

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293196

研究課題名(和文) 癌幹細胞化を阻止する画期的分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Molecular targeted medicine to inhibit cancer stemness

研究代表者

各務 博 (Kagamu, Hiroshi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30418686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対するEGFR-TKIは高い奏効率と縮小効果を示すが、治癒に至ることはない。この理由は、癌細胞の多様性にある。本研究では、DDX3Xという蛋白質が癌細胞の幹細胞化や上皮間葉転換という分化という点での多様性を進めることでWnt/ β -cateninシグナルやVEGFRシグナルを活性化させ、EGFR-TKI耐性を来すことを明らかとした。肺癌組織の検討でもDDX3X陽性肺癌では β -catenin、VEGFR2陽性率が高かった。Wnt/ β -catenin、VEGFRシグナル阻害剤とEGFR-TKIの併用は治療耐性を打破し治癒を得る可能性があることを証明した。

研究成果の概要(英文)：EGFR-TKI has led to unprecedented results in lung cancer patients harboring activating EGFR mutations. However, the phenotypic diversity of cancer cells results in the survival of treatment-resistant cells. DDX3X is a RNA helicase and is involved in Wnt/ β -catenin signal activation. We identified lung cancer cells that expressed DDX3X achieve cancer stem cell-like and mesenchymal properties resulting in EGFR-TKI resistance. Response rate of DDX3X positive EGFR mutant lung cancer patients was only 13.3%. In this study, we demonstrated that Wnt/ β -catenin or VEGFR signal inhibitors exhibited synergistic antitumor reactivity to break EGFR-TKI resistance. Clinical sample analyses revealed that DDX3X expression was accompanied with β -catenin and VEGFR-2 expression. Our data indicate a novel mechanism how lung cancer cells harboring EGFR-activating mutations survive through EGFR-TKI treatment and have a clinical implication to develop a novel treatment for VEGFR- and β -catenin-signaling.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：DDX3X Wnt/ β -catenin VEGF

1. 研究開始当初の背景

癌組織は系統的に遺伝子変異を重ねるヘテロな細胞集団である (M. Gerlinger et al. *N.Engl.J.Med.* 2012)。一方、cancer stem cell (CSC)理論に代表されるように遺伝子変異によらない“分化”状態による多様性をも有しており、これら genetic, epigenetic intra-tumor heterogeneity が治療抵抗性の本質であると考えられる (A. Marusyk et al. *Nat.Rev.Cancer.* 2012)。

DDX3X は、私達がマウスメラノーマから癌幹細胞様形質を有する CD133 陽性少数細胞群を純化しプロテオーム解析した結果、癌幹細胞特異的蛋白質として見出したものである (H.Kagamu et al., *CII* 2011, H.Kagamu et al., *CII*, 2013)。DDX3X は X 性染色体にコードされている ATP dependent RNA helicase であり、mRNA, miRNA, rRNA の代謝、移送などに重要とされている。これは、DDX3X が epigenetic な遺伝子発現制御能力を備えていることを意味している。私達は、EGFR 遺伝子変異肺癌の EGFR-TKI 耐性の新規機序として、① EGFR シグナルから幹細胞シグナルである Wnt/ β -catenin にシグナルスイッチし EGFR シグナル依存性を失った CSC 化細胞が重要であること、②このシグナルスイッチは DDX3X により引き起こされること、を見出した (H. Kagamu et al., *Plos One*, 2014)。これと符合するように、CSC 理論によく合致する脳腫瘍である髄芽腫の網羅的エクソン解析の結果、Wnt subtype の約半数に DDX3X の変異があり、活性化された DDX3X が病的 β -catenin シグナルの原因となっていることが報告された (TJ Pugh et al, *Nature* 2013)。この癌幹細胞化による耐性は、未だに解明されてこなかった“EGFR-TKI 奏効期間中を肺癌細胞が生存し続けるメカニズム”の一つであると考えられ、これを阻害することで癌根治に至ることが予測される。

