

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19073

研究課題名(和文) 肺腺癌における新規化学療法耐性関連因子の同定

研究課題名(英文) Elucidation of factors associating with chemoresistance in EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma

研究代表者

齊藤 涼子 (Saito, Ryoko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30733349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はEGFR-TKI (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor) 耐性肺癌における化学療法耐性誘導因子を明らかにすることを目的として行われた。我々は、EGFR-TKI耐性肺腺癌培養細胞を用いた網羅的遺伝子解析の結果を元に実験を進め、EGFR-TKI耐性肺腺癌細胞にはp22phoxが高発現しているものが存在しこれらの細胞ではHIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) が上皮間葉転換を介し化学療法およびEGFR-TKI耐性を来たすことを示した。本経路に着目した新たな治療法が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chemotherapy is broadly used for the patients with EGFR-TKI (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors) resistant lung adenocarcinoma. This study aimed to elucidate the mechanism associating with chemoresistance and EGFR-TKI resistance. According to the microarray using EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma cell line, we postulated that p22phox/HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) pathway might be result in chemoresistance and EGFR-TKI resistance via induction of EMT (epithelial-mesenchymal transition). Our study showed that p22phox and HIF-1 expressions were elevated in some EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma cell line, and that in these cell line p22phox induced HIF-1 gene expression following to induction of EMT and chemoresistance. Our results may provide the first evidence that targeting p22phox/HIF-1 could be a new therapeutic strategy to enhance the chemosensitivity in EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：lung adenocarcinoma EGFR-TKI resistance chemoresistance HIF-1 p22phox

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は依然予後不良であり、私は肺病棟を専門とした日常業務の中で、さらなる治療発展の必要性を痛感してきた。私は、当教室で樹立された分子標的治療薬 (EGFR-TKI) 耐性肺腺癌培養細胞株のマイクロアレイ解析の結果から、化学療法感受性に関わる複数の因子が耐性獲得前後で変化していることを見出した。肺腺癌の化学療法感受性に着目した網羅的研究は未だ無く、私はこの点について以下の手法で検討を行う。化学療法抵抗性の肺腺癌培養細胞株を樹立しアレイ解析を含めた網羅的検討を行う。当教室樹立の EGFR-TKI 耐性肺腺癌培養細胞株を用いた機能解析を行う。ヒト組織を用いた発現意義の検討を行う。本研究により、肺腺癌における化学療法感受性に関与する新規因子を網羅的検討により同定し、化学療法効果増大に着目した治療の発展を目指す。

## 2. 研究の目的

肺癌は本邦において男女共に死亡率1, 2位を占める予後不良の疾患である。最も多い組織型である腺癌に対しては EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) を標的とする分子標的治療薬が広く用いられているが、その耐性獲得が大きな課題となっている。よって、分子標的治療薬耐性獲得後に施行される化学療法の治療成績向上が肺癌患者の予後改善に必要である。過去の報告では、種々の悪性腫瘍において化学療法耐性関連因子として低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ ) を含む様々な因子が報告されてきた。しかし、EGFR-TKI (EGFR tyrosine kinase inhibitor) 耐性獲得後における化学療法耐性関連因子についての網羅的な検

討は報告されていない。そこで我々は、EGF-TKI 耐性獲得肺腺癌における化学療法耐性関連因子を明らかにし、新たな治療標的を見出すことを目的として本研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 試薬および抗体 : Gefitinib, Erlotinib, Cisplatin, Pemetrexed, Deferoxiamine, TGF- $\beta$ 1, 抗  $\beta$ -actin 抗体, 抗 HIF-1 $\alpha$  抗体, 抗 E-Cadherin 抗体, 抗 Vimentin 抗体を使用した。

(2) 細胞培養 : ヒト肺腺癌由来培養細胞として PC9 を用いた。さらに、当教室で樹立した PC9/6m (コントロール株), PC9/GR (Gefitinib 耐性株), PC9/ER (Erlotinib 耐性株) を用いた。細胞培養は 10% fetal bovine serum を含む RPMI-1640 培地を用いて、37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$  条件下で行った。

(3) 細胞増殖試験 : WST-8 アッセイにより生細胞数の測定を行った。

(4) 定量 RT-PCR : 培養細胞より RNA を抽出し、cDNA へ変換した後、Light Cycler 96 を用い RT-PCR を施行した。

(5) ウェスタンブロッティング : 培養細胞からタンパクを抽出し、解析には Image Lab version 5.0 を用いた。

(6) siRNA : siRNA を用いて HIF1 $\alpha$ 、p22phox のノックダウンを行った。

(7) DNA トランスフェクション : PC9 に HIF1 $\alpha$  遺伝子導入を行った。

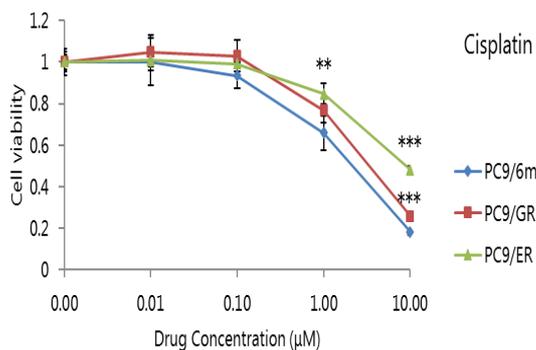
(8) 免疫組織化学 : 東北大学病院で外科的に切除された肺腺癌患者 87 例を対象とし、免疫組織化学的に HIF1 $\alpha$  のタンパク発現を検討した。タンパク発現の評価には modified Histological score (H-score) を用いた。続いて H-score と臨床病理学的事項との相関を検討した。なお、本研

