

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08555

研究課題名(和文) 肺癌治療において分子標的治療薬が惹起する薬剤性肺障害の発症機序の解明とその克服

研究課題名(英文) Overcoming drug-induced interstitial lung disease caused by molecular targeted therapy in lung cancer

研究代表者

南 俊行 (Minami, Toshiyuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00705113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の内科的治療成績は、近年の分子標的治療の進歩により劇的に改善した。その一方で、分子標的治療薬は致死的な薬剤性肺障害を惹起する事も少なくない。申請者らは肺癌細胞と腫瘍関連マクロファージとの相互作用に着目した。ドライバー遺伝子変異陽性肺癌症例に対する小分子阻害剤は奏効率も高く、無数の肺癌細胞をsenescenceに導く事ができるが、その際には大量のSenescence-associated secretory phenotype(SASP)が放出される。これらによるTAMの活性化が「炎症」と「線維化」に関わり、薬剤性肺障害を惹起すると考え、その鍵分子としてYAP/TAZに注目して解析している。

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とした小分子阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の登場で、肺癌の予後は確実に改善している。その一方で、約5%の症例では小分子阻害剤やICIによる重篤な薬剤性肺障害を発症してしまう。また、もともと間質性肺炎を合併した肺癌症例では、内科的治療が主となる事が多いにも関わらず、やはり急性増悪のリスクから安全に使用できる薬剤が少なく、治療選択肢が極めて限られている。本研究でYAP/TAZの制御により、小分子阻害薬やICIによる薬剤性肺障害のリスクを低減できれば、現行治療がより安全にできるだけでなく、これらの薬剤が不適格とされていた症例にも適応を拡大できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recent molecular-targeted therapy brought about dramatic improvement in the outcome of the patients with lung cancer. On the other hand, those molecular-targeted therapy sometimes causes fatal drug-induced interstitial lung disease (ILD). We focused on the interaction between lung cancer cells and tumor-associated macrophages (TAMs) which are one of the major components of tumor microenvironment. Small molecule inhibitors such as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor and anaplastic lymphoma kinase inhibitor exert dramatic antitumor activity and can induce senescence in large number of lung cancer cells. Senescent cells release abundant senescence-associated secretory phenotype (SASP). These SASP are supposed to be associated with activation of TAMs, which cause ILD via inducing both inflammation and fibrosis. We considered that regulation of transcriptional co-activators YAP and TAZ could reduce the occurrence of ILD via suppressing the production of SASP.

研究分野：呼吸器悪性腫瘍

キーワード：ドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌 薬剤性間質性肺炎 Hippoシグナル伝達系 腫瘍関連マクロファージ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺癌、特に非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer: NSCLC) の診療は、近年の相次ぐ分子標的治療薬の登場により格段に向上した。これら分子標的治療薬は(1)ドライバー遺伝子変異陽性例に対する小分子阻害剤、(2)血管新生阻害剤、(3)免疫チェックポイント阻害剤の3つに大別され、(1)がもたらす高い奏効率、(2)の併用による従来の化学療法の効果増強、(3)による全生存期間の大幅な持続的延長により、これまでの「化学療法による肺癌の根治は不可能」という概念は覆されつつあり、これらの薬剤の併用療法も既に標準治療として実臨床に応用されている。その一方で、分子標的治療薬は致死的な薬剤性肺障害を惹起する事も少なくなく、さらにもともと間質性肺炎を合併している症例では、急性増悪のリスクのためその使用が禁忌かまたは安全性が未確認のため使用が推奨されていない状況である。

本研究において、申請者らは肺癌細胞とその周囲の癌微小環境、特に腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) との相互作用に着目した。腫瘍周囲の微小環境を構成するメインの細胞の一つである TAM は、腫瘍から分泌される種々のサイトカインの影響で、血管新生や腫瘍免疫の抑制に関わり、腫瘍の増殖や転移の促進に関わるとされている (Yang L. & Zhang Y. J Haematol Oncol. 2017.)

