

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09639

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌における抗癌薬耐性化の克服を目指したヒストン修飾酵素阻害療法の開発

研究課題名(英文) Development of potential therapy using histone modifying enzyme inhibitor to overcome drug resistance of non-small lung cancer

研究代表者

木下 一郎 (Kinoshita, Ichiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：40343008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱メチル化酵素JARID1a/bの阻害薬PBITは、癌幹様細胞を減少させ、薬剤耐性細胞の抗がん薬感受性を回復させた。さらに、PBITはEGFR阻害薬感受性細胞において、FRA1転写因子のプロモーター領域のヒストンH3K4の脱メチル化を抑制し、EGFR阻害薬によるFRA1の発現の低下を解除し、分泌シグナルのネットワーク(セクレトーム)を変化させることで、EGFR阻害薬耐性細胞の出現・増殖を抑制した。JARID1阻害薬はNSCLCのEGFR阻害薬を含む抗がん薬の耐性化を克服する新たな治療戦略とな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

ドライバー遺伝子変異を標的にした分子標的治療の進歩が著しいが、肺癌をはじめとする固形癌では最終的に薬剤耐性が出現し、進行肺癌の克服のためには新たなブレイクスルーが必要である。ヒストン脱メチル化酵素JARID1a/b阻害薬は、癌幹様細胞の減少に加え、抗がん薬感受性細胞の分泌シグナルのネットワーク(セクレトーム)を変化させることにより、抗がん薬耐性化を克服することが示され、肺癌の新たな治療戦略となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：PBIT, a small molecule inhibitor of the JARID1a/b histone demethylases, restored the drug sensitivity of multiple drug-resistant persister cells that were established from NSCLC lines. In addition, PBIT prevented the expansion of EGFR-TKI-resistant persisters through modifying secretomes from EGFR-TKI sensitive cells by inhibiting downregulation of FRA1 expression via prevention of decreased H3K4me3 levels at FRA1 promoter regions. These findings suggest the potential efficacy of PBIT as a novel therapeutic strategy for lung cancer and have particularly important implications in restoring drug resistance in NSCLC, given that patients with activating EGFR mutations who are given EGFR-targeted therapies commonly develop resistance.

研究分野：腫瘍内科学、がんゲノム医療学

キーワード：ヒストン修飾 脱メチル化酵素 JARID1 PBIT 肺癌 EGFR 薬剤耐性 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌を含む多くの悪性腫瘍は、強い抗がん薬抵抗性を示す少数の細胞集団である癌幹細胞から形成されてくることが示され、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須と考えられる。癌幹細胞 - 非癌幹細胞の移行には可塑性があり、ゲノムの塩基配列には規定されず、可逆的なエピジェネティック制御を担うヒストン修飾が重要な役割を果たしている可能性がある。特に ES 細胞の維持と分化誘導を制御する H3K4 の脱メチル化 (H3K4me2/3 の低下) は、癌幹細胞の維持にも関わることが知られてきた。

H3K4 の脱メチル化酵素 JARID1a および JARID1b が非小細胞肺癌 (NSCLC) で高発現していることが示された。さらに、ドライバー遺伝子変異陽性の高感受性細胞株に分子標的薬を IC50 の 100 倍を超える濃度 (標準治療で到達する濃度) で曝露した際、幹細胞マーカー陽性の耐性細胞が少数生き残り (persister 細胞) 1 ヶ月程度曝露を続けると、新たな遺伝子変異を起こさずに増殖能を獲得するという現象が報告された (Sharma et al. Cell 2010)。persister 細胞はともに可逆的なクロマチン変化を認め、JARID1a による H3K4 の脱メチル化が主な役割を担っていること、JARID1a の siRNA によるノックダウンや、HDAC 阻害薬によっても、その薬剤耐性が解除されることが示された。

