

令和元年5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09592

研究課題名(和文) ドライバー遺伝子異常肺癌の薬剤耐性機序における長鎖ノンコーディング RNAの意義

研究課題名(英文) Long non coding RNA associated with drug resistance in lung cancer with driver mutation

研究代表者

清家 正博 (SEIKE, MASAHIRO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30366687

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)：肺癌のEGFR阻害薬やALK阻害薬等の分子標的薬耐性と耐性の根幹となる癌幹細胞・上皮間葉移行に関わる長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)の意義を明らかにし、分子標的薬耐性克服法確立および根治を目指した臨床応用を目的とする。肺癌の分子標的薬感受性細胞株4株と耐性株10株を用いた網羅的lncRNA発現解析とバイオインフォマティクス解析にて、分子標的薬耐性に共通に関連するlncRNAとしてCRNDEを同定し、関連タンパク質がIRX5であり、耐性細胞におけるIRX5抑制によりアポトーシスが誘導されることを明らかにした。CRNDEとIRX5は分子標的薬耐性克服に向けた新規治療標的となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌のEGFR阻害薬やALK阻害薬等の分子標的薬耐性と耐性の根幹となる癌幹細胞・上皮間葉移行の克服は、肺癌薬物療法における大きな課題である。近年長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)に関する発癌への関与が注目され、その全貌の解明が期待されている。今回の研究で、分子標的薬耐性に共通に関連するlncRNAとしてCRNDEを同定し、関連タンパク質がIRX5であり、CRNDEとIRX5は分子標的薬耐性克服に向けた新規治療標的となり得ることを明らかにしたことは社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify a long non coding RNA (lncRNA) associated with drug resistance to molecular targeted therapy in lung cancer with driver mutation. We analyzed lnc RNA expression profiles of 4 drug sensitive lung cancer cells and 10 drug resistant lung cancer cells showing cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition using microarray and bioinformatic analysis. We identified CRNDE and IRX5 as lnc RNA and its targeted protein associated with drug resistance to molecular targeted therapy in lung cancer with driver mutation. Inhibition of IRX5 using siRNA showed apoptotic activity in drug resistant lung cancer cells. CRNDE and IRX5 may be promising targets to overcome the drug resistance to molecular targeted therapy in lung cancer with driver mutation.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 低分子RNA 薬剤耐性 分子標的薬 ドライバー遺伝子

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

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) Long non coding RNA (lncRNA) 研究

ヒトゲノムにおいてタンパク質を規定する領域は全体の約 2 %であるが、RNA へは 70 %以上が転写されており、タンパク質をコードしない RNA (non coding RNA: ncRNA) に機能があり、転写・エピゲノム制御を介してがんの発生などに関与していることが示唆されている。ncRNA のうち、小型 (18-25 塩基) の microRNA (miRNA) については特定の癌遺伝子/癌抑制遺伝子発現を制御することが明らかになっており、研究代表者らは、miRNA に関する最先端の国内外の研究に早期から携わり、肺癌の新規診断/予後/薬剤耐性マーカーとしての miRNA を同定し、非小細胞肺癌の分子標的薬 EGFR 阻害薬の薬剤耐性に重要な miRNA として、miR-21, miR-200 family が重要であると結論づけた (Yanaihara N, Seike M, et al. *Cancer Cell*.2006) (Seike M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009) (Shimokawa T, Seike M, et al. *Br. J. Cancer*, 2012) (Nishijima N, Seike M, et al. *Int J Oncol*. 2016)。一方、ncRNA の中でも大型 (100-1000 塩基) の長鎖ノンコーディング RNA (long non coding RNA : lncRNA) の機能に関しては未知の部分が多かったが、近年 lncRNA が特定の遺伝子発現を促進する機能が発見され、その全貌の解明が期待されている。

### (2) EGFR 阻害薬/ALK 阻害薬の耐性メカニズム

EGFR 遺伝子変異や ALK 転座などのドライバー遺伝子異常依存肺癌に対して、分子標的薬の劇的な効果が証明されているが、薬剤耐性が臨床上的課題である。耐性の半数を占めるゲートキーパー変異 (T790M, C1156Y 等) に対する第 3 世代阻害薬の有効性が証明されているが、更なる耐性が生じ、再発/薬剤耐性等に関与する腫瘍の源として、癌幹細胞 (Cancer Stem Cell : CSC) の概念が注目されている。CSC は上皮間葉形質転換 (EMT)とも密接に関連しており、CSC/EMT 制御が耐性克服および根治に向けた最終標的とも考えられ、研究代表者らはこれまでにいくつかの知見を明らかにしている。(Kitamura K, Seike M, et al. *Mol. Cancer Ther*, 2014) (Sugano T, Seike M, et al. *Mol. Cancer Ther*, 2015)