間質性肺炎 (Interstitial pneumonia: IP) の増悪は、肺胞壁の「炎症」と、活性化した線維芽細胞が大量に細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) を産生する事で惹起される「線維化」がその本態とされる。線維芽細胞の活性化には、組織修復に働く代替的活性化マクロファージ (Alternatively activated macrophage: M2-M) が関与しているとされ (Bagnato G. & Harari S. Eur Respir Rev. 2015.) TAM もまた M2-M の特に M2d-M に分類されているため、線維化の促進に関わっていると推測されるが、分子標的治療中の TAM と線維芽細胞の相互作用については未だ解明されていない。申請者らは本研究において、TAM と線維芽細胞を繋ぐ key molecule を同定し制御する事で、分子標的治療薬による薬剤性肺障害 (Interstitial Lung Disease: ILD) の発症リスクの低減が可能か、また既に IP を合併している肺癌症例に対しても安全に分子標的治療を行うことが可能かを検証する事とした。

2. 研究の目的

EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) をはじめとするドライバー遺伝子変異陽性肺癌症例に対する小分子阻害剤は奏効率も高く、無数の肺癌細胞を apoptosis や senescence に導く事ができるが、その際には大量の Damage-associated molecular patterns (DAMPs) や Senescence-associated secretory phenotype (SASP) が放出されると考えられる (Hernandez C et al. Oncogene. 2016., Faget DV et al. Nat Rev Cancer. 2019.) これらの DAMPs や SASP は主に proinflammatory mediator として働くが、申請者らはこれらが TAM を活性化する事が「炎症」の trigger となると同時に、TAM 由来の profibrotic mediator が「線維化」を来し、ILD を惹起すると考えている。申請者らは、これら一連の反応の Key となる分子として転写活性化補助因子 YAP/TAZ に注目した。

YAP/TAZ は脱リン酸化して細胞の核内に移行すると、TEAD などの転写因子と結合し、細胞の増殖や生存に関わる遺伝子をはじめ、様々な遺伝子の発現を誘導するが、その中には M の活性化や遊走を促進させる CSF-1 や CCL2 といった cytokine や chemokine も含まれている (Shibata M et al. Int J Cancer. 2018.) 分子標的治療により腫瘍細胞の核内に YAP/TAZ が移行すると、これら液性因子が SASP として放出され、DAMPs と共に TAM を活性化し、profibrotic mediator が放出され、線維芽細胞の活性化が惹起されると考えた (図 1)。その上、線維芽細胞が産生する大量の ECM は腫瘍細胞に対し伸展刺激などの mechanotransduction を誘導し、YAP/TAZ をさらに

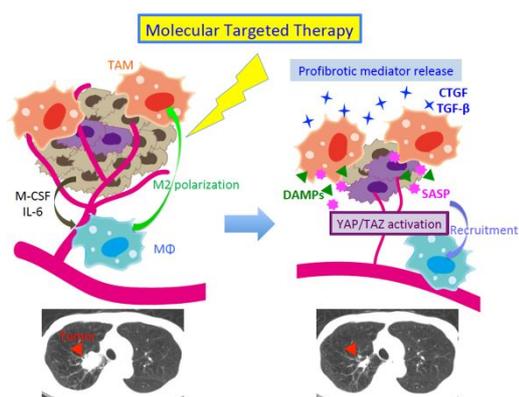


図 1 仮説：分子標的治療中の TAM の活性化

活性化させる positive feedback をもたらしていると思われる。これらから、分子標的治療による ILD や IP の急性増悪の最初の step には腫瘍細胞における YAP/TAZ の活性化が関与していると推測される。本研究の目的は YAP/TAZ の制御により分子標的治療薬の安全性を向上させ、最終的には実臨床においてその適応可能症例の拡大につなげる事である。

3. 研究の方法

➤ 材料

(1) 細胞

ヒト EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞 HCC827、ALK 融合遺伝子陽性細胞 H2252、ヒト単球

