

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08184

研究課題名(和文) CRISPRスクリーニングを用いた根治性の高い肺癌分子標的治療薬の探索

研究課題名(英文) Discovery of novel cancer treatment with CRIPR/Cas9 screening

研究代表者

寺井 秀樹 (TERAI, HIDEKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50445293

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)：我々は、EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株に対してCRISPR/Cas9スクリーニングを用いてEGFR-TKI耐性に関わる遺伝子の抽出を行った。

薬剤耐性に関わる遺伝子として、既報のあるAXL、FGFR1に加えてSHOC2を同定した。SHOC2に関しては、近年MEK阻害剤に対する薬剤感受性との関連で注目を集めるMAPキナーゼ経路の活性に関わる足場タンパクであり、EGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株においては、SHOC2の発現量と薬剤感受性に相関を認めることを見出した。さらに我々は、EGFR-TKI治療前後でSHOC2発現が変動することを臨床検体を用いた解析で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は日本人の癌死亡原因の中で臓器別第一位であり、予後不良の疾患である。分子標的薬の登場により、患者予後の改善を認めているものの、分子標的薬のみでの根治は困難である。そのため、薬剤耐性機構の解明とその克服は重要な課題であるが、本研究においては、日本人非小細胞肺癌で最も割合の高い遺伝子変異であるEGFR遺伝子変異陽性肺癌に対する特効薬であるEGFR-TKIに対する薬剤耐性に関わる新規遺伝子として、SHOC2を同定し、その薬剤感受性に影響を及ぼすメカニズムの一端を明らかにした。今後、SHOC2を標的とした創薬やバイオマーカーとして活用することで、肺癌薬剤耐性の克服につながることを期待する。

研究成果の概要(英文)：We utilized CRISPR/Cas9 screening in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer cell lines to identify genes involved in EGFR-TKI resistance.

In addition to previously reported genes like AXL and FGFR1, we identified SHOC2, a scaffold protein coding gene involved in the activity of the MAP kinase pathway, as a gene involved in drug resistance. In EGFR mutation-positive lung cancer cell lines, we found a correlation between the expression level of SHOC2 and EGFR-TKI sensitivity.

In addition, we found that SHOC2 expression was altered before and after EGFR-TKI treatment in clinical lung cancer specimens.

研究分野：肺癌薬物耐性機構の解明

キーワード：EGFR-TKI CRISPR/Cas9 SHOC2 MAPK EGFR lung cancer celestrol

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の網羅的遺伝子解析技術と小分子化合物合成技術の発達により、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: *EGFR*) をはじめとしたレセプターチロシンキナーゼ遺伝子活性化変異を有する肺癌に対し、チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine kinase inhibitor: TKI) が有効であることがわかってきた。しかし、臨床的にはこれら TKI の効果はほぼ例外なく 1 年前後で無効となり、薬剤に対する耐性化が問題となっている。一方、EGFR-TKI に対して感受性変異を有する癌細胞が、*EGFR* T790M 二次変異をはじめとした薬剤耐性を獲得する前に、一過性の初期耐性化状態 (drug persister state) を経過している可能性が示唆されている (Sharma et al. *Cell* 2010, Hata et al. *Nature Med.* 2016)。EGFR T790M 二次変異陽性肺癌に対する osimertinib など薬剤耐性化後の細胞に対する治療開発が進む中、薬剤に対する初期耐性に対して実用化に至っている治療は少なく、薬物治療による根治を妨げていると考えられる。

申請者は米国ダナファーマーの Peter Hammerman 研究室および David Barbie 研究室にて EGFR-TKI の治療効果を高めて drug persister state による初期耐性を回避することを目標に、EGFR 遺伝子変異陽性 PC9 非小細胞肺癌細胞株を用いた、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングを行った。CRISPR スクリーニングに関しては 2014 年に報告 (Wang et al. *Science* 2014) されて以来、薬剤開発をはじめとして、多分野に渡りその有効性が報告されており (Fellman et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2017) 精度の高いスクリーニング技術として注目されている。同定された遺伝子に対する分子生物学的解析を進めると共に、同様の手法を他の遺伝子変異を有する肺癌細胞株にも応用する事で、効率よく詳細な薬剤耐性化機構の解明と治療標的を同定できると考えプロジェクトを立ち上げた。

