

令和元年6月11日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05311

研究課題名(和文) 分子標的薬に対して高感受性を示すがん微小環境の研究

研究課題名(英文) CD200-positive cancer associated fibroblasts augment the sensitivity of Epidermal Growth Factor Receptor mutation-positive lung adenocarcinomas to EGFR Tyrosine kinase inhibitors

研究代表者

石井 源一郎 (Genichiro, Ishii)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・分野長

研究者番号：00270869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞(がん関連線維芽細胞、CAFs: Cancer Associated Fibroblasts)は、がん細胞と共存することにより特異ながん微小環境を形成している。CAFsは、がん細胞との相互作用を介して、がん細胞の薬剤感受性に影響を与える。我々は、EGFR変異陽性肺腺癌のEGFR-TKI感受性を修飾するCAFsについて検討してきた。そしてEGFR-TKI感受性を増強するCD200陽性CAFsを、共培養を用いた試験管モデル、ヒト肺腺癌切除検体を用いて同定した。さらに、CAFsに発現しているCD200分子は、がん細胞のEGFR-TKI感受性を増強する責任分子であることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床面では、本分子機構を応用することにより、EGFR-TKIに対する初回治療感受性を劇的に増強することが可能となる。すなわち、今まで以上に、EGFR-TKIに対するスーパーレスポンドー(極めて著効する症例)を増やすことが出来る可能性がある。尚、本申請に関する研究は申請者独自の発見であり、企業アカデミア連携で最終製品の権利化が可能である。その分子機構が解明されれば、学問的、臨床的価値は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Here we report the existence of a special subpopulation of patient-specific-CAFs that augment the sensitivity of EGFR gene mutation-positive lung cancer to the EGFR-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), gefitinib. When cocultured with EGFR mutation positive lung cancer cells, these CAFs increased the apoptotic effect of gefitinib on cancer cells, whereas, in the absence of gefitinib, they did not affect cancer cell viability. Microarray analysis revealed that CD200 was expressed at much higher levels in this CAFs. Knocking down of CD200 expression deprived CAFs of their sensitizing potential. Immunohistochemical analysis revealed that the individuals whose resected lung adenocarcinomas contained CD200-positive CAFs tended to have longer progression free survival of gefitinib when they recurred after surgery. These results suggest that CD200-positive CAFs can augment the sensitivity to EGFR-TKIs and may possess far reaching applications in the therapeutic use of EGFR-TKIs.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：がん関連線維芽細胞 肺腺癌 EGFR-TKI 薬剤感受性 がん微小環境

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

1. 研究開始当初の背景

分子生物学研究の発展によって、がん細胞の生存・増殖に関わる様々なシグナル分子が明らかになり、それら分子を特異的に阻害する創薬設計が技術的にも可能となってきた。現在のがん薬物療法の主役を担っているのは、分子標的薬と呼ばれるこうしたタイプの抗がん剤である。EGFR 変異を有する肺腺癌は、日本人の非喫煙者に発生する肺癌の半数以上を占める。EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬(以下 EGFR-TKI)は、EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌の治療に使われており、臨床的にも一定の効果が確認されている。しかしながら、EGFR 遺伝子変異を有していても約 20%の症例では初回治療に対して抵抗性を示すことが知られており、臨床的に大きな問題となっている。従って、初期耐性の機構を解明し初期耐性を減少させることは、今後の EGFR-TKI を含めた分子標的療法の更なる進歩に必要な研究課題の一つである。

初期耐性の原因として、1) がん細胞自身あるいは非がん細胞である線維芽細胞に hepatocyte growth factor (HGF) が高発現しており、初期耐性を誘導する、2) がん細胞における BIM 分子発現の低下が EGFR-TKI によるアポトーシス抵抗性を誘導する、などが報告されている。しかし上記因子に当てはまらない症例も多数存在する。がん細胞周囲の線維芽細胞は cancer associated fibroblasts; CAFs と呼ばれており、特異な生物像を獲得した細胞集団である。CAFs は、がん細胞との相互作用を介して、薬剤感受性にも重大な影響を与えていることが報告されてきた。実際 EGFR-TKI 抵抗性亢進に関与する CAFs についての存在は確認されてきたが、感受性亢進に関わる CAFs の存在は知られていなかった。

