

令和元年6月7日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04830

研究課題名(和文) 治癒を目指すための肺癌幹細胞を利用した次世代肺癌マウスモデルの基礎的臨床的検討

研究課題名(英文) Next generation lung cancer mice model for conquering cancer stem

研究代表者

木浦 勝行 (Kiura, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：10243502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000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チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の奏効率は非常に高いが、獲得耐性にて肺癌は根治に至らない。EGFR変異遺伝子を改変した肺癌マウスモデルを用い、肺癌幹細胞の病態解明、治療標的の同定を目指し本研究を行った。マウス肺癌は皮下への生着能を有し、in vivoで継代が可能であった。またEGFR-TKI感受性を維持しており、継続治療にて耐性腫瘍を樹立、EGFR T790Mの出現を確認した。免疫能が維持されているC57BL/6で継代できるEGFR変異肺癌は非常に希少であり、免疫チェックポイント阻害薬を含む新規治療の基礎的検討、臨床応用が今後期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR遺伝子の変異は非喫煙者に発生する肺癌の原因として最も高頻度であり、EGFR阻害薬が有効である。しかしながら1年程度で耐性化し、根治には至らない。なぜ耐性化するかを基礎的に解明し、原因に沿った新規治療法の開発を目指すため、よりヒト肺癌に近似した肺癌マウスモデルの作製をおこなった。遺伝子改変マウスから肺癌を摘出し、他のマウスへ移植し、どのようにEGFR-TKIに対して耐性化して進展するかを評価したところヒト肺癌と近似した耐性機序を呈することが分かった。このマウスモデルをプラットフォームとして免疫療法など新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：NSCLC harboring EGFR mutations represents one of the most critical subgroups of the cancer in clinical practice. EGFR tyrosine-kinase inhibitors (EGFR-TKIs) are highly effective, but drug-resistance inevitably develops in the tumors. Therefore to achieve deeper and longer remission, an alternative treatment strategy is required for lung cancers harboring EGFR mutations.

Lung tumors from the transgenic mouse strains were transplanted subcutaneously into C57BL/6J. The tumors maintained EGFR-dependency, and thus the EGFR-TKI gefitinib inhibited tumor growth; however, similar to human lung cancers, the tumors acquired resistance in 60 days, following gefitinib administration. Secondary EGFR T790M mutation in the tumors developed. These syngeneic lung-cancer mouse models harboring EGFR mutations are suitable for studying the drug-resistance mechanisms and the role of the tumor microenvironment.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺癌 EGFR変異 癌幹細胞 遺伝子改変マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌死亡の第1位であり、罹患率と死亡率が極めて近接した難治性癌の代表である。難治性となる原因の一つとして肺癌幹細胞が想定されているが、その病態については十分解明されていない。肺癌の分類は組織学的な分類から発癌の直接的な原因となる癌特有の分子異常(driver mutations)による分類が進んでおり、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異はその中でも最も高頻度である。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対するEGFR-TKIsの奏効率は70~80%と非常に高く、EGFR-TKIは第一選択薬となった。しかしながらEGFR 遺伝子変異を有する進行肺癌患者にEGFR-TKIを用いて治療を行った場合、平均生存期間は4-5年程度である。EGFR 阻害薬が一旦奏効した肺癌の全例が再増悪をきたすこと(獲得耐性)が臨床上の非常に大きな問題とである。獲得耐性の原因として最も頻度が高いのは、二次性のEGFR 遺伝子変異(exon20 T790M)の出現であり、原因の50-60%を占める(Ohashi J Clin Oncol 2013)。EGFR T790Mに活性がある第3世代EGFR-TKIが認可され標準的に使用されるようになったが、残念ながら耐性化は同様に避けられない。EGFR-TKIにより肺癌が根絶できない原因として肺癌幹細胞の関与している可能性があるが、十分に検討されていない。

