

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860643

研究課題名(和文) EGFR-TKI によるEMTを介した肺癌の薬剤耐性獲得と肺線維化機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of EGFR-TKI resistance and establishment of new treatment strategy

研究代表者

田村 大介 (Tamura, Daisuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80646597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： FACSを用いてEGFR-TKI誘導性薬剤耐性クローンをCD133の高低で分類したところ、CD133 highの細胞集団はがん幹細胞の特徴を、CD133 lowの細胞集団は老化細胞の特性を持つことが明らかとなった。がん幹細胞の治療薬であるWitthaferin AはCD133 highの細胞集団を、糖代謝阻害剤はCD133 lowの細胞集団をそれぞれ効果的に治療することが出来た。

研究成果の概要(英文)： Pathway-targeted cancer drug therapies can effectively produce dramatic responses. However, these therapies are not curative and the relatively rapid emergence of drug-tolerant persisters (DTPs) substantially limits the overall therapeutic benefit. This study aimed to clarify the varying composition of DTPs in EGFR mutated non-small lung cancer cells and to develop an effective treatment. Using FACS analysis, DTPs could be separated by CD133 expression pattern. CD133 high population expressed higher stem cell related markers and had other stem cell like properties. On the other hand, CD133 low population exhibited higher expression of cellular senescence associated proteins. Witthaferin A eliminated CD133 high cells effectively. In addition, inhibitors of a highly glucose-consuming condition suppressed CD133 low population emergence.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：薬剤耐性クローン EGFR-TKI がん幹細胞 老化細胞

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦でのがん関連死の第一位の原因であり、その治療法の開発は喫緊の課題である。非小細胞肺癌の治療においては、2009年に上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)がEGFR遺伝子に変異を有する非小細胞肺癌に劇的な効果をもたらすことが示されてから、治療法に大きな進展がみられた。しかし、EGFR-TKIは著効しても、ほぼ全例でその1~2年後に肺癌組織において薬剤耐性の獲得が起こり、再発することが知られており、根治は依然として困難な状況である。EGFR-TKIが著効するにもかかわらず、最終的に再発をきたす原因として、再発例の半数で報告されているEGFRのATP binding siteにおけるT790Mという既知の遺伝子変異だけでなく、EGFR-TKI投与後に残存する薬剤耐性クローン(DTPs)の存在もその一つとして考えられる。

DTPsは再発時のがん組織の元になっており、がん幹細胞としての振る舞いを有するために根治が不可能となっていることが示唆されている(Cell.141:69-80,2010)。また、DTPsから派生した再発肺癌組織はDTPsと異なり、様々なクローンが存在するヘテロな状態で、あらゆる抗がん剤に対して耐性となっていることが知られている。遷移段階であるDTPsの出現を阻止することができれば、再発防止が可能となり、根治につながると思われる。

一方、BRAF遺伝子変異を有する悪性黒色腫を用いた研究で、BRAF阻害剤の治療導入後に耐性を獲得した癌細胞は、増殖速度が遅く、細胞老化を起こしていることが認められている(Nature.508:118-22,2014)。また、悪性黒色腫以外にも抗がん剤治療によるゲノムストレスにより細胞老化が誘導される(TIS; therapy-induced senescence)ことが報告されており(Nature.501:421-425,2013)EGFR-TKIの刺激は細胞老化の誘導にもつながることが予想される。

既に予備実験から、EGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株(PC9)にEGFR-TKIを暴露させると、経時的に幹細胞マーカー(Oct3/4, Sox2, Nanog, c-Myc, CD44)の発現が上昇することをqRT-PCRにより確認している。さらに、DTPsの状態の肺癌細胞を細胞老化の染色法の一つであるSA-β-gal染色で染めると、陽性に染まる細胞を6割程度に認め、EGFR-TKI刺激により肺癌細胞株において細胞老化も誘導されることが示唆された。以上のことから、DTPsにおいてはがん幹細胞と細胞老化を起こした細胞が共存していることが強く示唆されている。

細胞老化を起こした細胞はSASP(senescence-associated secretory phenotype)という現象を起こすことが知られており、細胞周期を停止させているだけでなく、炎症性サイトカイン、増殖因子、マ

