のみならず5年投与後の中止においても全例で腫瘍の再燃をきたすという事実が明らかとなった。さらには、イマチニブ奏効中に外科切除が行われた切除検体の詳細な検討の結果、viable な腫瘍細胞がごく少量ながらも残存しているといった病理所見が確認された (図 1)。このようなイマチニブ治療下の遺残細胞がイマチニブ治療の中止を困難にするとともに耐性細胞の供給源となりえると考えられている。上記分子標的治療薬の遺残細胞に関する問題は、GIST のみならず、慢性骨髄性白血病、EGFR 変陽性肺癌、EML4-ALK 肺癌等においても認められ、分子標的治療の臨床上的大きな問題となっている。このような背景から、遺残細胞を標的とした治療の開発に関する報告が近年少しずつなされ始めている。薬剤耐性腫瘍の供給源となり癌の再発・転移を誘発するこの遺残細胞の発生メカニズム、ならびに特性をさらに解明することで、GIST のみならず他癌においても治療効果を最大化することが可能であると考えられる。

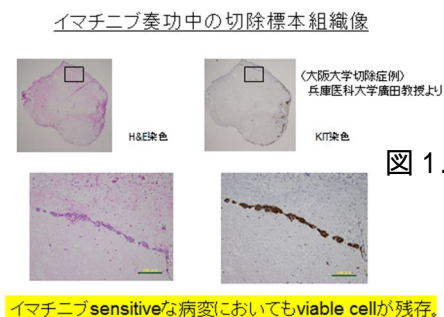


図 1.

### 2. 研究の目的

GIST 細胞株を用いた先行研究からは(1)GIST 細胞株にイマチニブを暴露することで 2 次遺伝子変異を有する耐性 GIST 細胞株を作成可能(図 2)、(2)イマチニブ暴露下の GIST 遺残細胞は、そのほとんどが細胞休止期にある、(3)遺残細胞では、新たな遺伝子変異は認めないが代謝系の分子を中心にその発現が親株や耐性株と大きく異なる(図 3)といった内容を確認している。細胞株を用いた研究において観察しえたこの dormancy な細胞こそが臨床検体においてもイマチニブ投与後に組織に遺残する細胞と同一のものである可能性が示唆された。

本研究の目的は、イマチニブ耐性株を作る過程で収拾し得るイマチニブ治療後の遺残 GIST 細胞における代謝の変化に着目し、遺残細胞に対する新規標的治療を開発することである。

### 3. 研究の方法

細胞内のグルタチオン(GSH)の維持にはNADPHやGSHレダクターゼなどの抗酸化物質が関与している。前述の方法で培養した遺残細胞ならびに親株におけるNADPH、グルタチオンレダクターゼなどの抗酸化物質における代謝の変化を、生化学的手法を用いて検討した。またNADPHの代謝にはペントースリン酸回路を介して糖代謝とも密に関連しているとされる。遺残細胞における細胞内のグルコース濃度、細胞内へのグルコースの取り込み、グルコーストランスポーターの発現など糖代謝・細胞内出納に関連する因子に関しても検討を行った。

さらに遺残細胞における代謝の変化や細胞周期の変化を司るRegulator因子の探索を行った。一般に細胞においてアミノ酸やヘムといった生存に必須な要素が欠乏するなど何らかのストレスがかかった場合、Integrated Stress Response(以下 ISR)と呼ばれる防御機構が働き、細胞生存に適した代謝の変化が引き起こされることが報告されている。遺残細胞においても慢性的なイマチニブ刺激により ISR が引き起こされた結果、代謝の変化を来しているのではないか、という

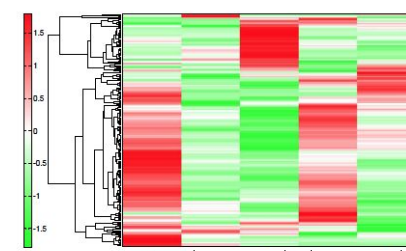


図 3.  
メタボローム解析において、遺残細胞は代謝の側面から親株、耐性株とは異なる細胞集団であることが示唆された

仮説のもと、ISR の Regulator である、eIF2 $\alpha$  や ATF といった因子について、遺残細胞における変動をタンパクレベルにて解析を行った。

また臨床検体においても術前化学療法としてイマチニブを投与したのちに切除を行なった切除検体において、免疫染色を用いてグルコーストランスポーターの発現の変化を検討した。また腫瘍内のグルタチオン量を生化学的手法を用いて定量し、イマチニブ投与後検体におけるグルタチオンの低下を確認した。また遺残細胞に対する標的治療の開発として前年度計画において検索した遺残細胞の生存に必要な代謝の変化を司る Regulator を、遺伝子編集によりノックアウトした際の細胞生存、代謝の変化を解析した。また、同 Regulator を特異的に阻害する化合物を同定し、in vitro にて遺残細胞に対する効果を検証した。

#### 4 . 研究成果

イマチニブ投与後の遺残GIST細胞では細胞周期解析にて遺残細胞において細胞休止期であるG0/G1期の比率の増加を確認した。メタボロミクス解析の結果、遺残細胞内の細胞内グルタチオン濃度、NADPH濃度ともに低下がみられた。さらに細胞内へのグルコースの取り込みが遺残細胞で低下していることをGlucose-Uptake Assayにて確認した。酸化ストレス誘導薬であるGPX4阻害薬に対するChemo sensibility assayでは、親株に比して遺残細胞でGPX4阻害薬に対し強い感受性を示した。またGPX4阻害剤の効果はデフェロキサミン、ならびにフェロスタチン投与にて減弱された。GIST細胞皮下移植腫瘍モデルに対して、イマチニブ投与に連続してのGPX4阻害剤の抗腫瘍効果を確認した。こうした結果より、分子標的治療後の遺残GIST細胞は自ら細胞休止期に入ることによって化学療法ストレスから回避していると考えられ、フェロトーシス誘導剤であるGPX4阻害薬が効果を示し、新規治療法の開発につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishida Tomo, Takahashi Tsuyoshi, Kurokawa Yukinori, Nishida Toshiro, Hirota Seiichi, Serada Satoshi, Fujimoto Minoru, Naka Tetsuji, Teranishi Ryugo, Saito Takuro, Yamashita Kotaro, Tanaka Koji, Yamamoto Kazuyoshi, Makino Tomoki, Yamasaki Makoto, Nakajima Kiyokazu, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro	4. 巻 125
2. 論文標題 Targeted therapy for drug-tolerant persister cells after imatinib treatment for gastrointestinal stromal tumours	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1511 ~ 1522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01566-9	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋剛, 石田智, 黒川幸典, 西塔拓郎, 山本和義, 山下公太郎, 田中晃司, 牧野知紀, 中島清一, 江口英利, 土岐祐一郎
2. 発表標題 GISTに対する分子標的治療後の遺残細胞に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------