

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591176

研究課題名(和文) 肺癌のEGFR-TKI耐性機序における低酸素環境と幹細胞およびEMTの関与

研究課題名(英文) Role of hypoxia and cancer stem cells in the resistance to EGFR-TKI in non-small cell lung cancer

研究代表者

高橋 和久 (Takahashi, Kazuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80245711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はEGFR活性型変異を有する非小細胞肺癌細胞株を用いて、Gefitinib暴露後に残存し、薬剤抵抗性を示すGefitinib-resistant persisters (GRPs)は、癌幹細胞因子を高発現し、マウスへの高い腫瘍生着率やsphere形成促進を認める極めて幹細胞性の高い細胞集団であることを見出した。低酸素環境ではGRPsにおけるIGF1Rは活性化され、肺癌幹細胞マーカーCD133陽性GRPsの比率も増加した。また幹細胞性因子であるOct4遺伝子の強制発現は有意にGefitinib耐性を誘導し、この耐性は低酸素環境においてより顕著であった。

研究成果の概要(英文)：Our aim here was to elucidate the role of hypoxia and cancer stem cells (CSCs) in the resistance to EGFR-TKI in non-small cell lung cancer (NSCLC). PC9 and HCC827 were exposed to high concentration of gefitinib under normoxic or hypoxic conditions. Seven days after gefitinib exposure, a small fraction of viable cells were detected, and these were referred to as "gefitinib-resistant persisters" (GRPs). Stem cell genes, such as CD133 and Oct4, were highly expressed, and GRPs exhibited a high potential for tumorigenicity in vivo and self-renewal capability. Importantly, hypoxic exposure significantly increased phosphorylation of IGF1R, and the population of CD133- and Oct4-positive GRPs. Transfection of Oct4 significantly increased CD133-positive GRPs and sphere formation under the treatment of gefitinib. Interestingly, gefitinib resistance induced by high Oct4 expression was more evident under the hypoxia.

研究分野：肺癌

キーワード：非小細胞肺癌 癌幹細胞 EGFR-TKI 耐性

1. 研究開始当初の背景

現在、肺癌は日本のみならず世界でも癌による死亡原因の第1位を占めている。進行肺癌、とくに進行非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer; NSCLC)におけるプラチナ製剤を中心とする化学療法は患者の予後改善にある一定の効果をもたらすが、それも既に頭打ちの状況であり、癌の生物学的特性に基づいた分子標的治療法の確立および耐性克服が急務である。

Epidermal growth factor receptor (EGFR) に対するチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は、EGFR に活性型遺伝子変異をもつ非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer; NSCLC)において劇的な腫瘍縮小効果を示す。しかし EGFR TKI 治療における最大の問題点は耐性化であり、活性型遺伝子変異陽性の NSCLC 患者においても、その多くが約1年以内に治療抵抗性となる。EGFR TKI 治療に対する二次耐性の約50%において EGFR の T790M 変異が、他にも Met 遺伝子増幅、HER2 遺伝子変異、小細胞肺癌への Transformation、PIK3CA 遺伝子変異など様々な要因が関与しているが、いまだに原因不明な自然耐性(一次性耐性)も約30%近く存在し、NSCLC 治療の大きな障壁となっている。この耐性機序の解明と耐性化克服への試みは、現在、肺癌診療に携わる我々臨床医や癌基礎研究者たちに与えられている大きな課題である。

一方、癌幹細胞は殺細胞性抗癌剤や放射線治療に対して抵抗性であり、従来の治療法ではたとえ腫瘍が縮小しても残存腫瘍において治療抵抗性の高い癌幹細胞の比率が高まり、高率に再発する。また近年、分子標的治療薬である TKI の耐性機序においても癌幹細胞の関与を示唆する論文が報告され始めており、癌幹細胞を治療ターゲットにする新たな戦略の重要性が示唆されている。また癌の微小環境、特に低酸素環境はこれら癌幹細胞性の維持や、hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α)の活性化を介した癌の増殖・進展・上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition; EMT)誘導とも密接な関連があり、癌の治療抵抗性に重要な役割を果たしていると考えられている。