以上の研究成果から、肺癌の EGFR 阻害薬、ALK 阻害薬、MET 阻害薬等の分子標的薬耐性、その中でも CSC/EMT に関わる lncRNA を明らかにし、これまでの miRNA 研究結果を含めた ncRNA の観点から薬剤耐性メカニズム解明とその克服を試み、臨床応用することを計画した。

## 2. 研究の目的

肺癌の EGFR 阻害薬や ALK 阻害薬などの分子標的薬耐性と CSC/EMT に関わる lncRNA の意義を明らかにし、分子標的薬耐性克服法の確立および根治を目指した臨床応用を目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) EGFR 阻害薬/ALK 阻害薬/MET 阻害薬の耐性株の樹立と CSC/EMT 表現型の検証
- (2) CSC/EMT 表現型耐性細胞株における lncRNA 発現プロファイル
- (3) 候補 lncRNA の同定と機能解析および標的遺伝子/相互作用/miRNA の同定
- (4) 肺癌臨床検体を用いた lncRNA 発現検証と新規治療法の開発

## 4. 研究成果

### (1) EGFR 阻害薬/ALK 阻害薬/MET 阻害薬耐性株の樹立と CSC/EMT 表現型の検証

MET 耐性株 (EBC1-R)に加えて、EGFR 阻害薬耐性株 (PC9-AR, PC-9-OR, HCC827-AR, HCC-827-OR)、ALK 阻害薬耐性株 (H2228-CRR, HCC827-AR, HCC-827-CER) を樹立し(図 1A)、それぞれ CSC/EMT 表現型を獲得していることをウエスタンブロット、スフェアアッセイなどにて確認した (図 1B) (Nakamichi S et al. *Oncotarget*, 2018) (Takahashi A et al. *Sci Rep*, 2018)

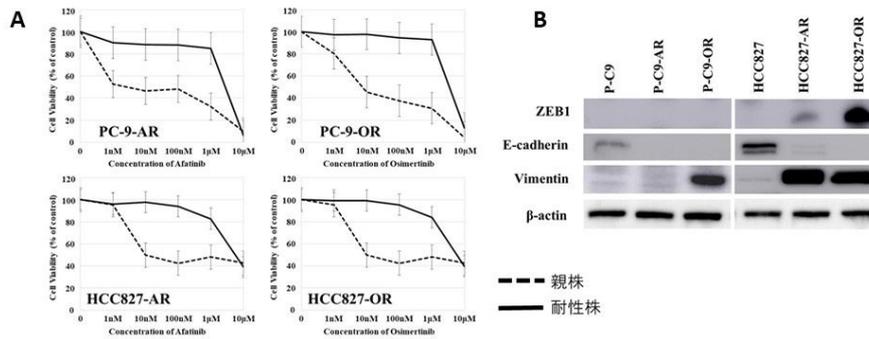


図1 分子標的薬耐性株樹立と CSC/EMT 表現型の検証

(2) CSC/EMT 表現型耐性細胞株における lncRNA 発現プロファイル

分子標的薬感受性肺細胞株 4 株 (PC-9, HCC-827, H2228, EBC-1) と耐性株 10 株 (PC9-AR, PC-9-OR, HCC827-AR, HCC-827-OR, H2228-CRR, HCC827-AR, HCC-827-CER, EBC-1R, H1975, H1650) を用いて、Agilent Expression Array による網羅的 lncRNA 発現解析を施行した (図 2A)。分子標的薬耐性に共通に関与する lncRNA として CRNDE と DGCR5 を同定し (図 2B)、定量的 RT-PCR にて耐性株で発現が上昇していることを確認した (図 2C)。