2. 研究の目的

本研究は、癌幹細胞化シグナルスイッチを担う DDX3X を標的とした癌幹細胞化阻害療法を開発することを目的とする。

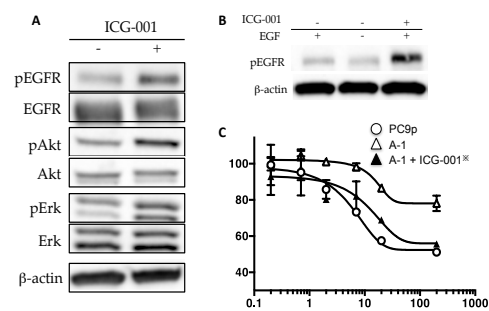
3. 研究の方法

- ① in vitro における、DDX3X 遺伝子導入治療耐性ヒト肺癌細胞を用いた Wnt/ β -catenin 阻害剤効果の評価
- ② SCID マウスに DDX3X 遺伝子導入治療耐性ヒト肺癌細胞を接種することで作成した in vivo 腫瘍モデルにおいて Wnt/ β -catenin 阻害剤、DDX3X RNA helicase inhibitor 等の治療効果を検討
- ③ EGFR-TKI 治療前、奏効期間中、再燃時に得た生検組織を用いて、EGFR 遺伝子変異肺癌の DDX3X 発現、癌幹細胞マーカー、付加的遺伝子変異の検討

4. 研究成果

- ① EGFR 遺伝子変異陽性肺癌腫瘍である PC9 に DDX3X 遺伝子導入した A-1, A-4 腫瘍細胞を用いて EGFR-TKI 併用における Wnt/ β -catenin 阻害剤の相乗効果について検討した。

Fig. 1



※ICG-001 is a specific inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

DDX3X 発現により EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞は EGFR リン酸化を失い、EGFR シグナルへの依存性が消失することから EGFR-TKI 耐性を示す (Fig. 1)。DDX3X により活性化された Wnt/ β -catenin シグナルを阻害する ICG-001 を投与する事で EGFR リン酸化が回復し EGFR-TKI 感受

性が回復した (Fig. 1B, C)。ICG-001 とは異なった機序で Wnt/ β -catenin シグナル阻害を示す XAV-939, IWR について dose titration を行い (Fig.2) 直接の細胞傷害活性を示さない濃度における EGFR-TKI との相乗効果を検討した。

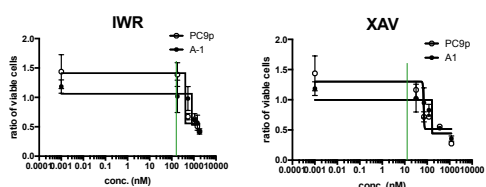


Fig. 2

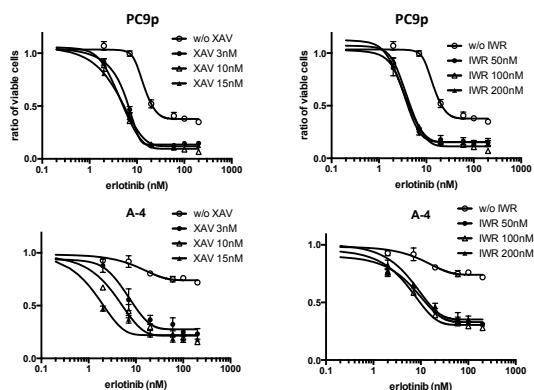


Fig. 3

この結果、Fig.3 で示すように、

- 1) A-4 (DDX3X 遺伝子導入 PC9)において、IC50 20 nM 程度と考えられている erlotinib 単独では 100nM 以上でも 30%程度の細胞死誘導しか認められず、高度耐性と判断された。XAV, IWR 併用により IC50 10nM 以下に低下するとともに 70%以上死滅させることが可能であることが示された。さらに、XAV-939 では用量依存性も示され 3 nM という臨床的にも血中濃度として得ることが可能な低濃度でも併用効果が認められた。
- 2) PC9 親株細胞に対しても相加効果を示し EGFR-TKI 最大濃度で残存する肺癌細胞をさらに根絶できる可能性を示した。