系白血病細胞 THP-1 は ATCC より購入し、いずれの細胞も 10%FBS を含む RPMI1640 培地で培養した。

(2) 試薬および抗体

EGFR-TKI Osimertinib および ALK TKI Alectinib はいずれも Selleck 社より、免疫蛍光染色に用いた抗 YAP/TAZ 抗体は Santa Cruz 社より、western blot に用いた抗 YAP 抗体および抗 TAZ 抗体と抗 GAPDH 抗体は Cell Signaling Technology (CST)社より、Cytokine array については Abcam 社より購入した。

➤ 方法

(1) 定量 PCR (qRT-PCR)

New England Biolab 社の Monarch RNA Purification Columns を用いて細胞から RNA を抽出し、cDNA に逆転写した上で、Applied 社の StepOne Real-Time PCR システムを用いて、mRNA の発現を SYBR Green 色素の取り込みにより評価した。

(2) Western Blotting (WB)

Whole Cell Lysate(WCL) sample には細胞を氷冷した PBS で 2 度洗浄した後、RIPA buffer を用いて、細胞を溶解し、溶解産物を 30 分氷上で incubate した後、13000 回転で 15 分遠心し、その上清を回収した。SDS を含む sample buffer を加え、5-20%の gradient gel に泳動し、PVDF 膜に転写し、250~500 倍に希釈した各 1 次抗体と共に、4℃で一晩 incubate し、HRP conjugate 抗マウス IgG またはラビット IgG 抗体の 2 次抗体を乗せ、化学発光法で、蛋白を検出した。

(3) 免疫蛍光染色 (Immunofluorescence: IF)

各条件で培養した細胞を 4% PFA で室温 30 分固定し、0.1%の Triton-X-100 で透過処理を行った上、100 倍希釈した 1 次抗体を乗せ、4℃で一晩 incubate した。翌日 Alexa488 で蛍光ラベルされた 2 次抗体で目的蛋白を検出した。観察には Keyence 社の BZ-X700 蛍光顕微鏡をしようした。

(4) Cytokine Array

HCC827 細胞および H2228 細胞を DMSO またはそれぞれに特異的な TKI である osimertinib および alectinib で 48 時間刺激し、製造メーカーのマニュアルに従い、添付の Cell Lysis Buffer を用いて、蛋白質サンプルを抽出した。BCA 法で蛋白定量をおこなった上で、200μg のサンプルを抗 cytokine 抗体が spot 状に付着したメンフレンに添加。Biotin conjugate 抗体カクテルを添加し、incubate したのち、streptavidin で化学発光を行なった。

(5) CRISPR/Cas9 システムによる YAP および TAZ knockout (KO) 細胞の作成

Horizon Discovery 社の Dharmacon All-in-one システムを用いて、YAP および TAZ を標的とした single guide RNA (sgRNA) plasmid と packaging の lentivirus vector plasmid を HEK293 細胞に transfection し、sgRNA を内包した lentivirus vector を作成し、H827 細胞に transduction した。YAP および TAZ の KO 効果については、WB 法で確認した。

4. 研究成果

1. EGFR-TKI は YAP/TAZ の核移行を促進する。

研究開始にあたり、分子標的治療中に肺癌細胞が TAM に相互作用を及ぼしているかを確認するため、Transwell を用いて Phorbol 12-myristate 13-acetate で MΦ に分化させた THP-1 細胞と HCC827 細胞の共培養実験を行った。上部 insert 内の THP-1 細胞を回収し、qRT-PCR 法で遺伝子発現を解析した所、HCC827 細胞との共培養により THP-1 細胞での profibrotic mediator の一つである Connective tissue growth factor (CTGF) の発現誘導が確認され(図 2)、確かに MΦ は癌細胞との相互作用で線維化に關与している可能性が示唆された。次に、分子標的治療薬が腫瘍細胞に与える影響について、HCC827 細胞を EGFR-TKI で刺激し、senescence に至った細胞を回収し、ウェスタンブロット法と免疫蛍光染色によって YAP/TAZ の活性化を評価した所、YAP の Ser127 のリン酸化は低下し(図 3)、YAP/TAZ は核内に濃縮に局在し(図 4)、YAP/TAZ 関連遺伝子である CTGF や CCL2 の発現が誘導されていた(図 5)。これらの結果、senescence に至り YAP/TAZ が活性化した細胞は、それ自体が profibrotic mediator である CTGF を放出するだけでなく、CCL2 などの SASP を誘導し、TAM を活性化していると考えられた。