トリックスメタロプロテアーゼなど種々の生理活性因子を分泌していることが示されている。SASP関連因子はがん幹細胞の維持に寄与しているとされており(Cell Death Dis.3:e446,2012)DTPsでは細胞老化細胞の存在ががん幹細胞の維持に関与している可能性が考えられ、細胞老化細胞やがん幹細胞の除去は新たな治療戦略につながると思われる。

細胞老化の除去に関しては、悪性リンパ腫を用いた研究において、細胞老化を起こした細胞は、糖の利用率とそれともなうATPの産生率が上昇するという代謝の変化(senescence-related metabolic reprogramming)が起きていることが明らかにされており、これらの代謝の変化を標的とした薬剤(2DG;2-deoxy-D-glucose, bafilomycin A1)により老化細胞の排除と、それによる抗癌剤の治療効果の改善がマウスの実験で示されている(Nature.501:421-425,2013)。こうした知見に基づき、DTPsにおける老化細胞を除去することで耐性株の出現、再発を抑制する新たな治療法の開発が可能になると考えられる。

DTPsがEGFR-TKI投与後の耐性株の形成、再発にどのように関わっているのか、またDTPsの細胞の相互作用を明らかにすることで、がん幹細胞の維持のメカニズムの解明とそれに続く、耐性株形成を阻止する新規の肺癌治療の確立が可能になると考えられ、本研究の立案を計画した。

2. 研究の目的

EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対して、EGFR-TKIは劇的な効果を示すことが証明されたが、依然として根治は不可能である。本研究は、(1)EGFR-TKI投与過程で生じるがん幹細胞と老化細胞からなるDTPsの形成機序の解明、(2)共存状態が、がんの耐性化、再発に及ぼす相互作用の解明、(3)DTPsを排除することによる耐性克服という新たな治療戦略の構築を目的としている。

3. 研究の方法

実験1. DTPsからのがん幹細胞の単離

EGFR遺伝子陽性肺癌細胞株PC9にEGFR-TKIとしてgefitinib(2μM)を投与し、DTPsを作成する。gefitinib誘導性DTPsを用いて、幹細胞の表面マーカーCD133(Cell.141:69-80,2010)にてフローサイトメトリーを行うことでCD133 high/lowの細胞グループを選別する。

実験2. CD133 low群における細胞老化特性の評価およびCD133 high群におけるがん幹細胞特性の評価

CD133 low群には細胞老化を起こした細胞が多く含まれることが予想される。そのため、CD133 high群、low群細胞のタンパクを抽出し、細胞老化現象に関わるとされるpRb、γH2AX、p27、p21の発現をウェスタンブロッ

トにて解析を行う。これらのタンパクの挙動、発現パターンの差により CD133 low 群に細胞老化を起こした細胞が含まれるかを検討する。また、CD133 high グループに幹細胞が多く含まれていることが期待される。そこで、がん幹細胞のマーカーの発現を qRT-PCR により評価する他、CD133 high 群をヌードマウスに移植し、経時的に腫瘍径を評価する。CD133 high 群にがん幹細胞が多く含まれているとすれば、同細胞群より腫瘍形成が生じるものと思われる。

実験 3. CD133 low 群における糖代謝機能の解析

CD133 low 群の細胞で Warburg 効果として知られる解糖系亢進状態が更に増強される senescence-related metabolic reprogramming という現象が起きているかを検討するために、2-deoxy-D-glucose (2-DG)、phloretin など糖代謝を抑制し、生存率の差を評価する。また、糖代謝関連酵素 (AMPK) のリン酸化を、ウェスタンブロットを用いて評価し、さらに、糖トランスポーター (Glut1、Glut3)、糖代謝酵素 (Hk2) の発現を qRT-PCR により評価する。これらの実験により CD133 low 細胞群が senescence-related metabolic reprogramming に依存しているかどうかを評価できる。

実験 4. CD133 low 群、CD133 high 群の排除による腫瘍再発抑制の解析

CD133 low 群の細胞を、その代謝機能を抑制すること (phloretin 10 mg/kg 週 3 回投与) で排除し、CD133 high 群の細胞をがん幹細胞の治療薬である withaferin A (Witha) 2 mg/kg 週 3 回投与により排除することで腫瘍の再発が抑制できるかを、担がんマウスモデルを作成し、gefitinib 6.25 mg/kg 連日経口投与下に再発してきたところで上記治療を行い、評価を行う。