2. 研究の目的

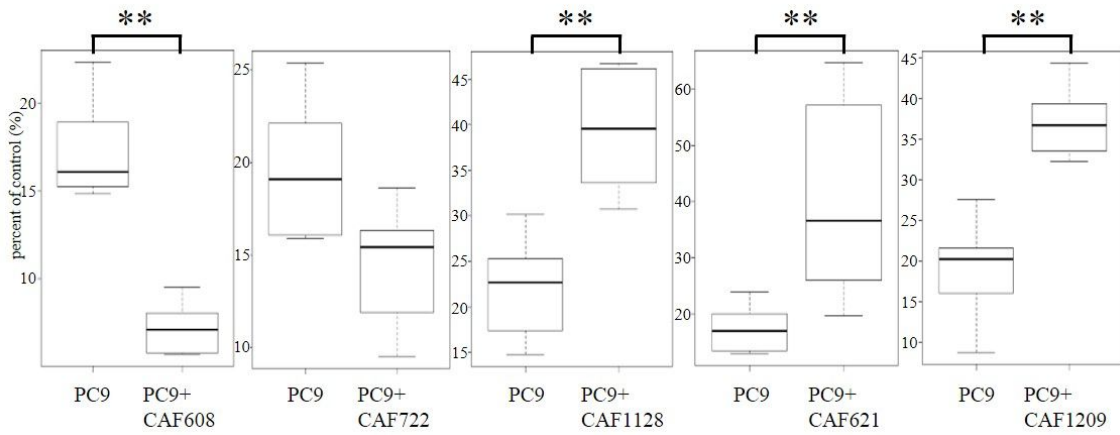
本研究では、1) EGFR-TKI 感受性を増強する CAFs の存在を確認し、生体内のどこにあるいはどのような病態で動員されるのかを検討する、2) これらの CAFs が、肺腺癌細胞の EGFR-TKI 感受性を増強する分子機構を探索・解明する。

3. 研究の方法

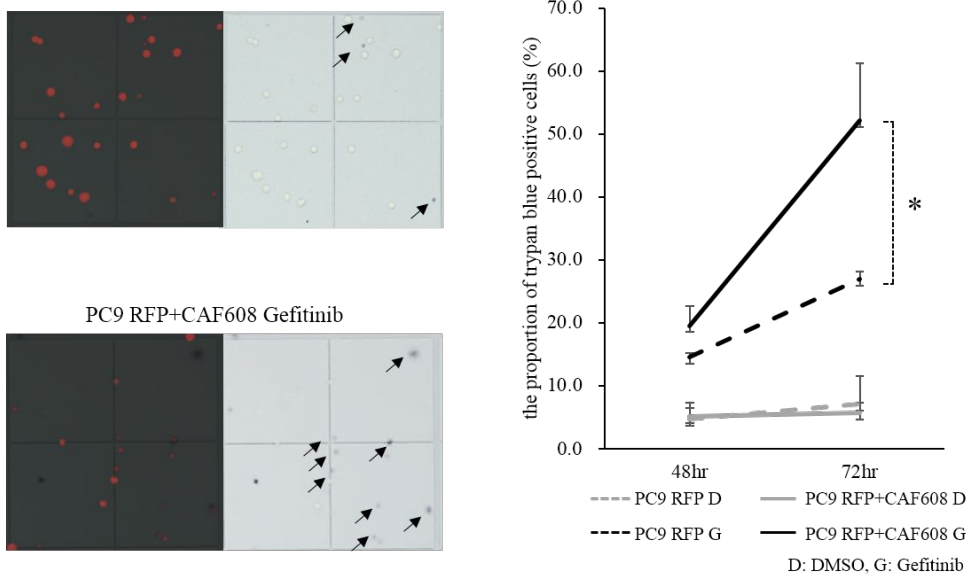
- 感受性亢進に関わる線維芽細胞亜集団の分離を試みるために、我々はヒト肺腺癌組織より分離採取した CAFs および CAFs のクローンを多数作製した。そして、これら多数の CAFs あるいは CAFs クローンをを用いて肺腺がん細胞株 (EGFR 変異陽性、PC-9) と共培養し、PC-9 細胞の EGFR-TKI 感受性をスクリーニングする。
- EGFR-TKI 感受性を増強する CAFs クローンに高発現している mRNA の同定を試みる。
- 候補となる mRNA を絞り、これら遺伝子をノックダウンした CAFs と PC-9 細胞を共培養することで、EGFR-TKI 感受性がキャンセルされるかを検討する。
- 候補分子の受容体を同定し、下流のシグナルを検討することで、EGFR-TKI 感受性を増強する分子機構の解明を検討する。
- EGFR-TKI 感受性を増強する CAFs の臨床病理学的検討を行う。

