

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07197

研究課題名（和文）DNA損傷修復能による小細胞肺癌に対する個別化医療の確立

研究課題名（英文）Establishment of personalized treatment for small cell lung cancer by DNA damage repair capability

研究代表者

牧野 晴彦（MAKINO, HARUHIKO）

鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：20467707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々の研究で非小細胞肺癌細胞株において、EGFRシグナルが常時活性化しているEGFR遺伝子変異のある細胞株で放射線感受性が高いこと、そういった細胞株では核内へ移行したEGFRがDNA-PKcsと結合し放射線感受性に影響を及ぼしていることを明らかにしている。本研究で小細胞肺癌細胞株毎に放射線感受性の違いを認め、核内EGFRの発現、DNA-PKcsの発現量が異なることを明らかにした。また小細胞肺癌細胞が非小細胞肺癌と比較してDNA-PKcs阻害薬に対して細胞増殖抑制、アポトーシスが誘導されやすいことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、非小細胞肺癌に対しては分子標的治療による個別化治療が発展しているが、小細胞癌については分子標的治療薬の有効性が確認できず個別化治療は進んでいない。本研究において、小細胞肺癌細胞株毎に放射線照射後の核内EGFRの発現やDNA-PKcsの発現量が異なることやDNA-PKcs阻害薬の治療効果が明らかになった。これらの結果から小細胞肺癌の分子標的治療の開発につながり、小細胞肺癌に対する治療の発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In our study, we found that non-small cell lung cancer cell lines with EGFR mutations, in which EGFR signaling is constantly activated, are more radiosensitive, and that in these cell lines, EGFR translocated into the nucleus binds to DNA-PKcs and influences radiosensitivity. In this study, we found that each small cell lung cancer cell line has different radiosensitivity, and that the expression of nuclear EGFR and DNA-PKcs are different in each cell line. We also found that small cell lung cancer cells are more susceptible to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in response to DNA-PKcs inhibitors than non-small cell lung cancer cells.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：小細胞癌 DNA-PKcs

1. 研究開始当初の背景

近年、非小細胞肺癌における分子生物学的解明は、分子標的治療薬の生成とこれによる臨床的恩恵を一般診療において実践することに成功した。肺癌の診断において、EGFR 遺伝子の変異、ALK 融合遺伝子の有無、ROS1 遺伝子変異の検索は保険診療で認められ、これらの陽性患者に対しては各々の分子標的治療薬が実臨床で投与される。肺癌組織における PD-L1 発現率が高値の場合、PDL1 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬の適応となり、1 次治療からこれらの薬剤を使うことが推奨されている。一方、肺癌の中で 20-25% を占める小細胞肺癌の治療戦略は、この 25 年間ほぼ足踏みしているのが現状である。非小細胞肺癌において有効であった EGFR チロシンキナーゼ阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬などは、小細胞肺癌においてはその有効性は一定ではなく、未だ臨床応用には遠いと考えられ、白金製剤、トポイソメラーゼ阻害剤などの殺細胞性抗がん剤が小細胞肺癌化学療法のための唯一の治療薬である。実際、小細胞肺癌の抗がん剤、放射線に対する感受性は高く、限局型小細胞肺癌に対する放射線 + シスプラチンを含んだ化学療法の奏効率は 80%、進展型小細胞肺癌であってもシスプラチンを含んだ化学療法の奏効率は 60% を超えている。しかしながら、限局型であっても完全寛解に至るのは 20%、進展型においては 5% 以下といわれており、小細胞肺癌は難治性の疾患の一つに挙げられている。小細胞肺癌に対する課題は多いが、限局型に対する完全寛解率を上げるための放射線感受性を向上するための治療法として集学的治療を確立することと進展型小細胞肺癌に対する新たな化学療法(単剤治療としての有効性)を確立する必要がある。2012 年 Lauren らは、小細胞肺癌と非小細胞肺癌の蛋白レベルでのプロファイルにおいて、非小細胞肺癌は EGFR、MAPK 経路などの細胞増殖シグナリング蛋白が増強しているのに対して、小細胞肺癌では DNA 損傷修復に関する蛋白が増強しているとの興味深い報告を行った。2017 年 Sen らは、小細胞肺癌において DNA 損傷修復経路である CHK1 を阻害することで増殖抑制をもたらしたことを報告している。非常に分化度の低い小細胞肺癌に対して DNA 損傷修復を抑制することは、それだけで細胞死をもたらす可能性があり、集学的治療を考える中で、DNA 損傷修復の阻害を加えることは小細胞肺癌に対して合成致死をもたらしえる可能性がある。本研究で最も明らかにしたい問いは『小細胞肺癌における DNA 損傷修復能の差異を明らかにすることによって、それに応じた個別化治療を確立することが可能であるか?』ということであり、これが実現すれば難治性疾患の一つである小細胞肺癌に苦しむ患者に新たな治療を届けることができると考えられる。