究は東北大学医学部・医学系研究科の倫理委員会の承認を得ている(2013-1-581)。(9) 統計解析：JMP 12.2.0 (SAS Institute, 東京, 日本)を使用し、p 値が 0.05 未満を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) EGFR-TKI 耐性株における化学療法感受性と HIF-1 $\alpha$ の発現の関係

EGFR-TKI 耐性獲得ヒト肺腺癌株において HIF-1 発現上昇および 2 種類の化学療法薬剤に対する耐性が確認された(図 1)。さらに siRNA を用いて HIF-1 を特異的にノックダウンしたところ、これらの細胞株における化学療法耐性能の抑制が確認された。以上より、EGFR-TKI 耐性ヒト肺癌細胞において、HIF-1 が化学療法耐性に関与していることが示された。

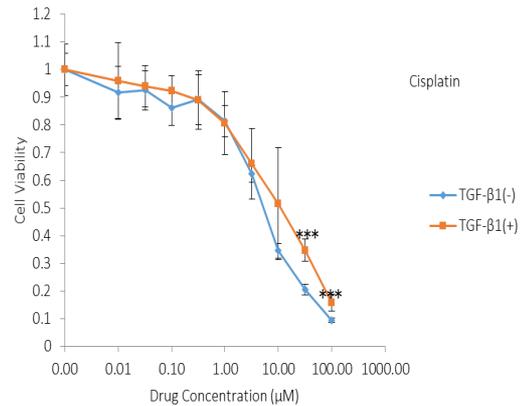


(図 1: EGFR-TKI 耐性株における化学療法感受性)

##### (2) EGFR-TKI 耐性株における HIF-1 と EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) との関連

特に HIF1 発現量の高い PC9/ER の遺伝子プロファイルについて、当教室で施行したマイクロアレイの結果を解析したところ、EMT 関連因子の発現上昇が確認された。PC9 に TGF- $\beta$ 1 を投与し EMT

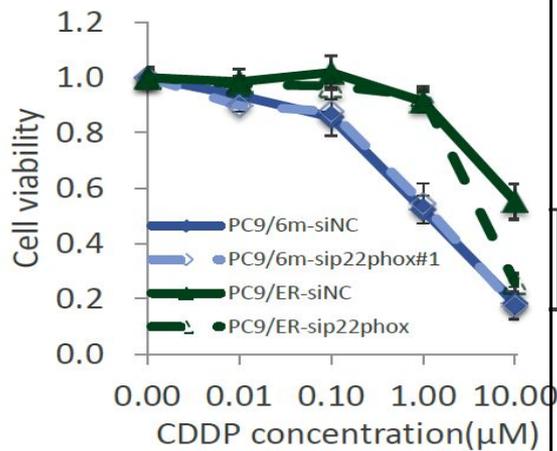
を誘導したところ、化学療法耐性の増大が認められた(図 2)。さらに、HIF-1 の遺伝子導入により EMT が誘導されることが明らかとなった。これより、EGFR-TKI 耐性ヒト肺癌細胞においては、HIF-1 による EMT 誘導を介して化学療法耐性が増大することが示された。



(図 2: EMT 誘導による化学療法耐性獲得)

##### (3) EGFR-TKI 耐性株における p22phox による HIF1 を介した化学療法耐性の誘導

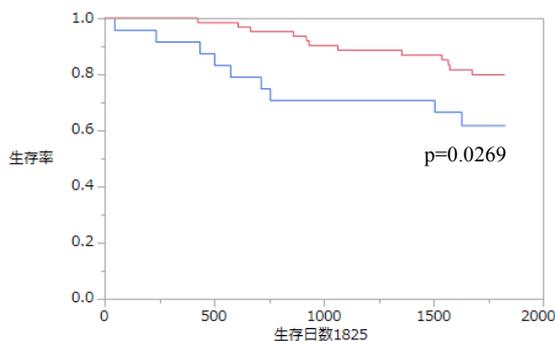
特に HIF-1 発現の高い PC9/ER の遺伝子プロファイルについて当教室で施行したマイクロアレイの結果を解析したところ、HIF-1 制御因子の中で p22phox の発現が上昇していることが明らかとなった。siRNA を用いて p22phox を特異的にノックダウンしたところ、HIF-1 の発現低下および化学療法耐性の抑制が確認された(図 3)。これより、EGFR-TKI 耐性ヒト肺癌細胞においては p22phox が HIF-1 -EMT を介した化学療法耐性誘導に関与していることが示された。



(図3：p22phox と化学療法耐性)

#### (4) ヒト肺腺癌組織における HIF-1 の発現意義

HIF-1 の発現と Stage, リンパ節転移および 5 年生存率に有意な相関関係が認められた(図 4)。これより、HIF-1 の発現が予後関連因子の 1 つとして臨床的意義を有することが示された。



(図4：HIF-1 と生存率)

#### 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 1 件)

Ryoko Saito, (9 名中 1 番目).

The Significance of MMP-1 in EGFR-TKI-Resistant Lung Adenocarcinoma: Potential for Therapeutic Targeting. Int. J. Mol. Sci. 2018. doi:

10.3390/ijms19020609 (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

小林雅行、齊藤涼子、他(9 名中 2 番目): EGFR-TKI 耐性獲得肺腺癌の cisplatin 耐性と HIF-1 との関係. 第 106 回日本病理学会総会(2017.4.27-29 京王プラザ 東京都新宿区)

小林雅行、齊藤涼子、他(8 名中 2 番目): The effect of HIF-1 $\alpha$  and EMT on the development of chemoresistance in EGFR-TKI resistant lung adenocarcinoma. 第 76 回日本癌学会学術総会(2017.9.28-30 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

[その他]

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

齊藤 涼子 (SAITO Ryoko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30733349