4. 研究成果

1. DTPs の CD133 発現パターンによる分類

CD133 (prominin-1) は膜貫通型糖鎖タンパクで、血液悪性腫瘍、髄膜腫、肺がんなどのがん幹細胞で発現が上昇していることが報告されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 106:16281-6, 2009)。EGFR-TKI 誘導性 DTPs を CD133 発現の高低にて分離したところ (図 1A) gefitinib (2 μM) にて 12 日間刺激した後では、有意に CD133 高発現細胞の割合が増加していることが明らかとなった (図 1B)。

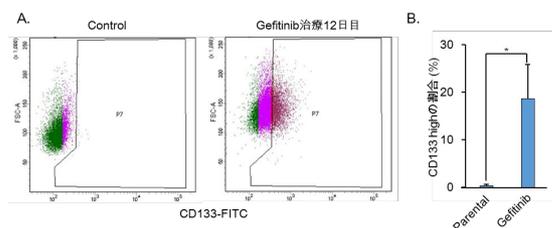


図 1. DTPs の CD133 の高低による分類

2. CD133 の高低で分けた 2 つの細胞群の特徴

細胞老化に関連したタンパク (pRb, γH2AX、p27、p21) の発現をウェスタンブロット法にて評価したところ、CD133 low 群の細胞で CD133 high 群の細胞と比較して発現の亢進がみられた (図 2A)。 (C) がん幹細胞に関連したタンパク、マーカーの発現を qRT-PCR にて評価したところ、CD133 high 群の細胞で CD133 low 群の細胞と比較して発現の亢進がみられた (図 2B)。また、CD133 high 群の細胞をヌードマウスに皮下移植したところ、腫瘍形成能が確認された (図 2C)。

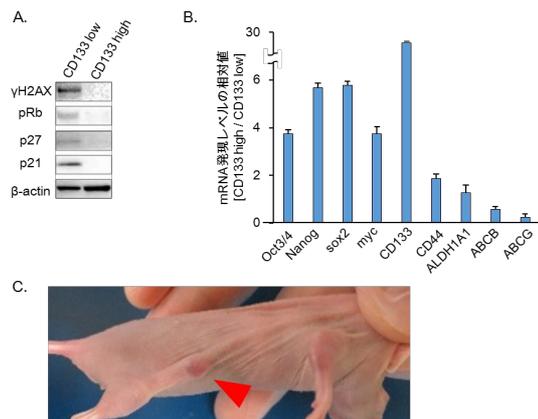


図 2. CD133 の発現による細胞特性の違い

以上より、CD133 low 群は老化細胞の、CD133 high 群はがん幹細胞の特性を示すことが明らかとなった。

3. CD133 low 群における代謝機能の評価

DTPs に対する、従来の抗がん剤 cisplatin (CDDP)、pemetrexed (PEM)、docetaxel (DOC) と、がん幹細胞を標的とする新規治療薬である Witha、糖代謝阻害剤 (2-DG、phloretin) の治療効果を確認するために、gefitinib 2 μM で曝露し DTPs を誘導した PC9 細胞の生存率で評価を行った。その結果、gefitinib を含めて従来の抗がん剤は、DTPs に対して効果が弱いけれども、Witha や糖代謝阻害剤では DTPs に対する強い抗腫瘍効果がみられた (図 3A)。そこで、gefitinib 誘導性の DTPs における糖代謝について解析を行った。その結果、CD133 high の群に比較して、CD133 low の群で、糖代謝関連酵素 (AMPK) のリン酸化や (図 3B)、糖トランスポーター (Glut1、Glut3)、糖代謝酵素 (Hk2) の発現が亢進していることが明らかとなった (図 3C)。

以上の結果により、CD133 high の細胞集団に比較して、CD133 low の細胞集団は糖代謝に依存した老化細胞をより多く含んでおり、糖代謝を標的とした糖代謝阻害剤 (2-DG、phloretin) や、がん幹細胞を標的とした Witha は DTPs に対する有望な治療戦略になると考えられた。