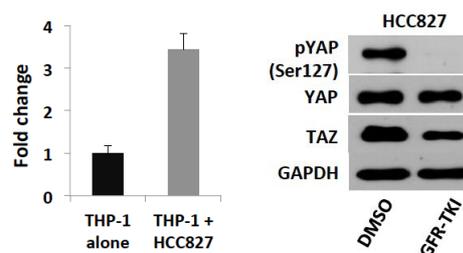


図 2 CTGF の発現誘導

図 3 YAP の脱リン酸化 HCC827

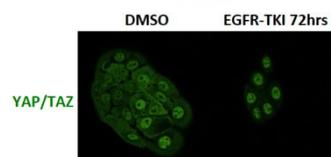


図 4 YAP/TAZ の核移行

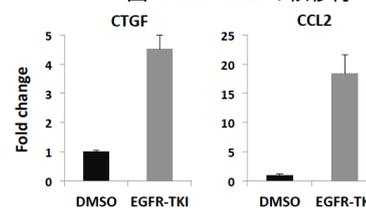


図 5 YAP/TAZ 関連遺伝子の発現誘導

2. TKI による刺激は MΦ の活性化を促す SASP の産生を促進する。

TKI 治療が TAM に影響を与えるかについて、ドライバー遺伝子変異・転座陽性細胞が TKI

による刺激により MΦ の活性化や遊走に関わる SASP の産生を促すかを Cytokine Array で検討した所、細胞が senescence に傾くため多くの cytokine の産生は抑制されたが、MΦ の分化増殖に関わる M-CSF や遊走に関わる chemokine については産生が亢進していた (図 6)。これらの SASP の産生の key regulator として YAP/TAZ が関与しているかを検証するため、CRISPR/Cas9 法を用いて、HCC827 の YAP KO, TAZ KO 細胞を樹立した (図 7)。YAP/TAZ double KO (DKO) 細胞の樹立も試みたが、限界希釈した際に、細胞がふえず、解析するに足る clone を採取する事ができなかった。現在はまずは、YAP または TAZ の single KO HCC827 細胞で osimertinib による刺激を加え、SASP の産生が抑制されるかを検討している。HCC827 YAP または TAZ KO 細胞は確実に 2 clone の細胞が樹立できているため、YAP/TAZ の機能を完全に抑制する必要がある場合は、siRNA を用いて KO できていない分子について transient に knockdown をする事で、解析を進める予定としている。