研究代表者は EGFR 変異陽性肺腺癌細胞 PC9 に EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) のゲフィチニブ (1 μM) を曝露した際に、数%の persister 細胞が残存し、H3K4me3 の低下と JARID1b の発現亢進を認めることを確認した。さらに、最初の JARID1a/b 阻害薬として報告された 2-(4-(4-methylphenyl)-1,2-benzisothiazol-3(2H)-one (PBIT) (Sayegh et al. J Biol Chem 2013) が、細胞増殖に影響を与えない 1 μM の低濃度で、persister 細胞の H3K4 脱メチル化を解除し、persister 細胞の出現を抑制する予備実験結果を得た。

一方、ALK-TKI や EGFR-TKI を各々の高感受性細胞に曝露した際に、種々の増殖因子やサイトカイン等の分泌による複雑な分泌シグナルネットワーク (セクレトーム) が形成され、こうしたセクレトームが薬剤耐性細胞の増殖・浸潤・転移能を促進し、感受性細胞に対しても生存をサポートするという現象が報告された (Obenauf et al. Nature 2015)。このセクレトームはこれら TKI 曝露後に生じる AP1 転写因子メンバー FRA1 の抑制によって制御されていることも示された。

以上より、PBIT による JARID1 阻害が、H3K4 脱メチル化によるクロマチン変化を抑制し、同時に FRA1 発現低下によるセクレトーム誘導を抑制することによって、薬剤耐性を阻害する可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では PBIT による JARID1 阻害をはじめとしたヒストン修飾酵素阻害による NSCLC 細胞における抗がん薬耐性化の克服を最終目標とし、その基盤となる研究を行う。

(1) 種々の高感受性 NSCLC 細胞に感受性の高い抗がん薬を高濃度 (標準治療で到達する濃度) で曝露させ、persister 細胞が出現すること、JARID1a/b の発現が亢進し H3K4 が脱メチル化されることを確認し、低濃度 PBIT によりこれらの薬剤耐性が解除されることを明らかにする。

(2) persister 細胞における幹細胞マーカーの発現、細胞周期やシグナル伝達の状態と、PBIT を作用させた時の変化を検討し、PBIT による薬剤耐性阻害の作用機構を明らかにする。

(3) EGFR-TKI を高感受性細胞に曝露して回収した培養上清が非感受性細胞の増殖を促進すること、EGFR-TKI 曝露後によって FRA1 の発現が抑制されることを確認し、PBIT を加えた場合の効果とその作用機序、特に FRA1 抑制解除の機序とセクレトームの変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 8 種類の NSCLC 細胞株を用いて、PBIT による H3K4 脱メチル化抑制効果をウエスタンブロット法で、細胞増殖抑制効果を MTT 法で検討した。

(2) 各々の細胞株に感受性の高い抗がん薬を高濃度で短期間曝露することで persister 細胞を作製し、persister 細胞に対する PBIT の薬剤耐性抑制効果をコロニー形成法とウエスタンブロット法で検討した。

(3) EGFR-TKI を感受性細胞に曝露した際の馴化培養液 (conditioned medium; CM) の性状と FRA1 の変化を解析し、PBIT の併用時と比較した。

(4) EGFR-TKI 長期曝露時の耐性細胞出現に与える PBIT の影響を解析した。

4. 研究成果

(1) PBIT が NSCLC 細胞株において 1 μM から H3K4me3 レベルを上昇させることを確認した。次に PBIT が NSCLC 細胞株や正常肺上皮細胞株の増殖を抑制するか検討したところ、