4. 研究成果

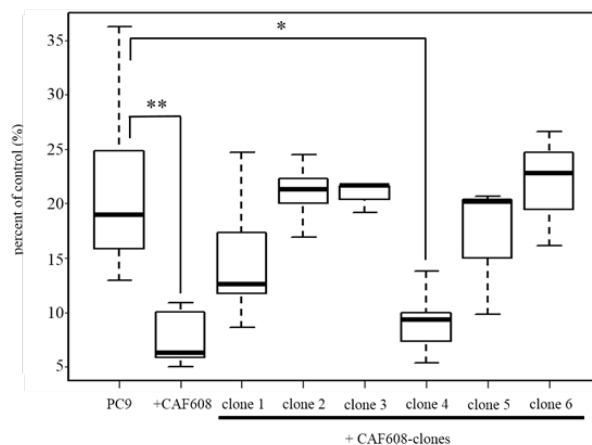
- 5 種類の CAFs のなかで、CAFs608 は、有意に PC-9 細胞の EGFR-TKI 感受性を増強した。(次ページ図参照) またこの現象は、EGFR 遺伝子変異を有する他の細胞株 HCC827 を用いても同様の結果に認められた。



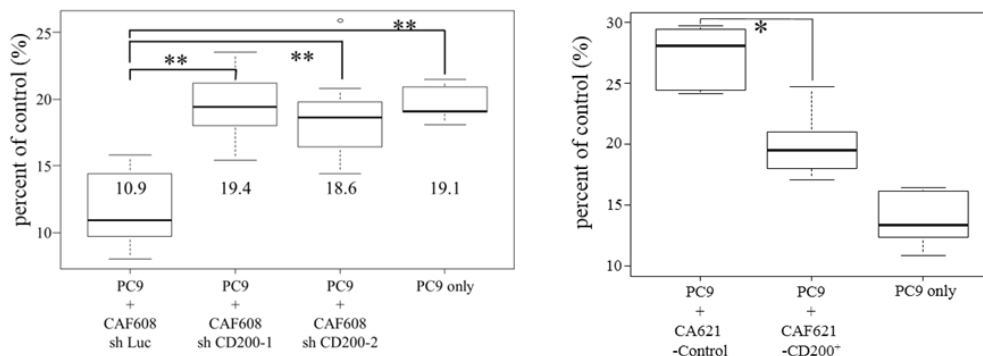
- CAFs608 と共培養した PC-9 細胞の死細胞率を検討した。コントロールと比べて、PC-9 細胞では有意に死細胞率が増加していた。一方で、PC-9 細胞の細胞周期に関しては、有意な差を認めなかった(PC-9 Fucci 細胞を用いて検討した結果)。



- CAFs608 のクローン 6 種類を用いて、同様の検討を行った。Clone4 は、コントロールと比較して、有意に PC-9 細胞の EGFR-TKI 感受性を増強した。以上の結果から、CAFs608 には、EGFR-TKI 感受性を増強する subpopulation が含まれていることが明らかになった。