② In vivo 腫瘍モデルとして SCID マウスを用いた皮膚腫瘍モデルにおける効果を検討した。腫瘍としては A-4 (DDX3X 遺伝子導入 PC9 ヒト肺癌細胞) を用いた。薬剤投与は腫瘍皮膚接種後 12 日目から行った。

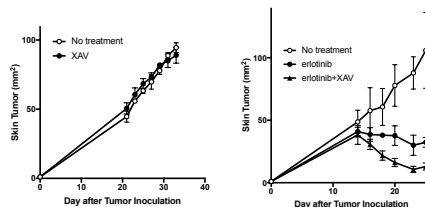


Fig. 4

XAV-939 60 μ g を腹腔内投与単独では抗腫瘍効果を示さなかった (Fig. 4 左図)。erlotinib 500 μ g 腹腔内投与単独で腫瘍退縮は認められず、stable disease の状態となったが、XAV-939 併用により縮小効果を得ることが可能であった (Fig. 4 右図)。XAV-939 の主な副作用は下痢であり、2 週間の連日投与中に無治療群に比較して約 5%のマウスの体重減少を認めたが、投与終了後速やかに回復した。

③EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者の生検組織検体における DDX3X 発現の検討

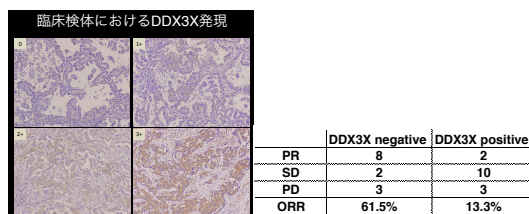


Fig. 5

Table 1.

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌と診断された患者より得られた生検検体における DDX3X 発現を Fig. 5 のように半定量化し 0 を陰性、1+~3+を陽性として EGFR-TKI 治療による効果と比較した。Table 1.に示されるように DDX3X 陰性の奏効率は 61.5%であったが、DDX3X 陽性と判定された患者の奏効率は 13.3%と低かった。PD 症例は増加しておらず、SD 症例が増加していることは in vivo における DDX3X 遺伝子導入肺癌細胞に対して

EGFR-TKI を用いた場合に合致しているものと考えられた。

	DDX3X+	DDX3X-	
β -catenin+	33	5	38
β -catenin-	29	22	51
	62	27	

Table 2.

DDX3X 発現と β -catenin シグナルとの相関が臨床検体においても見られるか検討した結果、Table 2.のように DDX3X 陽性例では β -catenin 陽性例が多くカイ 2 乗検定で $P < 0.05$ と有意差を示した。

④ 本研究を進める中で、DDX3X 遺伝子導入した EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の EMT に着目した解析を行った。DDX3X 遺伝子導入により非付着性腫瘍細胞比率が増加することを見出していたが、この DDX3X 高発現非付着肺癌細胞のフローサイトメトリ解析の結果、VEGFR-2 が高発現されていることが明らかとなった (Fig. 6)。

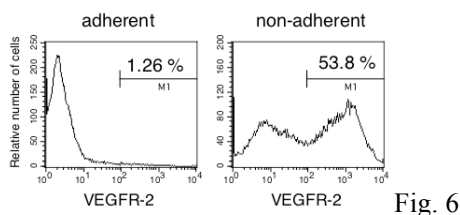


Fig. 6

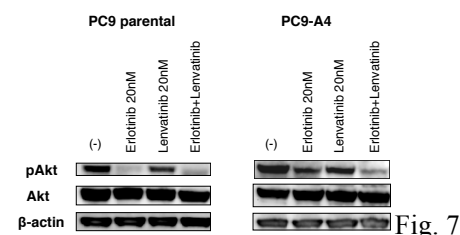


Fig. 7

さらにこの VEGFR-2 からのシグナルが見られるか確認する目的で、VEGFR-TKI である lenvatinib を用い、DDX3X 遺伝子導入肺癌 (PC9-A4) における細胞内シグナルを解析した。この結果、PC9 親株では erlotinib 単独で Akt リン酸化がほぼ消失したのに対して、PC9-A4 では残存し lenvatinib 併用で Akt リン酸化のさらなる減弱を認めた。