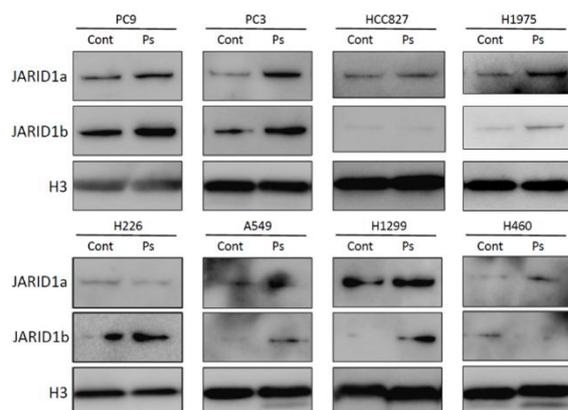


図 1: Persister 細胞 (Ps) と、その元の細胞 (Cont) の JARID1a、JARID1b の蛋白発現をウエスタンブロットで評価した。

肺癌細胞株の IC50 は 10-30 μM と比較的高く、正常肺上皮細胞株との差はわずかであった。

(2) PBIT が薬剤耐性細胞に与える効果について検討した。高濃度の抗がん薬に短期間曝露し生き残った persister 細胞を薬剤耐性細胞として使用した。抗がん薬はそれぞれの細胞株に高い感受性を持つものを用いた (PC9、PC3、HCC827 はゲフィチニブ、H1975 はオシメルチニブ、H226 はシスプラチン、H460、A549、H1299 パクリタキセル)。Persister 細胞は抽出に用いた抗がん薬に耐性であることを確認した。Persister 細胞は JARID1a、JARID1b のどちらか、または両方の発現が上昇していた (図 1)。また H1975 の side population 細胞でも、JARID1a と幹細胞マーカーである OCT-4 の発現が上昇していた。

(3) 低濃度の PBIT が persister 細胞に与える影響について検討した。コロニー形成アッセイで評価したところ、persister 細胞がコロニーを形成できたのは、PC9、HCC827、H1975、H226 の 4 つだった。それぞれ抗がん薬群、PBIT 群、抗がん薬と PBIT の併用群で 3 週間薬剤曝露を行ったところ、4 つの細胞株とも併用群で最もコロニー形成を抑制することができた (図 2)。またこの 4 つの persister 細胞は H3K4me3 の発現の減少と幹細胞マーカー OCT-4 の発現亢進を認め、PBIT を曝露することでその変化を打ち消した (図 3)。

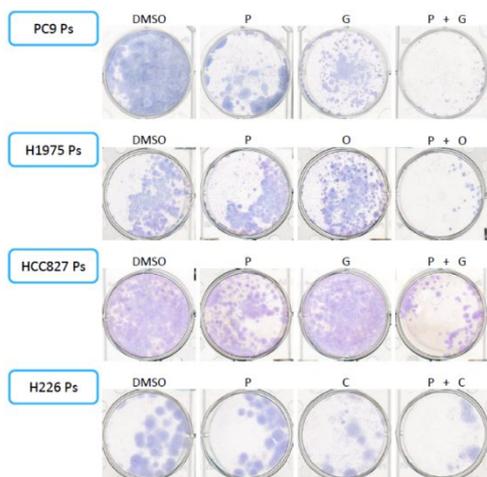


図2:PC9 Ps, H1975 Ps, HCC827 Ps, H226 Ps をゲフィチニブ 0.1 μM (G)、オシメルチニブ 0.1 μM (O)、シスプラチン 5 μM (C)、PBIT 5 μM (P)とその併用にそれぞれ3週間曝露した。代表的なコロニー形成画像を示す。

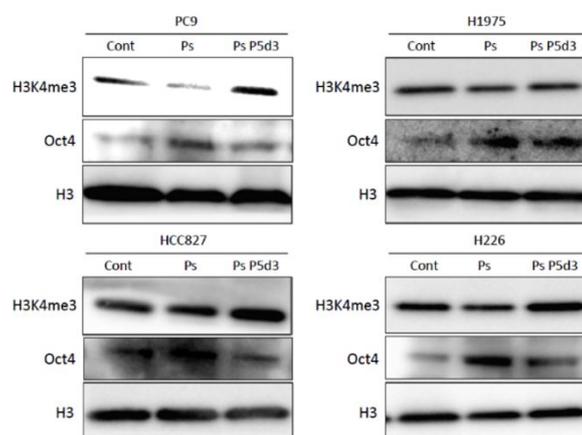


図3:PC9 Ps, H1975 Ps, HCC827 Ps, H226 Ps を PBIT 5 μM に 3 日間曝露した (P5d3)。それぞれの細胞株の H3K4me3 と Oct-4 の蛋白発現をウエスタンブロット法で評価した。