2. 研究の目的

DNA 損傷修復経路である Non-Homologous End Joining(NHEJ)の中心的役割を担うのが DNA-PKcs である。450 kDa という大きな分子量をもつこの蛋白は Ku70/80 を介して、DNA 二本鎖損傷部位にリクルートされ DNA 損傷修復が行われる。2012 年 Lauren らは小細胞肺癌と非小細胞肺癌細胞株と臨床検体を比較し、非小細胞肺癌では受容体 細胞伝達経路が発達しているのに対し、小細胞肺癌では DNA 損傷修復経路が発達しており、その中でも DNA-PKcs と PARP1 の発現がより際立っていたことを報告している(Cancer Discovery 2012)。研究代表者らも予備実験ではあるが放射線照射と PARP 阻害剤との併用効果と DNA-PKcs 阻害剤である NU7441 が抗腫瘍効果を示すこと、小細胞肺癌細胞株の中でも感受性が異なることを確認している。2012 年 Bayers らは多くの小細胞肺癌において PARP1 が強発現していること、2014 年 Owonikoko らは小細胞肺癌にて BRCA1 が欠損しているものがあり、殺細胞性抗がん剤と PARP 阻害剤の併用効果が認められたことを報告しており、現在進行度のみで治療方法が決まっている小細胞肺癌は決して単一な疾患ではなく、其々に最も適した治療戦略をとる必要がある疾患であることを訴えている。我々は EGFR や ALK 融合遺伝子の有無によって第 1 選択薬が決まる非小細胞肺癌同様、その分子学的特徴を基に治療薬剤が選択できる個別化治療を小細胞肺癌の化学療法分野にも構築すべきであり、その主役となる可能性が、DNA 損傷修復蛋白であると考えている。非小細胞肺癌と比べて治療法の研究が遅れている小細胞肺癌抗がん剤治療分野ではあるが、その分子学的特徴を明らかにすることによって、現在 9~13 ヶ月と言われる進展型小細胞肺癌患者の生存期間延長に寄与する新たな治療戦略を確立するのが最終目標である。

3. 研究の方法

肺小細胞肺癌における DNA 損傷修復蛋白と核内 EGFR 発現と治療抵抗性についての検証

複数の小細胞肺癌細胞株において、放射線・白金製剤・トポイソメラーゼ阻害剤といった現在小細胞肺癌に対して、臨床で使用される治療法に対する感受性とその小細胞肺癌細胞株における NHEJ 経路蛋白と HR 経路蛋白の発現量と核内 EGFR 発現/細胞質内 EGFR 発現比を確認し、治療抵抗性に寄与しているものはどれか検証する。

PARP/DNA-PKcs 阻害薬・EGFR モノクローナル抗体による小細胞肺癌治療(放射線・抗がん剤)感受性増強作用の検討

すでに PARP 阻害薬と DNA-PKcs 阻害剤が、いくつかの小細胞肺癌細胞株に放射線感受性増強をもたらすことは確認している。メカニズムとして DNA 損傷修復遅延・細胞周期停止・アポトーシス誘導が考えられ、作用機序についても探求を行う。EGFR モノクローナル抗体が、小細胞肺癌に抗癌剤/放射線感受性増強をもたらすかについても同様に検討する。小細胞癌マウス xenograft モデルを用い放射線・抗癌剤感受性とこれら薬剤による感受性増強効果を検討する。

小細胞肺癌臨床検体における放射線/化学療法治療抵抗性と DNA 損傷修復蛋白・核内 EGFR 発現の相関についての検討

小細胞肺癌は難治性の疾患ではあるが、放射線や抗がん剤に非常に感受性が高く、これらの治療のみで根治したという症例を少数ながら経験する。進行が早く手術となる症例は少ないため臨床検体の採取が難しく、細胞診のみの診断の下、治療導入が行われる症例も少なくなく、臨床検体での検討が十分に行われてこなかったという理由から、小細胞癌についての研究は非小細胞肺癌に比べて遅れている一面がある。近年本邦が世界的にリードしている内視鏡技術の進歩に伴い、縦隔リンパ節を経気管支鏡超音波下に穿刺吸引 (EBUS-TBNA) することによってリンパ節を採取し、免疫染色も含めて病理学的に診断することが可能となっている。当院でも今まで約 100 例の小細胞癌を、EBUS-TBNA によるリンパ節生検で診断し、放射線治療を含めた抗がん治療を行っている。これらの症例のうち治療奏功例と治療抵抗例を比較することで何が治療効果を規定するのかが判明すれば治療効果予測因子として、臨床に応用する事が期待される。研究代表者らは現時点での細胞株を用いた実験から、DNA 損傷修復蛋白の発現 (DNA-PKcs リン酸化と PARP1 発現) と核内での EGFR の存在が放射線感受性を規定しているのではないかと考えている。放射線・化学療法の治療効果予測や治療標的となりうるかどうか検討するため、確定診断時の病理検体によってこれらの蛋白発現を検討する。

4. 研究成果

各種小細胞肺癌細胞株に対して放射線照射を行ったところ放射線感受性が細胞株毎に異なること (図 1)、DNA 損傷修復機構である NHEJ 経路の重要な因子である DNA-PKcs や Ku70 の発現、核内 EGFR 蛋白の発現が細胞株毎に異なることを明らかにした (図 2)。