Insulin-like growth factor 1 (IGF1) receptor (IGF1R)は NSCLC に発現し、近年、癌幹細胞における役割が注目されている。また、我々は低酸素環境における NSCLC の EMT 誘導が IGF1R pathway の活性化と密接な関連があることを報告している (Nurwidya F, Takahashi K, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014)。一方、Oct4 は POU ファミリーに属する転写因子で、Sox2 と複合体を形成し、Nanog などの幹細胞性に重要な遺伝子群を標的にする。近年、Oct4 は CD133 陽性の肺癌幹細胞の幹細胞性維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかし、NSCLC の EGFR-TKI 治療耐性機序におけるこれら幹細胞性因子の役割や低酸素環境との関連はいまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究において、我々は NSCLC の EGFR-TKI 治療耐性における低酸素環境の生物学的意義とその役割を研究する。特に低酸素における IGF1R pathway 活性化と幹細胞性因子である Oct4 遺伝子等に注目し、EGFR-TKI 治療耐性機序における低酸素環境および癌幹細胞、EMT について検討する。また EGFR-TKI 投与前および再発・耐性化後の再生検時の臨床検体(腫瘍組織)も用いて幹細胞性因子の発現を解析する。

2. 研究の目的

3. 研究の方法

EGFR 活性型遺伝子変異である exon 19 deletion mutation (Δ E746-A750)を有し EGFR TKI 感受性 NSCLC 細胞株である PC9 および HCC827 細胞を用いる。PC9 および HCC827 を用いた In vitro 細胞培養系において、1 μ M Gefitinib を9日間曝露後に残存し抵抗性を示す細胞集団を Gefitinib-resistant persisters (GRPs)と名付けて解析する。またマウスに In vivo で PC9 細胞を皮下移植し、Gefitinib 投与後にも薬剤抵抗性を示し残存する腫瘍を Gefitinib Resistant Tumors (GRTs)と名付けて解析する。そしてこれらの In vitro および In vivo モデルを中心に、下記のように EGFR-TKI である Gefitinib に対する耐性メカニズムを、低酸素環境と IGF1R pathway 活性化や幹細胞性因子である Oct4 遺伝子の解析を通して、検証してゆく。また EGFR-TKI 投与後に再発・耐性化した臨床検体も用いて、同様に解析を進めてゆく。

3. 研究の方法

低酸素環境下での GRPs の幹細胞性の評価・解析

PC9 と HCC827 を低酸素および正常酸素分圧チャンパーで培養し、1 μ M Gefitinib 曝露後に残存した GRPs を幹細胞マーカー CD133 の免疫細胞染色で評価し、その比率を算定する。また肺癌幹細胞マーカーと考えられている CD133 以外にも Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1 などの発現解析も行う。自己複製能を反映していると考えられている Sphere-formation assay も行い、低酸素環境における GRPs の自己複製能も検討する。

低酸素環境下での GRPs の幹細胞性の評価・解析

PC9 と HCC827 を低酸素および正常酸素分圧チャンパーで培養し、1 μ M Gefitinib 曝露後に残存した GRPs を幹細胞マーカー CD133 の免疫細胞染色で評価し、その比率を算定する。また肺癌幹細胞マーカーと考えられている CD133 以外にも Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1 などの発現解析も行う。自己複製能を反映していると考えられている Sphere-formation assay も行い、低酸素環境における GRPs の自己複製能も検討する。

GRPsの In vivoでの腫瘍生着能および形成能の評価

In vivoでの腫瘍生着能および腫瘍形成能は、癌幹細胞性の評価に極めて重要である。1 μM の Gefitinib に低酸素および正常酸素分圧チャンバーで9日間曝露後の PC9- GRPs を回収し、 1×10 個あるいは 1×10^2 個という極めて少数の癌細胞を NOD/Shi-scid/IL-2Rnull (NOG)マウスの皮下に移植し、In vivoでの腫瘍生着能と腫瘍形成能を評価する。コントロールとして同等数の PC9 親株も NOG マウスの皮下に移植する。

IGF1R pathway 活性化の評価

IGF1 の siRNA による knockdown

IGF1R 阻害剤および HIF1 α 阻害剤による GRPs の制御の試み

正常酸素分圧下および低酸素下における GRPs の IGF1R 活性化をリン酸化 IGF1R に対する抗体を用いた免疫細胞染色で検討する。また IGF1R のリガンドである IGF1 の発現も同時に検討する。そして IGF1 の siRNA による knockdown も試み、IGF1R の活性化を解析する。また IGF1R 阻害剤である AEW541 や hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α)阻害剤である YC-1 を投与することで、Gefitinib 曝露後に残存する GRPs の制御を試みる。