(4) PBIT がセクレトームに変化をもたらすか検討するため、EGFR-TKI 感受性細胞株 (PC9、H1975) に EGFR-TKI (ゲフィチニブ、オシメルチニブ) を曝露した後の CM と、PBIT で前処置した (preP-) EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した後の CM を回収し、それぞれの培養液が EGFR-TKI 耐性の肺癌細胞株 (EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株または persister 細胞) の増殖を変化させるかを検討したところ、前者は細胞増殖を促進させたが、後者は細胞増殖を促進させなかった (図 4)。

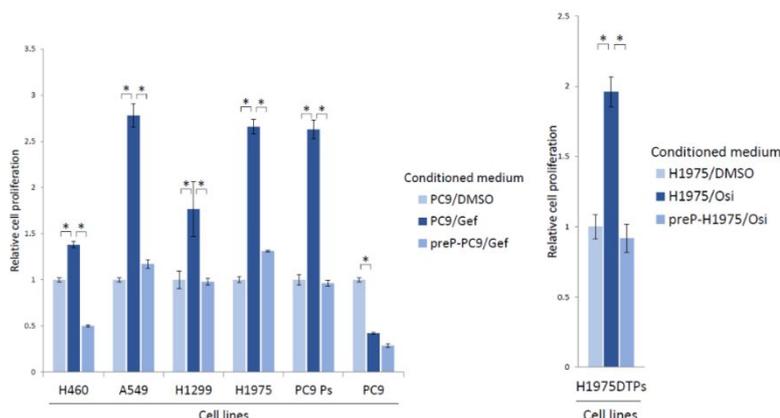


図4:(左)コンディショニングメディウムをゲフィチニブ 0.1 μM に曝露した PC9 (PC9/Gef) と、ゲフィチニブ 0.1 μM に曝露した preP-PC9(preP-PC9/Gef)から回収した。ゲフィチニブ耐性細胞として、EGFR 野生型肺癌細胞株と PC9 persister (Ps) を用いた。それぞれの細胞の各コンディショニングメディウム中での 72 時間後の細胞増殖を評価した。(右)コンディショニングメディウムをオシメルチニブ 0.1 μM に曝露した H1975 (H1975/Osi) と、オシメルチニブ 0.1 μM に曝露した preP-H1975(preP-H1975/Osi) から回収した。オシメルチニブ耐性細胞として H1975 Ps を用い、上記と同様に細胞増殖を評価した。グラフは平均 \pm SD (n=4) で表記。* $p < 0.05$ (マン・ホイットニーの U 検定)。

(5) EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露したものと、preP-EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した細胞の FRA1 の発現を検討したところ、前者は FRA1 の発現が低下していたが、後者はその発現低下が打ち消されていた。また FRA1 のプロモーター領域における H3K4me3 のレベルをクロマチン免疫沈降法で検討したところ、前者は H3K4me3 レベルが低下していたが、後者はその低下が打ち消された(図5)。IGF-1R 経路の活性化が EGFR-TKI 耐性に関与しているという報告が複数あるため、IGF-1 の濃度を測定したところ、細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中では濃度が上昇していたが、preP-細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中ではその上昇が軽減された(図6)。

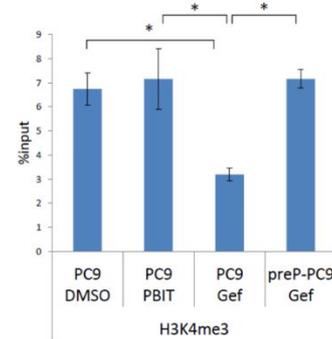
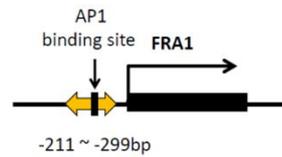


図5: FRA1 のプロモーター領域における H3K4me3 のクロマチン免疫沈降法。共沈した DNA はリアルタイム PCR で分析した。グラフは平均 ± SD (n=3) で表記。*P<0.05 (マン・ホイットニーの U 検定)。