前臨床モデルでEGFR 遺伝子変異による持続的なEGFRの活性化が肺癌の発生につながることをin vitro, in vivoで示されているが、申請者らも、EGFR 変異遺伝子をマウス肺のII型肺胞上皮特異的に発現させる遺伝子改変マウスを作製し、EGFRシグナルに依存して発生、進展する肺癌の発生を確認し(Ohashi et al Cancer Sci 2008, Ohashi et al Cancer Res 2009)、国内特許を取得している。2005年にKimらがCell誌にマウス肺の気管支肺胞管接合部にSca-1とCD34をマーカーに気管肺胞幹細胞(BASCS)を単離し、Kras 変異発癌における癌幹細胞の起源である可能性を示した。2010年に同研究室がEgfr 変異肺癌ではSca-1“陰性”癌細胞でより腫瘍形成能が高いことを示した(Curtis et al. Cell stem cell 2010)。従ってBASCSはEGFR 変異肺癌の癌幹細胞の起源ではない可能性がある。また最近EGFRなど癌化シグナル下にII型肺胞上皮細胞が幹細胞として振る舞う可能性が示された(Desai et al. Nature 2014)。申請者らが作製した肺癌モデルはII型肺胞上皮細胞をEGFR 変異により癌化させたものであり、幹細胞様の機能をもつ肺癌細胞が存在する可能性が高いとの仮説を立てた。また近年の研究により、OCT4やNANOGがES細胞、iPS細胞などの恒常性に重要であることがわかっているが、癌幹細胞でも同様に重要な働きをしていることが報告されている。幸運なことに理研バイオリソースセンターにOCT4, NANOG 遺伝子の発現をGFPで標識したマウスモデルが学術研究用にデポジットされており、肺癌マウスモデルとこれらマウスとを交配し、幹細胞マーカーを高発現している少数の肺癌細胞をGFPで効率的にスクリーニングする系を着想した。肺癌幹細胞を同定、単離することができれば、その病態、治療標的を探索し癌幹細胞を根絶しうる新規治療法の開発につながり、また癌幹細胞を用いてヒト肺癌の進展様式をより忠実に再現する次世代型の肺癌マウスモデルの樹立できると考えた。

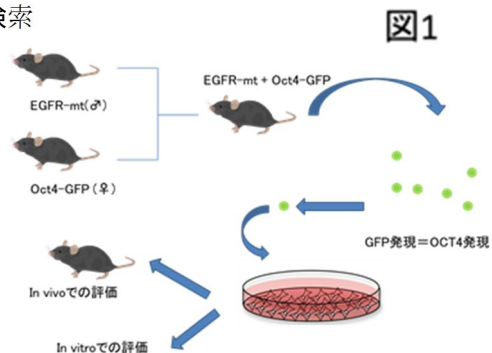
2. 研究の目的

EGFR 遺伝子組み換え肺癌マウスモデルと多能性マーカーであるOCT4 遺伝子発現をGFPで標識したマウスを交配させ、微量の肺癌幹細胞を、GFPを用いて効率的に検出し、ヒト肺癌の病態をより生体に近い形で再現する次世代EGFR 肺癌マウスモデルの樹立を試みる。また、次世代シーケンサーで解析、治療標的を探索し、癌幹細胞の根絶を目指したin vivo pre-clinical trialを行う。

3. 研究の方法

EGFR 変異肺癌におけるOCT4 高発現癌細胞の検索

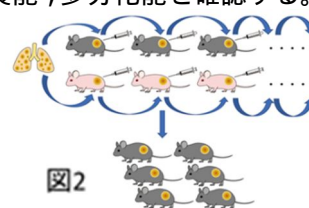
RIKEN バイオリソースセンターにOCT4 遺伝子の高発現とともにGFP 発現が誘導され、GFPにてOCT4 遺伝子の発現をモニタリングできるC57BL/6J-Tg(GOFGFP)11meg (RBRC No.00771) (以後C57BL/6-OCT4GFPと表記)が登録されている。寄託者であるRIKEN 阿部訓也博士と共同研究という形で供与受け、そのマウスと申請者らが樹立したEGFR 変異肺癌C57BL/6-mEGFR Del およびC57BL/6-hEGFR L858R とを交配し、C57BL/6-EGFRmts × C57BL/6-OCT4GFP を作成する(図1)。肺組織を、化学的に単一細胞へ分離し、蛍光フローサイトメトリー(FACS)にてGFP 発現細胞を回収するd) GFPを発現している細胞が、RT-PCR法、ウェスタンブロット法でEGFR 変異およびOCT4を発現していることの確認、および病理学的に肺癌細胞であることを確認する。



OCT4 高発現の肺癌細胞の単離に成功したのち、採取した細胞が癌幹細胞として矛盾ないことを確認する。

- RT-PCR, FACS などにて CD34, CD133, KIT など癌幹細胞マーカーの発現状態を評価する。
- 得られた細胞を *in vitro*, *in vivo* で培養し, FACS にて自己複製能, 多分化能を確認する。
- 同種移植後の腫瘍形成能を評価する。
- 同種移植後の転移能を評価する。

