

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2016

課題番号：16H06988

研究課題名(和文) 肺癌EGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性獲得とエピジェネティクス異常

研究課題名(英文) EGFR-TKI resistance and epigenetic alterations in lung cancer treatment

研究代表者

枝園 和彦(Shien, Kazuhiko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30708079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子に変異を有する肺癌に対しては、チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)が高い効果を示すことが知られている。一方で、EGFR-TKIによる治療中に薬の効果がなくなる薬剤耐性が問題となっている。我々は、この薬剤耐性を獲得する過程におけるマイクロRNAの異常と、その発現に関係する遺伝子の候補を同定し、これらを実験的に制御することでEGFR-TKIに対する薬剤耐性の一部が克服できる可能性が示唆される知見を得た。

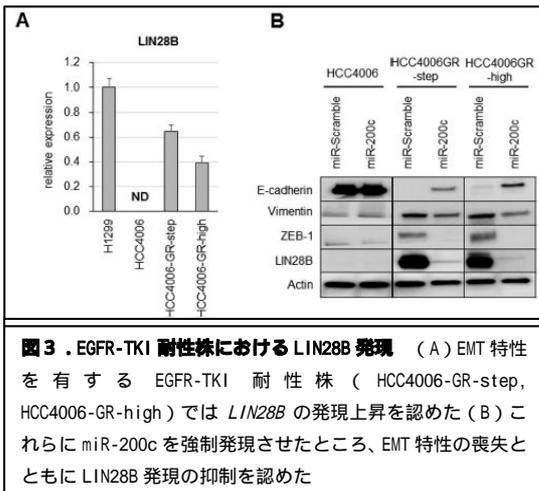
研究成果の概要(英文)：Patients with EGFR-activating mutations who initially respond to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) eventually acquire drug resistance, which is a critical problem in the treatment of patients with advanced lung cancer. In this study, we clarified the relation between epigenetic alteration and EGFR-TKI resistance. We found that the micro RNA-200 and LIN28B axis, known as an oncogenic stem-cell factor, plays an important role in the cell viability of acquired EGFR-TKI resistance cells.

研究分野：胸部悪性腫瘍(肺癌・悪性胸膜中皮腫)における治療感受性・抵抗性に関する研究、肺癌の外科治療

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR 薬剤耐性 マイクロRNA

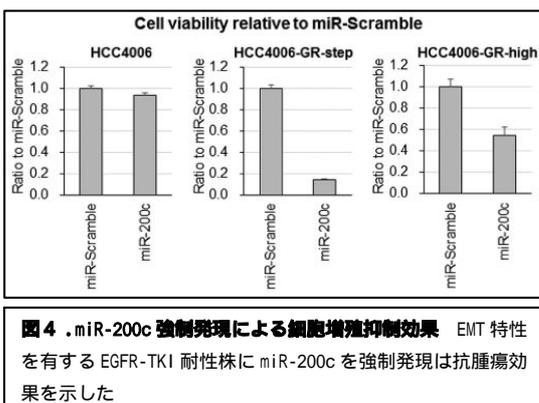
(2) EMT 特性を有する EGFR-TKI 耐性細胞株における miR-200s および LIN28B 発現

我々が以前に樹立した、EMT 特性を持ちながら EGFR-TKI 耐性を示す細胞株 (HCC4006-GR-step, HCC4006-GR-high) においても、親株 (HCC4006) に比べて *LIN28B* の発現が上昇していた (図 3A)。そこで、これらの耐性細胞株に pre-miR-200c を用いて miR-200c を強制発現させたところ、EMT 特性の消失とともに *LIN28B* 発現の抑制を認めた (図 3B)。



(3) EGFR-TKI 耐性株に対する治療法の確立

我々のこれまでの検討では、EMT 特性を示す EGFR-TKI 耐性株は、EGFR-TKI のみならずドセタキセル、パクリタキセル等の抗癌剤に対しても、親株と比較して高度の耐性を示すことが分かっており、新たな治療法の開発が求められてきた。まず、これらの耐性細胞株に対して miR-200 を強制発現させたところ、細胞の増殖が抑制された (図 4)。



一方で、これらの耐性細胞株における *LIN28B* 抑制による抗腫瘍効果も検討した。si-RNA によって *LIN28B* の発現をノックダウンしたところ、耐性株でのみ細胞の増殖が抑制された (図 5A)。また、*LIN28B* ノックダウン後の下流の蛋白発現変化を検討したところ、miR-200c 強制発現時と同様に、耐性株における EMT 特性の喪失を示した。さらに、*LIN28B* ノックダウンは、耐性株でのアポトー

シスマーカー cleaved-PARP (c-PARP) 発現増加を示し、*LIN28B* がこれら耐性株における細胞増殖に深く関わっている可能性を示唆していると考えられた。

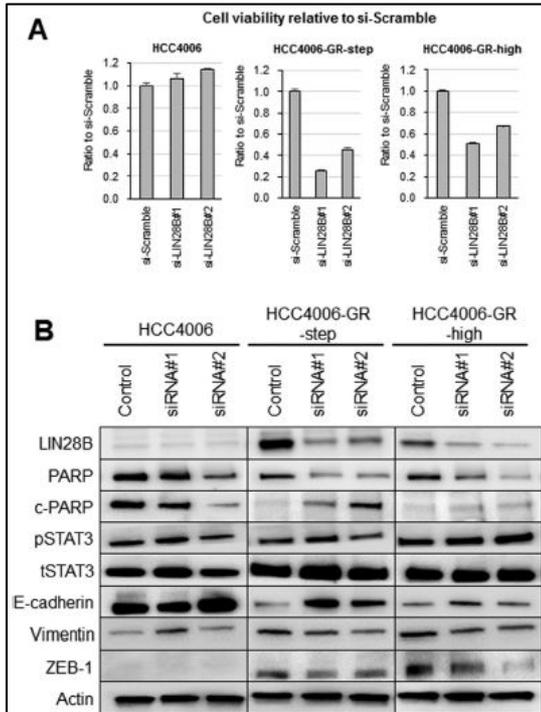


図 5 . LIN28B ノックダウンによる細胞増殖および下流経路への影響 (A) *LIN28B* ノックダウンにより、EMT 特性 EGFR-TKI 耐性株の増殖を抑制した (B) ノックダウンによるアポトーシスマーカーの cleaved-PARP (c-PARP) 発現上昇とともに、EMT 特性の喪失を認めた