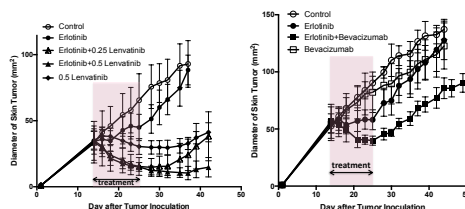


Fig. 8

Fig. 9

In vivo 皮膚腫瘍モデルを用いて EGFR-TKI と VEGFR-TKI 及び抗 VEGF 抗体併用効果を検討した結果、Fig. 8, 9 に示されるように EGFR-TKI との相乗効果を示した。さらに、VEGFR シグナル阻害効果を有する薬剤は投与終了後も腫瘍再増大速度が抑制される傾向を認めた。

肺癌手術検体組織を使った検討では、DDX3X 発現と VEGFR2 発現に有意な相関が認められた。

[結論]

DDX3X 発現により誘導される Wnt/ β -catenin シグナルが EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の EGFR-TKI 耐性に与える影響を in vitro, in vivo, 臨床検体を用いて検討した。異なる機序により Wnt/ β -catenin シグナルを阻害する 3 つの化合物全てに EGFR-TKI との相乗効果を認め、DDX3X 高発現により誘導された EGFR-TKI 耐性を破ることが可能であった。この中で臨床的に有効血中濃度が得られると考えた XAV-939 について in vivo の検討を行い、SCID マウス xenograft model でも EGFR-TKI と Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤は相乗効果を示した。臨床検体で DDX3X 発現を認めた EGFR 遺伝子変異陽性肺癌症例では EGFR-TKI 奏効率が低く、SD に止まる傾向が認められ、DDX3X 発現を有する肺癌組織では β -catenin 発現も見られることが明らかとなった。これらの結果は、肺癌における DDX3X 発現が幹細胞系シグナルである Wnt/ β -catenin シグナルを活性化してバイパスシグナルとして利用されることで EGFR-TKI 耐性を生むこと、これは Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤により打破

することが可能であることを強く示唆している。

さらに、DDX3X 発現に伴って生じる EMT は VEGFR-2 発現及び、VEGFR-2 からのシグナルバイパスを引き起こすことで EGFR-TKI 耐性に寄与していることが示唆された。これは、臨床に於いて行われている EGFR-TKI と抗 VEGF 抗体治療が相乗効果を有する理論的根拠となり得る結果である。

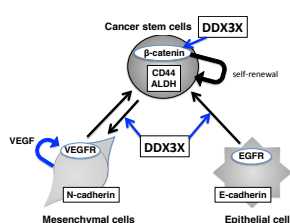


Fig. 10

以上をまとめると、Fig.10 に示すような intra-tumor heterogeneity が存在しており、大多数を占める上皮型癌細胞を死滅可能な EGFR-TKI 治療でも Cancer stem cell type, Mesenchymal cell type に変化している細胞分画が dormant cell として残存し、付加的遺伝子変異などにより生じる二次的耐性細胞の母地となっていること、これらの細胞 Wnt/ β -catenin シグナル、VEGFR シグナル阻害併用により根絶可能であることが示唆された。

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 8 件)

1. Miura S, Maemondo M, Iwashima A, Harada T, Sugawara S, Kobayashi K, Inoue A, Nakagawa T, Takiguchi Y, Watanabe H, Ishida T, Terada M, Kagamu H, Gemma A, Yoshizawa H. A phase II study of carboplatin plus weekly paclitaxel with bevacizumab for elderly patients with non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ016). *Invest New Drugs* 2017; 35: 227-234. 査読あり