GRTs における幹細胞性因子の発現解析

NOG マウスに PC9 を皮下移植し、Tumor volume が 75 mm^3 に達したところで Gefitinib (20mg/kg)の腹腔内投与を開始する。本動物実験系で Gefitinib 投与後にも薬剤抵抗性を示し残存する腫瘍を Gefitinib Resistant Tumors (GRTs)と名付け、CD133, Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1 などの幹細胞性因子の発現解析を行う。発現解析は qPCR による mRNA レベルでの解析および免疫染色による蛋白レベルでの発現解析により施行する。

GRPs の幹細胞性における Oct4 遺伝子の検討

Oct4 発現レンチウイルスベクターを樹立して、PC9 および HCC827 細胞の Oct4 強制発現細胞株を作成する。Oct4 発現ベクターについては Addgene の pLM-vexGFP を EGFP に改変し、pLM-EGFP-Oct4 レンチウイルスベクターを作成する。そして In vitro 細胞培養系において $1 \mu\text{M}$ Gefitinib 曝露を Day 24 まで継続し、コントロール細胞と比較して、耐性を評価する。またこれらを正常酸素分圧チャンバーおよび低酸素分圧チャンバーで培養し、低酸素環境における Gefitinib 耐性

に及ぼす Oct4 遺伝子の影響を検証する。また CD133 免疫細胞染色も施行して、Gefitinib 耐性・癌幹細胞の比率についても解析する。また Gefitinib 存在下($0.5 \mu\text{M}$ および $5 \mu\text{M}$)での Sphere formation や、NOG 高度免疫不全マウスへの皮下移植による In vivoでの腫瘍生着能および形成能を評価し、これら幹細胞性における Oct4 遺伝子の役割を検討する。

In vivoでの Gefitinib 耐性における Oct4 遺伝子の関与

Oct4 強制発現 PC9 細胞(PC9-Oct4)および PC9-Mock 細胞を NOG マウスに移植し、GRTs の実験系と同じプロトコールで、20 mg/kg の Gefitinib を腹腔内投与して、In vivoでの Gefitinib 耐性における Oct4 遺伝子の役割を検討する。

EGFR 活性型遺伝子変異陽性 NSCLC 再生検の腫瘍組織における幹細胞性因子の発現検討

EGFR 活性型変異遺伝子陽性と診断され、EGFR-TKI が投与された NSCLC 患者の腫瘍組織における幹細胞性因子 Oct4 を免疫組織染色により検討する。EGFR-TKI 投与前および再発・耐性化後の再生検時の組織で発現を比較検討する。腫瘍細胞の同定には、TTF-1 あるいは EGFR Ex19 Del 変異もしくは Ex21 L858R 変異に特異的抗体を用いて、二重染色を施行する。

4. 研究成果

Gefitinib 感受性 PC9 および HCC827 細胞を9日間、 $1 \mu\text{M}$ という高濃度の Gefitinib に曝露すると、ほとんどの細胞は死滅するが、非常に少数の細胞が残存し、これら細胞集団を GRPs として解析した。GRPs の遺伝子発現解析では、肺癌幹細胞マーカーである CD133 をはじめ Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1 などの幹細胞因子が高発現していた。また ultra-low attachment plates を用いた Sphere forming assay でも、自己複製能を反映する著明な Sphere 形成促進を認めた。そして NOG 高度免疫不全マウスにおいても GRPs は 1×10 個あるいは 1×10^2 個はという非常に少ない細胞数で腫瘍生着能を示したことから、GRPs は極めて幹細胞性の高い細胞集団であると考えられた。

次に低酸素環境においても同様に9日間、 $1 \mu\text{M}$ の Gefitinib に PC9 細胞および HCC827 細胞を曝露すると、Gefitinib 耐性を示し CD133 陽性 GRPs の比率は、低酸素環境により有意に上昇することを確認した。低酸素環境下では Sphere 形成能(自己複製

能)も著明に亢進し、また低酸素に暴露したGRPsはNOG高度免疫不全マウスにおける腫瘍生着率も有意に増加したことから、低酸素はGRPsの幹細胞性の維持にNicheとして重要な役割を果たしていると考えられた。