miR-200c と *LIN28B* の直接的な相互関係を示唆するこのような知見はこれまでに報告がなく、さらに詳細な検討を要するが、これらは EGFR-TKI 治療による EMT 特性の獲得と miR-200 の発現抑制というエピジェネティックな変化における、*LIN28B* 遺伝子の関与を示す重要な知見と考えられた (図 6)。

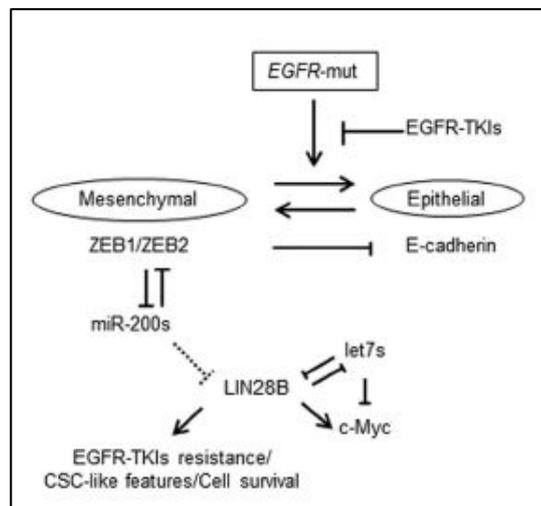


図 6 . EGFR-TKI 耐性化機序における EMT 特性獲得と miR-200c/LIN28B の関係

(4) EGFR-TKI 治療後に耐性を示した臨床肺癌検体における miR-200c 発現変化および EMT/LIN28B 発現変化

EGFR-TKI 治療後に耐性を示した臨床肺癌検体における、これらの miR-200s/LIN28B 経路の関与を証明するために、miR-200c 発現を検討したところ、治療前に比べて耐性化後に miR-200c の発現が低下していた(図 7A)。さらにこれらの検体において EMT マーカーおよび LIN28B の免疫染色を行ったところ、EMT 特性の獲得と共に、LIN28B 発現上昇を認めており、実際の肺癌検体でもこれらの関与が考えられた(図 7B)。

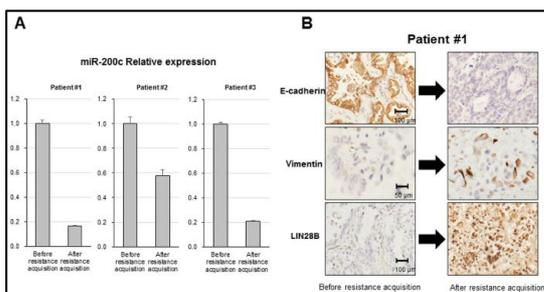


図 7 .EGFR-TKI 耐性臨床検体における miR-200c/LIN28B (A) EGFR-TKI 耐性獲得前後において miR-200c 発現低下を認めた (B) これらの検体では EMT 特性の獲得と共に、LIN28B の発現上昇を認めていた

(5) まとめ

今回の検討により、これまで不明な点も多かった EGFR-TKI 耐性獲得過程における EMT 特性関与についての一端が明らかになった。特に、EMT 特性獲得が EGFR-TKI 耐性にどのように関与しているかという点について、miR-200s のプロモーター領域のメチル化による発現低下とともに、LIN28B という新たな分子の過剰発現の存在が明らかとなり、今後の治療標的となり得る可能性が考えられた。

今回の検討から、miR-200c の強制発現および LIN28B の発現抑制が、EGFR-TKI 耐性株の増殖を抑制する可能性が明らかとなった。しかし、現在のところこれらの発現を制御できる薬剤は見つかっていない。今後、腫瘍細胞に miR-200 を効果的に導入できる技術の開発、あるいは LIN28B の発現を特異的に抑制できる分子標的薬の開発、あるいは他の疾患に対する治療薬でこれら miR-200/LIN28B 異常に直接作用する薬剤の同定(いわゆる drug repositioning)等が、薬剤耐性によって有効な治療法がなくなった EGFR-TKI 耐性症例の新たな治療法の提案に向け、非常に重要になると考えられた。

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 1 件)

Hiroki Sato, Kazuhiko Shien, Shuta Tomida, 他 11 名, Targeting the miR-200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features, *Scientific Reports*, 査読有, 2017, 7, 40847, DOI:10.1038/srep40847

[学会発表](計 1 件)

Kazuhiko Shien, Hiroki Sato, Ken Suzawa, 他 10 名, Targeting miR-200c/LIN28B Axis in Acquired EGFR-TKI Resistance Non-Small Cell Lung Cancer Cells Harboring EMT Features, IASLC World Congress on Lung Cancer 2017, 2016/12/7, Vienna (Austria)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝園 和彦 (SHIEN, Kazuhiko)
岡山大学病院・呼吸器外科・助教
研究者番号: 30708079

(2) 研究協力者

佐藤 博紀 (SATO, Hiroki)
富田 秀太 (TOMIDA, Shuta)
豊岡 伸一 (TOYOOKA, Shinichi)