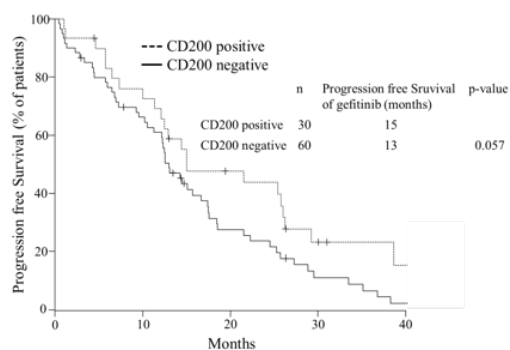
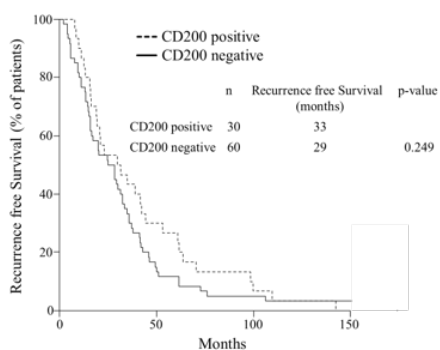
- CAFs608 および CAFs608 クローン 4 に高発現している mRNA を cDNA microarray にて同定した。細胞内シグナル伝達に関連する膜タンパクとして CD200, MDGA1, GRIN2A, ADGRL2, NRCAM が候補遺伝子として挙げられた。RT-PCR を用いた validation study の結果、CD200 を候補分子として考えた。
- CD200 をノックダウンした CAFs608 と PC-9 細胞を共培養し、EGFR-TKI 感受性を検討した。その結果、感受性の亢進はキャンセルされた。一方、CD200 を過剰発現した CAFs を用いて同様の検討を行った結果、感受性抵抗性が增強した。以上より、CAFs608 に発現している CD200 分子は、PC-9 細胞と相互作用することにより、EGFR-TKI 感受性を增強することが判明した。



- CD200のレセプターとしてCD200Rが知られている。定常状態では、PC-9細胞にはCD200R mRNAの発現は認められなかった(RT-PCRおよびFACSによる検討結果)。そこでEGFR-TKI 投与中に、CD200R分子の発現誘導が起こるかどうかを検討したが、CD200R発現の誘導を認めなかった。以上より、PC-9細胞には、CD200R以外のCD200に対する受容体が発現している可能性が示唆された。

また、培養細胞株を用いた検討では、CD200 発現 CAFs は、肺腺癌由来 CAFs18 検体中 5 検体に認められた

- 術後再発し、EGFR-TKI が投与された EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌症例を用いて臨床病理学的解析を行った。CD200 抗体を用いて免疫染色を行い、CD200 陽性の CAFs を同定することに成功した。CD200 陽性 CAFs は、CAFs の一般的な活性化マーカーである SMA も発現していた。CD200 陽性 CAFs が存在する症例は、90 症例中 30 症例存在した。CD200 陽性 CAFs 症例は、非存在症例と比較して、術後からの再発期間には有意差を認めなかった ($p=0.249$)。しかしながら、CD200 陽性 CAFs 症例では、EGFR-TKI 投与後の PFS が延長している傾向を認めた ($p=0.057$)。以上の結果は、我々が in vitro で得た結果、すなわち CD200 陽性 CAFs が、EGFR-TKI 感受性を增強する、をサポートするものと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

CD200-positive cancer associated fibroblasts augment the sensitivity of Epidermal Growth Factor Receptor mutation-positive lung adenocarcinomas to EGFR Tyrosine kinase inhibitors.

Ishibashi M, Neri S, Hashimoto H, Miyashita T, Yoshida T, Nakamura Y, Udagawa H, Kirita K, Matsumoto S, Umemura S, Yoh K, Niho S, Tsuboi M, Masutomi K, Goto K, Ochiai A, Ishii G.
 Sci Rep. 2017 Apr 21;7:46662. doi: 10.1038/srep46662.

〔学会発表〕(計2件)

1) 石橋昌幸, 石井 源一郎

CD200 陽性癌関連線維芽細胞は、上皮成長因子受容体遺伝子変異陽性肺腺癌におけるゲフィチニブへの感受性を増強する

日本呼吸器学会 2017年

2) 石井 源一郎

CD200-positive cancer associated fibroblasts augment the sensitivity to EGFR Tyrosine kinase inhibitors

日本癌学会 2017年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石橋昌幸

ローマ字氏名：Ishibashi Masayuki

所属研究機関名：国立がん研究センター

部局名：呼吸器内科

職名：レジデント

研究者番号(8桁)：80763630

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：菅野雅人

ローマ字氏名：Sugano Masato

所属研究機関名：国立がん研究センター

部局名：病理/臨床検査科

職名：医長

研究者番号(8桁)：40643606

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。