(6) PBIT が EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑えるか検討するため、96 穴プレートを用いて多くの EGFR-TKI 感受性細胞グループを作り、EGFR-TKI ± PBIT を 4 週間曝露したところ、PBIT 併用で耐性細胞の減少を認めた(図7)。また PBIT 併用時の IGF-1R 経路の変化を検討したところ、その下流の活性化が PBIT 併用時は抑えられていることが分かった。また、ソフトアガロース法による検討で、PBIT 単剤 4 週間の曝露でコロンニー形成抑制効果を有さないことを確認した。

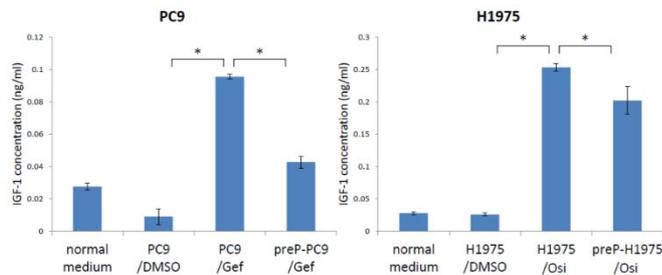


図6: 各コンディショニングメディウム中の IGF-1 の濃度を ELISA で評価した。グラフは平均 ± SD (n=3) で表記。*P<0.05 (マン・ホイットニーの U 検定)。

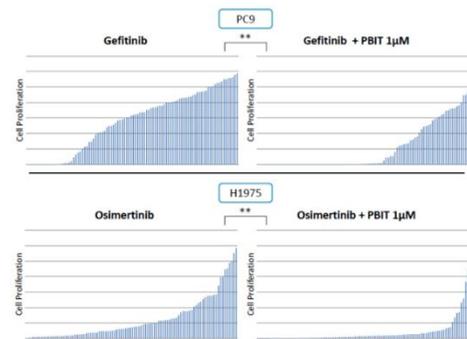
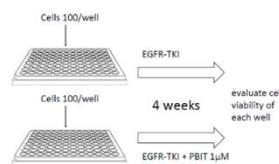


図7: (左) 実験のシェーマ。EGFR-TKI 単剤または PBIT との併用に 4 週間曝露した後、各ウェルの細胞増殖を MTT アッセイで評価した。(右) PC9 はゲフィチニブ 1 µM 単剤または PBIT 1 µM 併用に曝露し、H1975 はオシメルチニブ 1 µM 単剤または PBIT 1 µM 併用に曝露した。各バーは 1 つのウェルの細胞増殖を示している。**P<0.01 (マン・ホイットニーの U 検定)。

以上、JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT は、癌幹様細胞を減少させ、薬剤耐性 persister 細胞の薬剤感受性を回復させた。さらに、PBIT は EGFR-TKI 感受性細胞の FRA1 のプロモーター領域の活性化マーカー H3K4me3 の脱メチル化を抑制することによって FRA1 の発現の低下を抑え、EGFR-TKI で誘導される IGF-1 を含むセクレトームを抑え、EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑制した。JARID1 阻害薬は NSCLC の EGFR-TKI を含む抗がん薬の耐性化を克服する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takashima Yuta, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Suzuki Motofumi, Kikuchi Hajime, Maeda Makie, Shoji Tetsuaki, Furuta Megumi, Kinoshita Ichiro, Dosaka Akita Hirotooshi, Sakakibara Konishi Jun, Konno Satoshi	4. 巻 146
2. 論文標題 Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1 inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32515	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 -
1. 著者名 Shoji T, Kikuchi E, Kikuchi J, Takashima Y, Furuta M, Takahashi H, Tsuji K, Maeda M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Sakakibara-Konishi J, Konno S	4. 巻 in print
2. 論文標題 Evaluating the immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small cell and non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol	6. 最初と最後の頁 in print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-020-04061-9	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 -
1. 著者名 Furuta Megumi, Kikuchi Hajime, Shoji Tetsuaki, Takashima Yuta, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Kinoshita Ichiro, Dosaka Akita Hirotooshi, Sakakibara Konishi Jun	4. 巻 110
2. 論文標題 DLL3 regulates the migration and invasion of small cell lung cancer by modulating Snail	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1599 ~ 1608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kikuchi Hajime, Sakakibara-Konishi Jun, Furuta Megumi, Kikuchi Eiki, Kikuchi Junko, Oizumi Satoshi, Hida Yasuhiro, Kaga Kichizo, Kinoshita Ichiro, Dosaka-Akita Hirotooshi, Nishimura Masaharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Numb has distinct function in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29379 ~ 29391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashina T, Asahina H, Oizumi S, Yamada N, Harada M, Takamura K, Yokouchi H, Harada T, Honjo O, Ogi T, Morikawa N, Kinoshita I, Honda R, Nakano K, Kanazawa K, Amano T, Dosaka-Akita H, Isobe H, Nishimura M	4. 巻 23
2. 論文標題 A phase II study of carboplatin, pemetrexed, and bevacizumab followed by erlotinib and bevacizumab maintenance for non-squamous non-small cell lung cancer with wild-type EGFR (HOT1101)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1318-z	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 -