肺癌幹細胞による次世代 EGFR 変異肺癌マウスモデルの樹立
肺癌幹細胞をマウス肺へ同種同所移植 摘出 再移植を繰り返す
行い (serial plantation), *in vivo* での増殖能を再チェックしつ
つ, さらに腫瘍形成能, 転移能の優れた細胞を選別する (図2)。



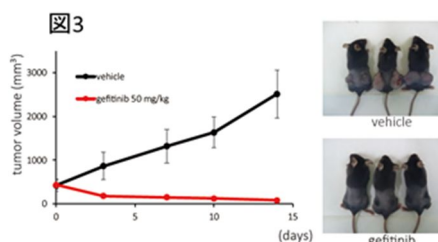
4. 研究成果

C57BL/6-EGFR^{mts} からの肺癌細胞の分離、*in vivo* serial plantation 系の確立
C57BL/6-EGFR^{mts} から肺癌細胞を摘出、単細胞化し、C57BL/6 の皮下、腹腔、尾静脈投与による肺への生着を確認した。移植した肺癌細胞は EGFR-TKI の感受性を維持していた (図3)。

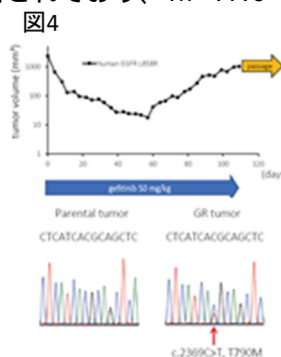
C57BL/6-EGFR^{mts} × C57BL/6-OCT4GFP の作製
計画通り C57BL/6-OCT4GFP を RIKEN と共同研究締結し、
岡山大学動物資源部門にて我々が保有する C57BL/6-
EGFR^{mts} と C57BL/6-OCT4GFP を交配し、ゲノタイピング
の結果、C57BL/6-EGFR^{mts} × C57BL/6-OCT4GFP の作製
に成功した。

C57BL/6-EGFR^{mts} × C57BL/6-OCT4GFP において、肺癌
は C57BL/6-EGFR^{mts} と同様に発生した。

肺癌を摘出し、serial plantation を行うことができた。GFP 陽性細胞を免疫染色、FACS にて検出を試みたが非常に微量で細胞株としての単離は困難であった。serial plantation を EGFR-TKI 曝露下で継続することで GFP 陽性細胞がふえる可能性を考え、検討中である。



C57BL/6-EGFR^{mts} における EGFR-TKI、ゲフィチニブ、オシメルチニブ耐性モデルの樹立
皮下腫瘍モデルにおいて EGFR-TKI であるゲフィチニブの感受性は維持されており、*in vivo* で
治療を継続したところ、ヒト肺癌と同様に耐性化した。耐性機序を検
索したところヒト肺癌と同様に EGFR T790M など 2 次耐性遺伝子を認
めた (図4)。さらに興味深いことに第3世代 EGFR-TKI オシメルチニ
ブにてこのゲフィチニブ耐性腫瘍はよく制御された。オシメルチニブ
は約3ヶ月で耐性化した。これもヒト肺癌の臨床経過をよく反映する
結果となった。



以上より、肺癌幹細胞の安定的な単離、継代維持する系の樹立は未だ成功していないが、ヒト肺癌の臨床経過をよく反映するマウスモデルを樹立した。ヌードマウスではなく、免疫能が保持された C57BL/6 ベースの EGFR 変異肺癌マウスモデルは非常に貴重であり、免疫療法を含む新規治療方法開発のプラットフォームとなる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Tamura Tomoki, Kato Yuka, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro, Makimoto Go, Gotoda Hiroko, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Tanaka Takehiro, Ichimura Koichi, Maeda Yoshinobu, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki, Potential influence of interleukin-6 on the therapeutic effect of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 495 巻, 2018 年, 360-367
DOI:10.1016/j.bbrc.2017.10.175

Ninomiya Takashi, Nogami Naoyuki, Kozuki Toshiyuki, Harada Daijiro, Kubo Toshio, Ohashi Kadoaki, Kuyama Shoichi, Kudo Kenichiro, Bessho Akihiro, Fukamatsu Nobuaki, Fujimoto Nobukazu, Aoe Keisuke, Shibayama Takuo, Sugimoto Keisuke, Takigawa Nagio, Hotta Katsuyuki, Kiura Katsuyuki, A phase I trial of afatinib and bevacizumab in chemo-naive patients with advanced non-smallcell lung cancer harboring EGFR mutations: Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1404, *Lung Cancer*, 査読有, 115 巻, 2018 年, 103-108