2. Usui K, Sugawara S, Nishitsuji M, Fujita Y, Inoue A, Mouri A, Watanabe H, Sakai H, Kinoshita I, Ohhara Y, Maemondo M, Kagamu H, Hagiwara K, Kobayashi K, North East Japan Study G. A phase II study of bevacizumab with carboplatin-pemetrexed in non-squamous non-small cell lung carcinoma patients with malignant pleural effusions: North East Japan Study Group Trial NEJ013A. *Lung Cancer* 2016; 99: 131-136. 査読あり
3. Saida Y, Watanabe S, Tanaka T, Baba J, Sato K, Shoji S, Igarashi N, Kondo R, Okajima M, Koshio J, Ichikawa K, Nozaki K, Ishikawa D, Koya T, Miura S, Tanaka J, Kagamu H, Yoshizawa H, Nakata K, Narita I. Critical Roles of Chemoresistant Effector and Regulatory T Cells in Antitumor Immunity after Lymphodepleting Chemotherapy. *Journal of immunology* 2015; 195: 726-735. 査読あり
4. Miura S, Kagamu H, Sakai T, Nozaki K, Asakawa K, Moro H, Okajima M, Watanabe S, Yamamoto S, Iino N, Goto S, Kazama JJ, Yoshizawa H, Narita I. Advanced thymic cancer treated with carboplatin and paclitaxel in a patient undergoing hemodialysis. *Internal medicine* 2015; 54: 55-58. 査読あり
5. Toyama M, Hasegawa T, Sakagami T, Koya T, Hayashi M, Kagamu H, Muramatsu Y, Muramatsu K, Arakawa M, Gejyo F, Narita I, Suzuki E, Niigata Asthma Treatment Study G. Depression's influence on the Asthma Control Test, Japanese version. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2014; 63: 587-594. 査読あり
6. Shima K, Sakagami T, Tanabe Y, Aoki N, Moro H, Koya T, Kagamu H, Hasegawa T,

Suzuki E, Narita I. Novel assay to detect increased level of neutralizing anti-interferon gamma autoantibodies in non-tuberculous mycobacterial patients. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2014; 20: 52-56. 査読あり

7. Sakagami T, Hasegawa T, Koya T, Furukawa T, Kawakami H, Kimura Y, Hoshino Y, Sakamoto H, Shima K, Kagamu H, Suzuki E, Narita I. Cluster analysis identifies characteristic phenotypes of asthma with accelerated lung function decline. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 2014; 51: 113-118. 査読あり
8. Nozaki K, Kagamu H, Shoji S, Igarashi N, Ohtsubo A, Okajima M, Miura S, Watanabe S, Yoshizawa H, Narita I. DDX3X induces primary EGFR-TKI resistance based on intratumor heterogeneity in lung cancer cells harboring EGFR-activating mutations. *PloS one* 2014; 9: e111019. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. DDX3X dependent VEGFR expression in lung cancer cells harboring EGFR mutation resulted in EGFR-TKI resistance, Aya Ohtsubo, Hiroshi Kagamu, Satoshi Shoji, Miho Takahashi, Kousuke Ichikawa, Satoshi Watanabe, Tetsuya Abe and Toshiaki Kikuchi、2016 年 10 月 6 日、日本癌学会総会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2. Circulating small cell lung cancer cells and DDX3X-specific effector T cells in peripheral blood of SCLC patients, Aya Ohtsubo, Hiroshi Kagamu, Masaaki Okajima, Satoru Miura, Satoshi Watanabe and Toshiaki Kikuchi、2015 年 10 月 8 日、日本癌学会総会、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称 : PD-1免疫チェックポイント阻害薬の臨床効果を予測する免疫学的バイオマーカー

発明者 : 各務博
権利者 : 各務博、埼玉医科大学
種類 :
番号 : 特願 2017-20685
出願年月日 : 2016 年 2 月 7 日
国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

各務 博 (Kagamu Hiroshi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30418686

(2)研究分担者

土田 正則 (Tsuchida Masanori)
新潟大学・医学部・教授
研究者番号 : 60293221

梅津 哉 (Umezu Hajime)
新潟大学・歯学総合病院・准教授
研究者番号 : 50251799

矢野 聖二 (Yano Seiji)
金沢大学・医学保健学総合研究科・教授
研究者番号 : 30294672

(3)連携研究者

()

研究者番号 :