IGF1R pathwayの活性化はEGFR-TKIの耐性機序のひとつとして知られているが、IGF1Rの重要なリガンドであるIGF1はGRPsにおいて著明に発現亢進していた。またリン酸化IGF1Rに対する抗体を用いた免疫細胞染色の結果、GRPsにおいてIGF1Rは著明に活性化されていた。

低酸素環境下ではIGF1発現およびIGF1Rの活性化も亢進しており、このIGF1Rの活性化はIGF1のsiRNAによるknockdownで抑制された。またHIF1 α は低酸素応答を司る代表的な転写因子だが、HIF1 α 阻害剤であるYC-1によりGRPsにおけるIGF1発現は著明に抑制され、そしてIGF1Rの活性化も抑制されたことから、低酸素下でのIGF1R活性化はHIF1 α によるIGF1発現亢進によるものと考えられた。そしてHIF1 α 阻害剤であるYC-1およびIGF1R阻害剤であるAEW541により低酸素環境におけるCD133陽性GRPsの比率は有意に抑制されたことから、幹細胞性の高い細胞集団であるGRPsの低酸素環境におけるGefitinib耐性にはHIF1 α とIGF1R pathwayの活性化が重要であると考えられた。

次にPC9細胞をNOGマウスに皮下移植し、Tumor volumeが 75 mm^3 に達したところでGefitinib (20mg/kg)の腹腔内投与を開始すると著明な腫瘍縮小効果を認めるが、Day 14-17においても薬剤耐性を示し腫瘍が残存する(以下、Gefitinib Resistant Tumors; GRTs)ことを確認した。GRTsは、Vehicle投与のコントロール腫瘍と比較して、qPCRにおいて有意にCD133, Oct4, Sox2, Nanog, CXCR4, ALDH1A1等の幹細胞性因子の発現増加が認められた。またCD133とOct4については免疫組織染色により蛋白レベルでの発現上昇も確認した。

そして我々は、これらの因子の中でEGFR-TKI耐性に寄与している幹細胞性因子としてOct4遺伝子に着目した。pLM-EGFP-Oct4レンチウイルスベクターを用いてPC9およびHCC827細胞のOct4強制発現細胞株を作成し、Oct4の強発現はqPCRおよびウエスタンブロット、免疫細胞染色により確認した。またコントロール細胞はMockウイルスベクターを用いて同様に作成し、ウイルス感染効率もEGFPにより確認した。

まずはIn vitro細胞培養系において $1\ \mu\text{M}$

Gefitinib 曝露をDay 24まで継続すると、Oct4強制発現PC9細胞(PC9-Oct4)はコントロールであるPC9-Mock細胞と比較して、Gefitinib存在下において、より早期に細胞の再増殖を示した。この現象はPC9と同様にHCC827細胞でも認められた。そして低酸素環境においては、正常酸素分圧下よりもより早期に細胞の再増殖を認めたことから、Oct4遺伝子の強制発現は低酸素環境下において、より強くEGFR-TKI耐性に寄与していることを示唆する所見と考えられた。またCD133免疫細胞染色も施行して、 $1\ \mu\text{M}$ Gefitinib曝露後の薬剤耐性・癌幹細胞の比率についても検討したが、Oct4遺伝子の強制発現は、PC9細胞においてCD133陽性のGRPsの比率を有意に増加させた。そしてこの現象は、低酸素環境下においてより顕著であり、同様の所見はHCC827細胞でも認められた。またOct4遺伝子の強制発現はGefitinib存在下でのSphere formationも有意に促進したことから、Oct4はEGFR-TKI存在下での薬剤耐性、自己複製能および幹細胞性の維持に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。In vivoでの腫瘍生着能および形成能の獲得も癌幹細胞の特性の一つであるが、Oct4遺伝子の強制発現はNOGマウスへの皮下移植において、 1×10^6 個あるいは 1×10^2 個という極めて少数のPC9細胞の腫瘍生着を可能にしたことより、Oct4の癌幹細胞性への寄与が強く示唆された。