2. 研究の目的

本研究では バイアスをかけないゲノムワイドのアプローチ により drug persister state による初期耐性、薬剤感受性に関わる遺伝子群の同定を目指す。同定された初期耐性に関わる遺伝子群の中で特に有望なものに関して詳細な解析を行う。本プロジェクトにより肺癌薬物耐性に関するメカニズムを明らかにし、肺癌患者の予後改善もしくは治療予測のバイオマーカーにつながるような標的を見出す。

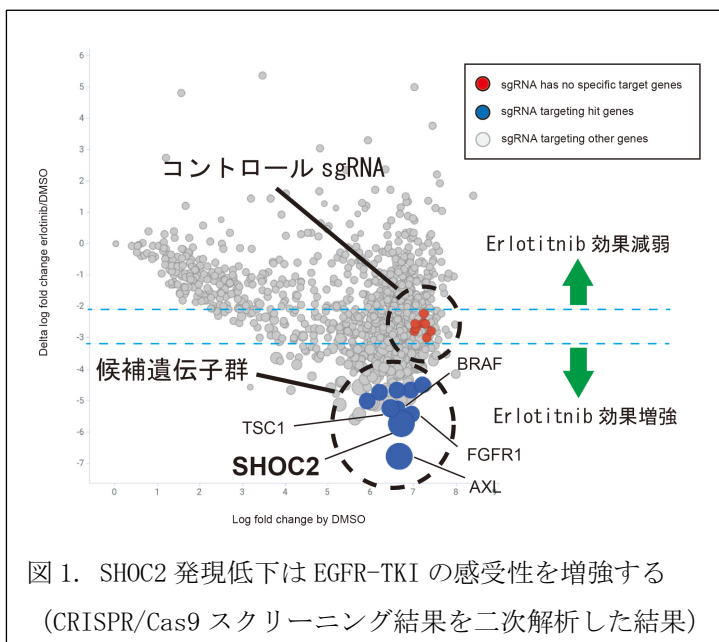
3. 研究の方法

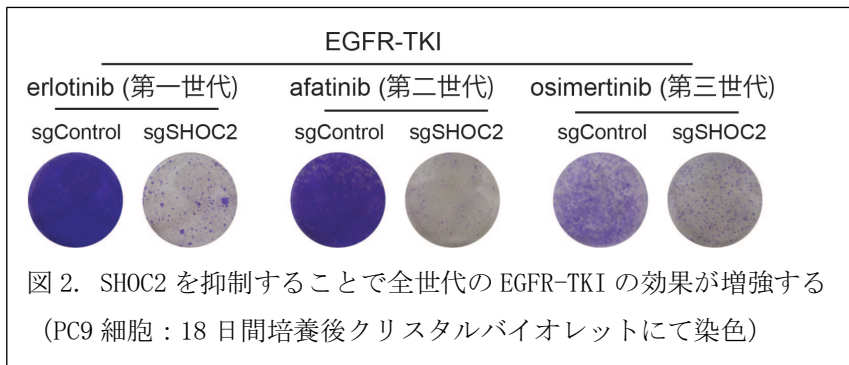
- (1) 同定された初期耐性に関わる遺伝子群の中で特に有望なものに関する解析
- (2) 効率よく同定された初期耐性に関わる遺伝子群のバイオマーカーとしての有用性の探索

4. 研究成果

我々は、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株に対して行った CRISPR/Cas9 スクリーニング (Terai et al. *Cancer Res* 2018) 結果を二次解析 することで、EGFR-TKI 耐性に関わる遺伝子の抽出を行った (図 1)。

その結果、薬剤耐性に関わる遺伝子として、過去に報告のある *AXL*、*FGFR1* といった遺伝子に加えて *SHOC2* を同定 した。*SHOC2* に関しては、近年 MEK 阻害剤に対する薬剤感受性との関連で注目を集める MAP キナーゼ経路の活性に関わる足場タンパクをコードする遺伝子である。我々は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株において、*SHOC2* の欠損細胞株や過剰発現細胞株を作成することで、*SHOC2* 発現量と第一世代から第三世代までの EGFR-TKI 感受性に相関を認めることを *in vitro* の実験系において確認した (図 2)。