DOI:10.1016/j.lungcan.2017.11.025

Hotta Katsuyuki, Aoe Keisuke, Kozuki Toshiyuki, Ohashi Kadoaki, Ninomiya Kiichiro, Ichihara Eiki, Kubo Toshio, Ninomiya Takashi, Chikamori Kenichi, Harada Daijiro, Nogami Naoyuki, Hirata Taizo, Hinotsu Shiro, Toyooka Shinichi, Kiura Katsuyuki, A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Non-Small Cell Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 査読有, 13 巻, 2018 年, 273-279

DOI:10.1016/j.jtho.2017.10.032

Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Tomida Shuta, Higo Hisao, Kayatani Hiroe, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki, MET or NRAS amplification is an acquired resistance mechanism to the third-generation EGFR inhibitor naquotinib, *Scientific Reports*, 査読有, 8 巻, 2018, on line

DOI:10.1038/s41598-018-20326-z

Kato Yuka, Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Tomida Shuta, Makimoto Go, Watanabe Hiromi, Kudo Kenichiro, Matsumoto Shingo, Umemura Shigeki, Goto Koichi, Ichihara Eiki, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Tabata Masahiro, Toyooka Shinichi, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki. Combined effect of cabozantinib and gefitinib in crizotinib-resistant lung tumors harboring ROS1 fusions. *Cancer Science*, 査読有, 109 巻, 2018, 3149-3158

DOI: 10.1111/cas.13752

Oda Naohiro, Hotta Katsuyuki, Ninomiya Kiichiro, Minami Daisuke, Ichihara Eiki, Murakami Toshi, Yokoyama Toshihide, Ichikawa Hirohisa, Chikamori Kenichi, Takigawa Nagio, Ochi Nobuaki, Harita Shingo, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki. A phase II trial of EGFR-TKI readministration with afatinib in advanced non-small-cell lung cancer harboring a sensitive non-T790M EGFR mutation: Okayama Lung Cancer Study Group trial 1403. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 査読有, 82 巻, 2018, 1031-1038

DOI: 10.1007/s00280-018-3694-5

Ichihara Eiki, Hotta Katsuyuki, Kubo Toshio, Higashionna Tsukasa, Ninomiya Kiichiro, Ohashi Kadoaki, Tabata Masahiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki. Clinical significance of repeat rebiopsy in detecting the EGFR T790M secondary mutation in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 査読有, 9 巻, 2018, 29525-29531

DOI: 10.18632/oncotarget.25705.

Senoo Satoru, Ohashi Kadoaki, Nishii Kazuya, Hara Naofumi, Kano Hirohisa, Ninomiya Kiichiro, Maeda Yoshinobu, Kiura Katsuyuki. Osimertinib Depletes EGFR T790M in the Spinal Fluid of Patients with Carcinomatous Meningitis of Lung Adenocarcinoma Harboring De Novo EGFR T790M. *Journal of Thoracic Oncology*, 査読有, 13 巻, 2018, e140-e142

DOI: 10.1016/j.jtho.2018.03.016

Kudo Kenichiro, Ohashi Kadoaki, Makimoto Go, Higo Hisao, Kato Yuka, Kayatani Hiroe, Kurata Yasuko, Takami Yoichiro, Minami Daisuke, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ichihara Eiki, Sato Akiko, Hotta Katsuyuki, Yoshino Tadashi, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki, Triplet therapy with afatinib, cetuximab, and bevacizumab induces deep remission in lung cancer cells harboring EGFR T790M in vivo, *Molecular Oncology*, 査読有, 11 巻, 2017 年, 670-681

DOI:10.1002/1878-0261.12063

Suzawa Ken, Yamamoto Hiromasa, Ohashi Kadoaki, Hashida Shinsuke, Tomida Shuta, Kubo Toshio, Maki Yuho, Soh Junichi, Tsukuda Kazunori, Kiura Katsuyuki, Miyoshi Shinichiro, Toyooka Shinichi. Optimal method for quantitative detection of plasma EGFR T790M mutation using droplet digital PCR system. *Oncology Reports*, 査読有, 37 巻, 2017, 3100-3106

DOI: 10.3892/or.2017.5567

Honda Yoshihiro, Takigawa Nagio, Ichihara Eiki, Ninomiya Takashi, Kubo Toshio, Ochi Nobuaki, Yasugi Masayuki, Murakami Toshi, Yamane Hiromichi, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on EGFR- or Fusion Gene-driven Lung Cancer Cells. *Acta Medica Okayama*, 査読有, 71 巻, 2017, 505-512