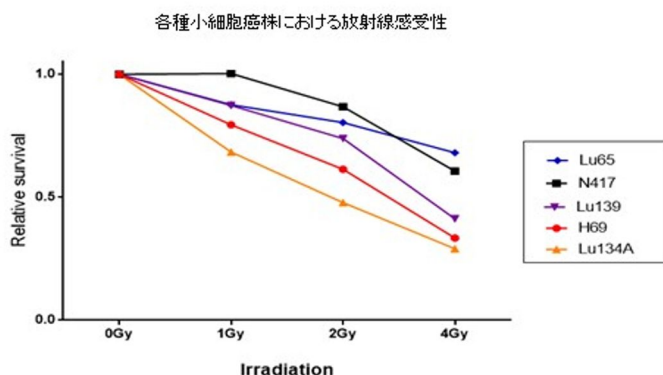


図1. 各種小細胞肺癌細胞株における放射線感受性

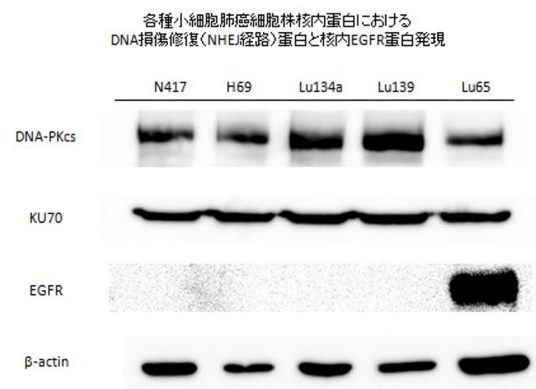


図2. 各種小細胞肺癌細胞株におけるDNA損傷修復蛋白と核内EGFR蛋白発現

次に、小細胞肺癌に対して DNA 損傷修復が治療ターゲットになり得るかどうか DNA-PK 阻害薬 (NU7441) を用いて検討した。各種肺癌細胞に対する、NU7441 の IC50 (50%細胞増殖阻止濃度) を検討した結果、N417・H69・Lu139・Lu134A などの小細胞癌細胞株は、比較的低い濃度で細胞増殖が抑制された。扁平上皮癌である Sq19 や EGFR 変異を持った腺癌細胞である HCC827、大細胞癌である Lu65 は低い NU7441 濃度で細胞増殖が抑制されたが、非小細胞肺癌である H1299 は高濃度の NU7441 が必要であり、A549・PC9 などの腺癌細胞は 50uM を超える NU7441 を作用させても、細胞増殖抑制効果は起こらなかった。NU7441 単剤による細胞増殖抑制は小細胞癌細胞株で強く見られる傾向にあった。また、NU7441 単剤における細胞増殖抑制効果として、まず、アポトーシス誘導について検討した。小細胞肺癌細胞株 (N417、H69) と Sq19 では、NU7441 投与 24 時間後より明らかにアポトーシス細胞の増加が見られた。H1299 はコントロールと比較して統計学的有

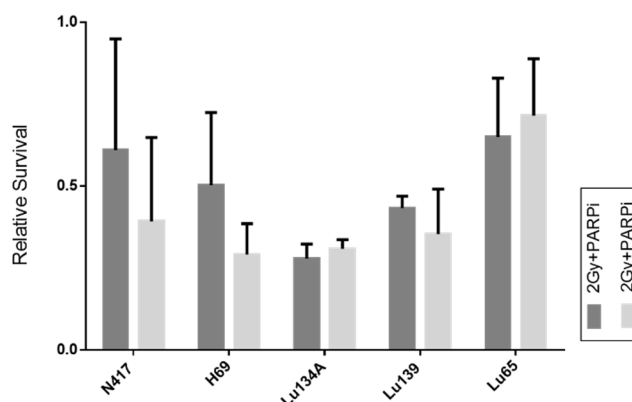


図3. 小細胞肺癌細胞株における放射線照射と PARP 阻害薬併用効果の検討

意差はあったものの、アポトーシス細胞は5%以下とわずかであった。A549はNU7441投与後48時間経過しても有意なアポトーシス細胞の増加は見られなかった。以上よりNU7441単独によるアポトーシス誘導は、細胞によって大きく異なることが示唆された。さらに、PARP阻害薬と放射線治療の併用についても検討したが、細胞株によっては併用による治療効果の増強を認めただが、全ての細胞株で効果を認めるものではなかった(図3)。

以上の結果からDNA損傷修復機構のプロファイルから小細胞肺癌の個別化治療開発が期待できる。マウスや臨床検体でのさらなる検討を行う予定であったが、COVID-19流行への対応のため当初の計画通りに研究を進めることができなかった。研究を完遂することができなかったことは悔やまれるが、今回の研究で小細胞肺癌のDNA損傷修復機構による個別化治療の開発への足掛かりを示すことができた。本研究で得られた知見を基にさらに研究を進め、小細胞肺癌に対する治療の発展を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	木下 直樹 (KINOSHITA NAOKI) (40750336)	鳥取大学・医学部附属病院・助教 (15101)	

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