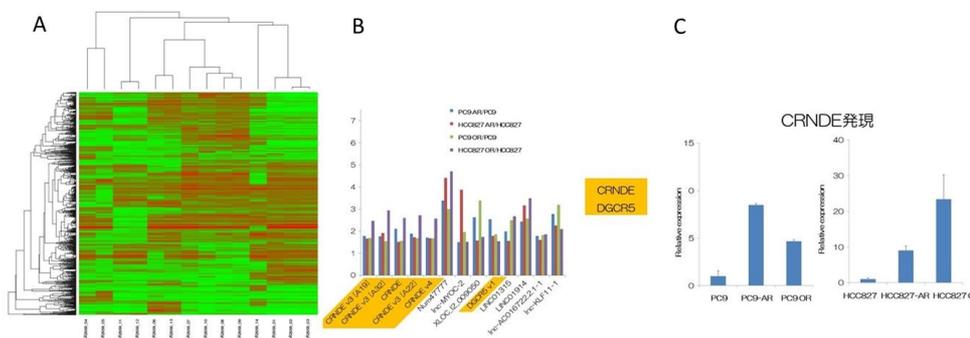


図2 網羅的 lncRNA 発現解析と CRNDE 発現上昇

(3) 候補 lncRNA の同定と機能解析および標的遺伝子の同定

バイオインフォマティクス解析にて、CRNDE パートナー蛋白質として IRX5 をスクリーニングした。IRX5 は、分子標的薬感受性細胞に比べて耐性細胞において、mRNA および蛋白レベルで有意に発現が上昇していることを確認した (図 3A)。HCC827-OR を用いて、CRNDE を siRNA により抑制したところ、IRX5 の発現低下を認めた (図 3B)。また、HCC827-AR、HCC827-OR を用いて IRX5 を siRNA により抑制したところ、cPARP の発現上昇あり、アポトーシスが誘導されることを明らかにした (図 3C)。

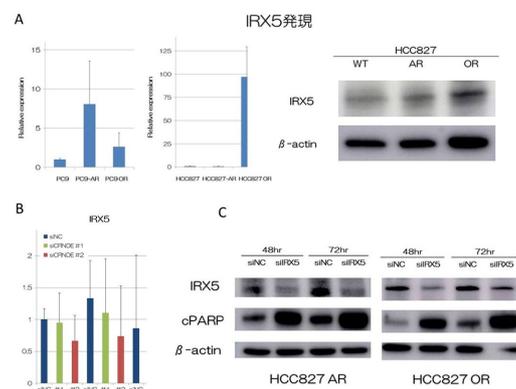


図3 IRX5 発現上昇と IRX5 抑制によるアポトーシス誘導

以上より、肺癌の分子標的薬（EGFR 阻害薬/ALK 阻害薬/MET 阻害薬）耐性に共通に関与する lncRNA として CRNDE を同定し、関連タンパク質が IRX5 であり、耐性克服に向けた新規治療標的となることを明らかにした。今後、EGFR 阻害薬耐性株や ALK 阻害薬耐性株を用いて、薬剤耐性解除法開発など更なる研究を継続し、新規治療法開発に繋げていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ・ Takahashi A, Seike M, Chiba M, Takahashi S, Nakamichi S, Matsumoto M, Takeuchi S, Minegishi Y, Noro R, Kunugi S, Kubota K, Gemma A. Ankyrin Repeat Domain 1. Overexpression is Associated with Common Resistance to Afatinib and Osimertinib in EGFR-mutant Lung Cancer. Sci Rep. 2018, 5;8(1):14896. doi: 10.1038/s41598-018-33190-8.
- ・ Nakamichi S, Seike M, Miyanaga A, Chiba M, Zou F, Takahashi A, Ishikawa A, Kunugi S, Noro R, Kubota K, Gemma A. Overcoming drug-tolerant cancer cell subpopulations showing AXL activation and epithelial-mesenchymal transition is critical in conquering ALK-positive lung cancer. Oncotarget. 2018,5;9(43):27242-27255. doi: 10.18632/oncotarget.25531.

### 〔学会発表〕(計 3 件)

Nakamichi S, Seike M, Miyanaga A, Takahashi A, Noro R, Kubota K, Gemma A. Overcoming drug-tolerant cancer cell subpopulations showing AXL activation and epithelial-mesenchymal transition is critical in conquering ALK-positive lung cancer. 2019 AACR Annual Meeting. April 2019, Atlanta

吉川明子、清家正博、高橋聡、中道真仁、菅野哲平、武内進、峯岸裕司、野呂林太郎、久保田馨、弦間昭彦、EGFR 遺伝子変異を有する肺癌においてアファチニブ・オシメルチニブの薬剤耐性と ANKRD1 過剰発現の関係、第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2018 年 7 月、神戸

中道真仁、清家正博、宮永晃彦、高橋明子、野呂林太郎、久保田馨、弦間昭彦、AXL と EMT 克服を標的とした ALK 陽性非小細胞肺癌根絶に向けた新規治療戦略、第 58 回日本肺癌学会学術集会、2017 年 9 月、東京

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：野呂 林太郎

ローマ字氏名：(NORO Rintaro)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：50366735

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：浜田 道昭

ローマ字氏名：HAMADA Michiaki