1. 著者名 Takashima Yuta, Sakakibara-Konishi Jun, Hatanaka Yutaka, Hatanaka Kanako C., Ohhara Yoshihito, Oizumi Satoshi, Hida Yasuhiro, Kaga Kichizo, Kinoshita Ichiro, Dosaka-Akita Hiroto, Matsuno Yoshihiro, Nishimura Masaharu	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinicopathologic Features and Immune Microenvironment of Non-Small-cell Lung Cancer With Primary Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 352 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clcc.2018.02.004	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 -

1. 著者名 Oizumi S, Sugawara S, Minato K, Harada T, Inoue A, Fujita Y, Maemondo M, Watanabe S, Ito K, Gemma A, Demura Y, Fukumoto S, Isobe H, Kinoshita I, Morita S, Kobayashi K, Hagiwara K, Aiba K, Nukiwa T	4. 巻 3
2. 論文標題 Updated survival outcomes of NEJ005/TCOG0902: a randomised phase II study of concurrent versus sequential alternating gefitinib and chemotherapy in previously untreated non-small cell lung cancer with sensitive EGFR mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ESMO Open	6. 最初と最後の頁 e000313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/esmopen-2017-000313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikezawa Y, Asahina H, Oizumi S, Watanabe M, Takamura K, Kawai Y, Yamada N, Harada T, Kinoshita I, Fujita Y, Miyauchi E, Ogi T, Amano T, Furuta M, Sakakibara-Konishi J, Nishihara H, Dosaka-Akita H, Isobe H, Nishimura M; Hokkaido Lung Cancer Clinical Study Group	4. 巻 80
2. 論文標題 A randomized phase II trial of erlotinib vs. S-1 as a third- or fourth-line therapy for patients with wild-type EGFR non-small cell lung cancer (HOT1002)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol	6. 最初と最後の頁 955-963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-017-3432-4	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 有賀伸、木下一郎、菊地順子、清水康、秋田弘俊
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素JARID1阻害薬による非小細胞肺癌細胞のEGFR-TKI耐性化の抑制
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有賀伸、木下一郎、菊地順子、清水康、秋田弘俊
2. 発表標題 JARID1ファミリー阻害薬はEGFR変異陽性肺癌細胞株の薬剤耐性化を緩和する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kinoshita I, Goda T, Watanabe K, Maemondo M, Oizumi S, Amano T, Hatanaka Y, Matsuno Y, Nishihara H, Asahina H, Harada T, Goto K, Isobe H, Nishimura M, Dosaka-Akita H
2. 発表標題 A phase II study of trastuzumab monotherapy in pretreated patients with non-small cell lung cancers (NSCLCs) harboring HER2 alterations: HOT1303-B trial
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology 2018 Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ariga S, Kinoshita I, Kikuchi J, Shimizu S, Dosaka-Akita H
2. 発表標題 JARID1 family inhibitor reduces generation of drug resistant EGFR-mutation positive lung cancer cells
3. 学会等名 110th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有賀伸、木下一郎、菊地順子、清水康、秋田弘俊
2. 発表標題 JARIDファミリー阻害薬の非小細胞肺癌細胞株に対する効果
3. 学会等名 第58回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----