DOI: 10.18926/AMO/55587

Kudo Kenichiro, Hotta Katsuyuki, Bessho Akihiro, Nogami Naoyuki, Kozuki Toshiyuki, Kuyama Shoichi, Inoue Koji, Harita Shingo, Okada Toshiaki, Gemba Kenichi, Fujii Masanori, Takigawa Nagio, Oda Naohiro, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. Development of a skin rash within the first week and the therapeutic effect in afatinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC): Okayama Lung Cancer Study Group experience. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 査読有, 77 巻,

2016, 1005-1009

DOI: 10.1007/s00280-015-2910-9

Isozaki Hideko, Ichihara Eiki, Takigawa Nagio, Ohashi Kadoaki, Ochi Nobuaki, Yasugi Masayuki, Ninomiya Takashi, Yamane Hiromichi, Hotta Katsuyuki, Sakai Katsuya, Mastumoto Kunio, Hosokawa Shinobu, Bessho Akihiro, Sendo Toshiaki, Tanimoto Mitsune, Kiura Katsuyuki. Non-Small Cell Lung Cancer Cells Acquire Resistance to the ALK Inhibitor Alectinib by Activating Alternative Receptor Tyrosine Kinases. Cancer Research, 査読有, 76 巻, 2016, 1506-1516

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1010

〔学会発表〕(計 6 件)

Kazuya Nishii, Kadoaki Ohashi, Hisao Higo, Kenichiro Kudo, Go Makimoto, Hiroe Kayatani, Hiromi Watanabe, Kiichiro Ninomiya, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Kammei Rai, Eiki Ichihara, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. Novel Syngenic Lung Cancer Mouse Model Harboring EGFR Mutations. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference, 2018 July 10-12, Kyoto

Go Makimoto, Kadoaki Ohashi, Kazuya Nishii, Shuta Tomida, Hiroe Kayatani, Hisao Higo, Kiichiro Ninomiya, Hiromi Watanabe, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Eiki Ichihara, Akiko Sato, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Shinichi Toyooka, Yoshinobu Maeda, Katsuyuki Kiura. Analysis of the Rapid Acquired Resistance of ALK-positive Lung Cancers to Alectinib: A Comprehensive Study Using Autopsied Specimens and Patient-derived Cell Lines. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference, 2018 July 10-12, Kyoto

Kazuya Nishii, Kadoaki Ohashi, Go Makimoto, Hisao Higo, Kiichiro Ninomiya, Hiroe Kayatani, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Kammei Rai, Eiki Ichihara, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. In vivo efficacy of triplet therapy with osimertinib, cetuximab and bevacizumab for lung cancer cells harboring EGFR T790M. AACR Annual Meeting, 2018 April 14-18, Chicago

Kadoaki Ohashi, Hisao Higo, Go Makimoto, Kenichiro Kudo, Kazuya Nishii, Kiichiro Ninomiya, Hiroe Kayatani, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Kammei Rai, Eiki Ichihara, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. The novel osimertinib resistant lung cancer mice model harboring EGFR mutations driven by the SP-C promoter. AACR Annual Meeting, 2018 April 14-18, Chicago

Kiichiro Ninomiya, Kadoaki Ohashi, Shuta Tomida, Hiroe Kayatani, Tomoki Tamura, Hisao Higo, Go Makimoto, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Eiki Ichihara, Akiko Sato, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. Acquired resistance to the third-generation EGFR inhibitor ASP8273 is associated with MET or NRAS gene amplifications in preclinical models, AACR Annual Meeting, 2017 April 1-5, Washington, DC

Go Makimoto, Kadoaki Ohashi, Kazuya Nishii, Shuta Tomida, Hiroe Kayatani, Tomoki Tamura, Hisao Higo, Kiichiro Ninomiya, Takashi Ninomiya, Toshio Kubo, Eiki Ichihara, Akiko Sato, Katsuyuki Hotta, Masahiro Tabata, Katsuyuki Kiura. A comprehensive analysis of autopsied specimens and patient-derived cell lines in ALK-positive lung cancers with rapid acquired resistance to alectinib, AACR Annual Meeting, 2017 April 1-5, Washington, DC

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大橋 圭明
ローマ字氏名： Ohashi Kadoaki
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：60729193

研究分担者氏名：久保 寿夫
ローマ字氏名： Kubo Toshio
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：90726928

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉田 正
ローマ字氏名： Yoshida Tadashi

研究協力者氏名：高田 穰
ローマ字氏名： Takata Minoru

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、研究者個人に帰属されます。