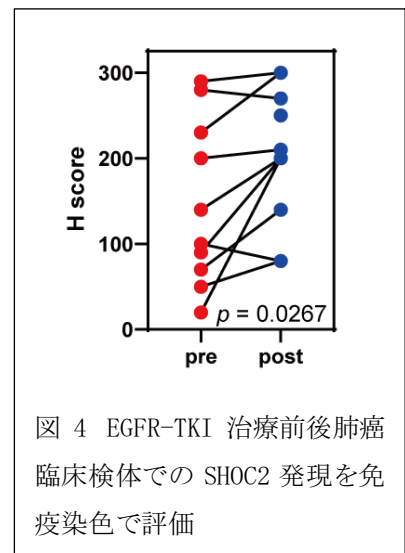
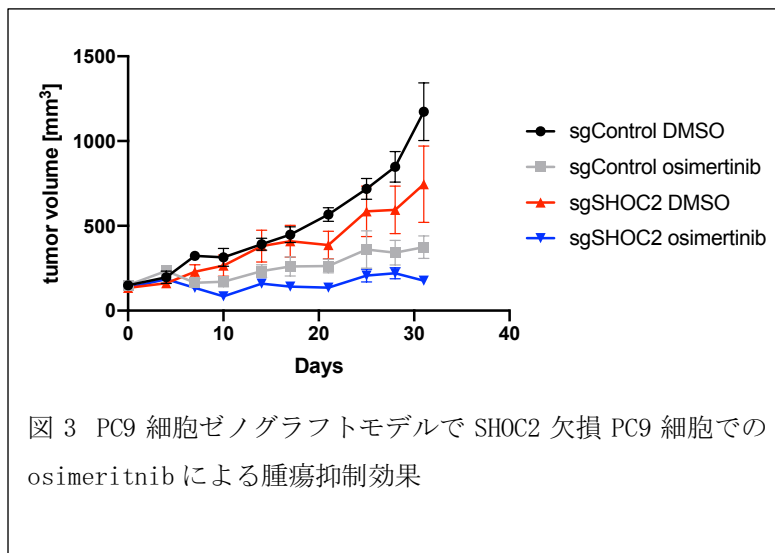




さらに、我々は過去に SHOC2 の阻害剤としての可能性が報告されている celastrol を用いて解析を行なったところ、EGFR-TKI と celastrol は相乗効果を示し、celastrol による SHOC2 抑制が薬剤感受性に関与している可能性が示唆された。

SHOC2 は MRAS/PP1c や SCRIB といったタンパクの足場として機能していることが知られており、特に MAPK の機能に影響を及ぼすことが知られていたことから、phosphoproteomics 解析を行った。その結果、SHOC2 欠損の有無によって、EGFR-TKI 処理に伴って pSHC1 や pBRAF など細胞内リン酸化に変化がみられることを見出した。

また、xenograft を用いた *in vivo* での解析において、SHOC2 遺伝子を欠損させた PC9 細胞は *in vivo* においても EGFR-TKI への感受性が増強されることを示した (図 3)。



さらに、ヒト臨床検体を用いた解析で、EGFR-TKI 治療前後での SHOC2 発現変動を評価した。その結果、EGFR-TKI 治療後は、治療前と比較して、主要組織において有意に SHOC2 の発現量が亢進することが判明した (図 4)。これらの結果から、SHOC2 の発現に関しては、臨床においても薬剤感受性のバイオマーカーとして活用できる可能性が示唆された。