Oct4遺伝子のIn vivoでのEGFR-TKI耐性への役割を検討するために、PC9-Oct4細胞およびPC9-Mock細胞をNOGマウスに移植し、20 mg/kgのGefitinibを腹腔内投与して、抗腫瘍効果を検討した。両者とも腫瘍縮小効果を認めたが、PC9-Oct4はPC9-Mockと比較して、より早期に腫瘍の再増殖を認めたことより、Oct4強発現はIn vivoにおけるEGFR-TKI耐性・再発にも寄与していることが強く示唆された。

最後に、EGFR活性型遺伝子変異陽性と診断され、EGFR-TKIが投与されたNSCLC患者の腫瘍組織におけるOct4の発現を免疫組織染色により検討した。腫瘍細胞の同定には、TTF-1あるいはEGFR Ex19 Del変異もしくはEx21 L858R変異に特異的抗体を用いて、二重染色を施行したが、癌細胞における幹細胞性因子であるOct4の発現は、EGFR-TKI投与前ではほとんど認めなかったのに対して、再発・耐性化後の再生検時の組織においてはOct4の高発現を認めた。現在、ALDH1A1等の他の幹細胞性因子の発現についても検討中である。またZEB1をはじめとしたEMT関連因子についても、現在、In vitro, In vivoそして再生検の臨床検体を用いて、同様に解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)
全て査読ありの原著論文

1. Kobayashi I, Takahashi F, Nurwydia F, Nara T, Hashimoto M, Murakami A, Yagishita S, Tajima K, Shimada N, Suina K, Yoshioka Y, Sasaki S, Moriyama M, Moriyama H, Takahashi K. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 22;473(1):125-32. (2016)
2. Yagishita S, Fujita Y, Kitazono S, Nakadate Y, Sawada T, Kitamura Y, Shimoyama T, Takahashi F, Takahashi K, Tamura T, Koizumi F. Chemotherapy induced microRNA-125/HER2 pathway as a novel therapeutic target for trastuzumab-mediated cellular cytotoxicity in small-cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 14(6):1414-23. (2015)
3. Nurwidya F, Takahashi F, Kobayashi I, Murakami A, Kato M, Minakata K, Nara T, Hashimoto M, Yagishita Y, Baskoro H, Hidayat M, Shimada N, Takahashi K. Treatment with insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 12;455(3-4):332-8. (2014)
4. Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, Kobayashi I, Minakata K, Hashimoto M, Nara T, Kato M, Tajima K, Shimada N, Iwakami S, Moriyama M, Moriyama H, Koizumi F, Takahashi K. Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor. *PLoS One* 28;9(1):e86459 (2014)
5. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F,

Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K.

Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Science* 103(11):1946-54. (2012)

[学会発表](計 4 件)

1. Kobayashi I, Takahashi F, Nurwidya F, Murakami A, Hidayat M, Shimada N, Kato M, Suina K, Kanemaru R, Asao T, Ohashi R, Muraki K, Takahashi M, Yoshioka Y, Sasaki S, Takahashi K. Role of POU5F1 in gefitinib resistance in EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC). 第 55 回 日本呼吸器学会総会 2015. English ポスターセッション 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
2. Hidayat M, Nurwidya F, Murakami A, Kobayashi I, Ko R, Shimada N, Kanemaru R, Asao T, Takahashi F, Takahashi K. AEW541, an insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) inhibitor, reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in lung adenocarcinoma. 第 55 回 日本呼吸器学会総会 2015. English ポスターセッション 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
3. Yagishita S, Fujita Y, Fujimoto Y, Takahashi F, Takahashi K, Tamura T, Koizumi F. Chemotherapy regulated microRNA-125/HER2 pathway as a novel therapeutic target for trastuzumab-mediated cellular cytotoxicity in small-cell lung cancer. American Association for Cancer Research (AACR) Congress 2015 Philadelphia, USA
4. Takamochi K, Suehara Y, Mogushi K, Kohsaka S, Mano H, Takeuchi K, Saito T, Suzuki K, Ladanyi M, Takahashi K, Takahashi F. Comprehensive analyses of oncogenic driver fusions using the NanoString nCounter in lung adenocarcinoma from Japanese never- and light-smokers

European Cancer Congress 2015
Vienna, Austria

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 和久 (TAKAHASHI, Kazuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号 : 80245711

(2)研究分担者

高橋 史行 (TAKAHASHI, Fumiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70327823