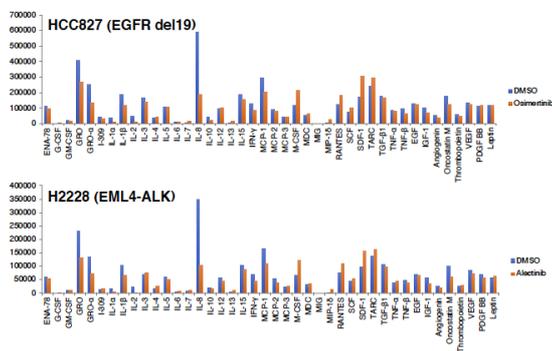


図 6 TKI による SASP の変化

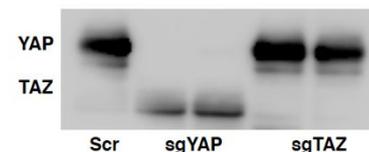


図 7 YAP/TAZ KO HCC827 細胞

3. 考察

これまでの実験結果から、ドライバー遺伝子変異・転座陽性肺癌に対して TKI で加療した際に、癌微小環境の main component である TAM に影響する SASP が放出される事が明らかとなった。現在はその Key regulator が YAP/TAZ であることを確認している状況である。YAP/TAZ の DKO 細胞の樹立が、細胞増殖が極端に悪くなってしまって困難であったり、想定外の事態も発生し、やや研究計画から遅れを生じているが、HCC827 細胞を osimertinib で刺激する際に YAP/TAZ と転写因子 TEAD との相互作用の disruptor である verteporfin を併用すると SASP の一つである CCL2 の産生が抑制される事が分かっており、YAP/TAZ が TAM による線維化誘導についての key regulator である事が強く示唆されている。

今後は NIH3T3 マウス線維芽細胞にマウス EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子を導入して transform させた細胞を nude mouse の皮下に移植し、osimertinib や alectinib による治療実験を行うことで、in vivo で実際に癌周囲の微小環境での線維化が亢進しているかを検証する予定である。近年、cyclin-dependent kinase 阻害薬 (CDKi) が YAP/TAZ の核移行を阻害すると報告されている (図 8 Cho YS et al. Genes Dev. 2020)。将来の実臨床への応用を考慮すると、小分子阻害薬によって YAP/TAZ を制御していく事が好ましく、TKI と CDKi の併用療法の効果についても in vivo で検証したい。

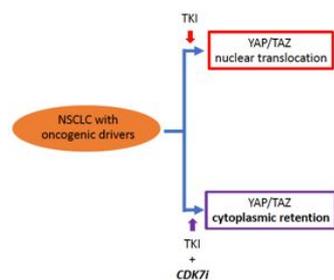


図 8 CDKi の YAP/TAZ の核移行抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tada Akio, Minami Toshiyuki, Kitai Hidemi, Higashiguchi Yoko, Tokuda Mayuko, Higashiyama Tomoki, Negi Yoshiaki, Horio Daisuke, Nakajima Yasuhiro, Otsuki Taiichiro, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Nakamura Akifumi, Kitajima Kazuhiro, Ohmuraya Masaki, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi	4. 巻 180
2. 論文標題 Combination therapy with anti-programmed cell death 1 antibody plus angiokinase inhibitor exerts synergistic antitumor effect against malignant mesothelioma via tumor microenvironment modulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 107219 ~ 107219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2023.107219	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 Nakamura Akifumi, Hashimoto Masaki, Kondo Nobuyuki, Matsumoto Seiji, Kuroda Ayumi, Minami Toshiyuki, Kitajima Kazuhiro, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi, Hasegawa Seiki	4. 巻 28
2. 論文標題 Efficacy and safety of nivolumab with ipilimumab for recurrent malignant pleural mesothelioma after primary surgical intervention	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 409 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-023-02292-3	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田陽郎、南 俊行、北井秀美、東口洋子、村上美沙、河村直樹、藤岡 毅、近藤孝憲、森下実咲、徳田麻佑子、東山友樹、柁木芳樹、堀尾大介、大搦泰一郎、三上浩司、高橋 良、栗林康造、木島貴志
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージの制御を介した悪性胸膜中皮腫に対する抗PD-1抗体と血管新生阻害薬併用療法の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多田陽郎、南 俊行、森下実咲、徳田麻佑子、村上美沙、神取恭史、河村直樹、近藤孝憲、清田穰太郎、西村 駿、長野昭近、東山友樹、柁木芳樹、堀尾大介、大搦泰一郎、三上浩司、高橋 良、北島一宏、栗林康造、木島貴志
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫に対する抗PD-1抗体と血管新生阻害薬併用療法の抗腫瘍効果について
3. 学会等名 第3回日本石綿・中皮腫学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	木島 貴志 (Kijima Takashi) (90372614)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------