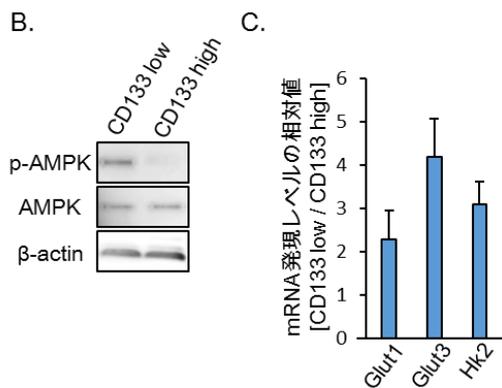
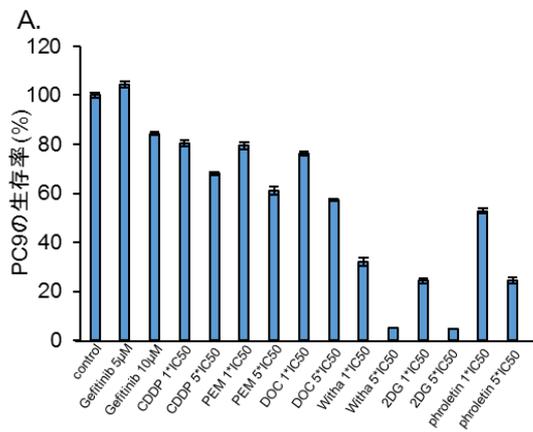


図3. DTPs に対するがん幹細胞治療薬と糖代謝阻害剤の治療効果と、CD133 low 群の糖代謝機能の解析

4. 動物モデルでの腫瘍増殖抑制試験

3の結果を生体内で確認する為、PC9を皮下移植した担がんマウスモデルに gefitinib を投与し、腫瘍が再増殖をしてきた段階で、がん幹細胞を標的とした治療薬 Witha や糖代謝阻害剤 (phloretin) あるいは Witha と phloretin の両者を gefitinib に追加して、治療効果を解析した。その結果、gefitinib 単剤と比較して、これらの薬剤の追加で高い抗腫瘍効果を認めた (図4)。

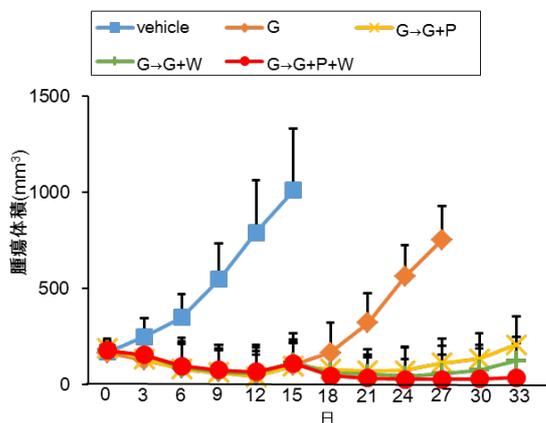


図4. DTPs の担がんマウスモデルに対する治療実験

以上の結果をまとめると、今回 EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞株における EGFR-TKI 誘導性の DTPs の状態は、CD133 low の老化細胞の特徴を示す細胞集団と CD133 high のがん幹細胞の特徴を示す細胞集団から構成されることが明らかとなった。また、がん幹細胞を標的とした治療薬 Witha や糖代謝阻害剤 (phloretin) は DTPs に対する有望な治療法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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1. Kunimasa K, Nagano T, Shimono Y, Tokunaga S, Tamura D, Tachihara M, Kobayashi K, Nishimura Y. The glucose metabolic targeting therapies and withaferin A eliminate epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor-induced drug-tolerant persisters in non-small lung cancer cells. AACR Annual Meeting 2015. April 18-22, 2015. Pennsylvania Convention Center. Philadelphia, Pennsylvania, USA

2. 津村成美、永野達也、下野洋平、國政啓、徳永俊太郎、田村大介、立原素子、小林和幸、西村善博、EGFR-TKI 耐性クローンに対する糖代謝阻害剤、癌幹細胞治療薬の有効性について、第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015 年 11 月 28 日、横浜、パシフィコ横浜

3. 國政啓、永野達也、徳永俊太郎、田村大介、立原素子、小林和幸、西村善博、EGFR-TKI 耐性クローンに対する糖代謝阻害剤、癌幹細胞治療薬の有効性について、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 9 日、京都、国立京都国際会館

[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：
出願年月日：
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

田村 大介 (TAMURA DAISUKE)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：80646597

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：