以上の成果をまとめて、2020 年に *Molecular Cancer Research* 誌に報告した。

本研究においては、日本人非小細胞肺癌で最も割合の高い遺伝子変異である EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する分子標的薬である EGFR-TKI に対する薬剤耐性に関わる新規遺伝子として、SHOC2 を同定した。また、その薬剤感受性に影響を及ぼすメカニズムの一端を明らかにした。今後、SHOC2 を標的とした創薬やバイオマーカーとして活用することで、肺癌薬剤耐性の克服に活用されていくことを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Manabe Tadashi, Yasuda Hiroyuki, Terai Hideki, Kagiwada Harumi, Hamamoto Junko, Ebisudani Toshiki, Kobayashi Keigo, Masuzawa Keita, Ikemura Shinnosuke, Kawada Ichiro, Hayashi Yuichiro, Fukui Kazuhiko, Horimoto Katsuhisa, Fukunaga Koichi, Soejima Kenzo	4. 巻 18
2. 論文標題 IGF2 Autocrine-Mediated IGF1R Activation Is a Clinically Relevant Mechanism of Osimertinib Resistance in Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 549 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-19-0956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oashi Ayano, Yasuda Hiroyuki, Kobayashi Keigo, Tani Tetsuo, Hamamoto Junko, Masuzawa Keita, Manabe Tadashi, Terai Hideki, Ikemura Shinnosuke, Kawada Ichiro, Naoki Katsuhiko, Soejima Kenzo	4. 巻 18
2. 論文標題 Monomer Preference of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Influences the Synergistic Efficacy of Combination Therapy with Cetuximab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1593 ~ 1601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-18-1036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Hanako, Yasuda Hiroyuki, Hamamoto Junko, Masuzawa Keita, Tani Tetsuo, Nukaga Shigenari, Hirano Toshiyuki, Kobayashi Keigo, Manabe Tadashi, Terai Hideki, Ikemura Shinnosuke, Kawada Ichiro, Naoki Katsuhiko, Soejima Kenzo	4. 巻 127
2. 論文標題 Efficacy of afatinib or osimertinib plus cetuximab combination therapy for non-small-cell lung cancer with EGFR exon 20 insertion mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 146 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2018.11.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terai Hideki, Hamamoto Junko, Emoto Katsura, Masuda Takeshi, Manabe Tadashi, Kuronuma Satoshi, Kobayashi Keigo, Masuzawa Keita, Ikemura Shinnosuke, Nakayama Sohei, Kawada Ichiro, Suzuki Yusuke, Takeuchi Osamu, Suzuki Yukio, Ohtsuki Sumio, Yasuda Hiroyuki, Soejima Kenzo, Fukunaga Koichi	4. 巻 19
2. 論文標題 SHOC2 Is a Critical Modulator of Sensitivity to EGFR?TKIs in Non?Small Cell Lung Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 317 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0664	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Keigo, Terai Hideki, Yasuda Hiroyuki, Hamamoto Junko, Hayashi Yuichiro, Takeuchi Osamu, Mitsuishi Yoichiro, Masuzawa Keita, Manabe Tadashi, Ikemura Shinnosuke, Kawada Ichiro, Suzuki Yukio, Soejima Kenzo, Fukunaga Koichi	4. 巻 534
2. 論文標題 Functional dissection of the KRAS G12C mutation by comparison among multiple oncogenic driver mutations in a lung cancer cell line model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.110	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 浜本 純子、寺井 秀樹、眞鍋 維志、小林 慧悟、増澤 啓太、安田 浩之、川田 一郎、副島 研造
2. 発表標題 EGFRチロシンキナーゼ阻害剤の初期耐性におけるSHOC2の役割
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺井 秀樹、浜本 純子、江本 桂、眞鍋 維志、小林 慧悟、増澤 啓太、池村 辰之介、中山 壮平、川田 一郎、安田 浩之、鈴木 雄介、副島 研造
2. 発表標題 SHOC2肺癌
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideki Terai, Junko Hamamoto, Tadashi Manabe, Katsura Emoto, Takeshi Masuda, Satoshi Kuronuma, Keigo Kobayashi, Keita Masuzawa, Shinnosuke Ikemura, Sohei Nakayama, Ichiro Kawada, Yusuke Suzuki, Osamu Takeuchi, Yukio Suzuki, Sumio Ohtsuki, Hiroyuki Yasuda, Kenzo Soejima and Koichi Fukunaga
2. 発表標題 SHOC2 is a critical modulator of the sensitivity to EGFR-TKI in non-small cell lung cancer cells
3. 学会等名 the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------