

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08801

研究課題名(和文) リンカーリン酸化SMAD2による非小細胞肺癌EGFR-TKI抵抗性誘導機序

研究課題名(英文) Linker-phosphorylated SMAD2 induces resistance to tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutated lung adenocarcinoma

研究代表者

牧野 洋二郎 (Makino, Yojiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70421047

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)：EGFR遺伝子変異を持つ肺腺癌において、癌周囲の炎症により誘導されるサイトカインのIL-6刺激で引き起こされる細胞内シグナル伝達物質SMAD2のリン酸化の状態、及びその標的遺伝子産物の発現レベルによってEGFR阻害薬の治療効果を予測できることを明らかにした。この結果は、治療前の肺癌組織のSMAD2のリン酸化状態を調べることがEGFR阻害薬の薬剤治療効果を予測するバイオマーカーとなり得る可能性、また抗炎症薬やIL-6阻害薬によりEGFR阻害薬がより長い治療効果を得られる可能性を示唆しており、さらに言えば実臨床で問題となっているEGFR阻害薬の未知の獲得耐性メカニズムの解明につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は治療前の肺癌組織のSMAD2のリンカーリン酸化状態の測定がEGFR-TKIの薬剤治療効果を予測するバイオマーカーとなり得る可能性を示唆している。また実臨床でより問題となっているのはEGFR-TKIの獲得耐性だが、その30%程度は二次的遺伝子変異によらない未知のメカニズムである。この一部は癌微小環境の炎症の影響が示唆されており、多様な機能を有する炎症性サイトカインであるTGF- β とIL-6によるEGFR-TKI抵抗性誘導の解明が未知の獲得耐性メカニズムの解明につながる可能性がある。さらにSMAD2のリンカーリン酸化の抑制がEGFR-TKI耐性を予防する治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that stimulation with interleukin 6, a protein induced by inflammation of the tumor microenvironment, induces drug resistance to tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutated lung adenocarcinoma via linker-phosphorylated SMAD2, a substance that transmit intracellular signals. It was clarified that the effect of EGFR inhibitors can be predicted. This result suggests that examining the linker phosphorylation status of SMAD2 in lung cancer tissue before treatment may be a biomarker for predicting the therapeutic effect of EGFR inhibitors, and that anti-inflammatory drugs or IL-6 inhibitors may provide longer therapeutic effects of EGFR inhibitors. Furthermore, it may lead to the elucidation of the unknown resistance mechanism of EGFR inhibitors, which is a problem in actual clinical practice.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR-TKI抵抗性 TGF- β IL-6 SMAD リンカーリン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は1950年代より増加の一途をたどり、男性では癌罹患死亡率とともに第一位、女性でも大腸癌乳癌に迫っているが、治療法が進歩した今日でも予後不良で最も難治な癌腫の一つである。分子標的薬、特に上皮成長因子受容体-チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は肺癌治療に目覚ましい進歩をもたらしたが、治療抵抗性と薬剤耐性獲得の問題は未だ解決されていない。

Transforming growth factor (TGF- β)は細胞癌化と転移に重要なサイトカインである。TGF- β 細胞内シグナルは、リガンドが結合し活性化した受容体によってC末端がリン酸化されるTGF- β receptor-regulated SMADs (R-SMADs): SMAD2, SMAD3 とTGF- β スーパーファミリーサイトカインによって共有されるCo-SMAD: SMAD4が複合体を形成、核内に移行し標的遺伝子の発現調節を行う。SMADsは肺癌をはじめ多様な癌において癌抑制遺伝子として知られている。

他方、EGF等成長因子の細胞内シグナル伝達を担うRAS/MAPKシグナルはR-SMADsリンカー部位をリン酸化し、C末端リン酸化に伴うR-SMAD/SMAD4複合体によるシグナル伝達と拮抗する。TGF- β とEGFはRAS/MAPKシグナル伝達を共有しており、肺癌病態形成に重要な役割を担っている。R-SMADリンカー部位とC末端のリン酸化は、KRAS変異大腸癌、C型肝炎/肝硬変/肝癌等において異なる機能を発揮する。

肺癌微小環境における慢性炎症はInterleukin(IL)-6やTGF- β の産生や活性化を促進し、EGFR-TKI抵抗性を惹起する。研究代表者はGefitinib感受性EGFR746E-750A欠損変異を有するHCC827肺癌細胞株においてTGF- β がSMAD3を介してアポトーシスを誘導する一方、IL-6がSTAT3を介してSMAD3の転写を抑制しGefitinib抵抗性を誘導することを明らかにした。しかしながら、R-SMADリン酸化状態と肺癌のEGFR-TKI感受性の相関については不明である。

2. 研究の目的

本研究は、SMAD2/3のリンカーリン酸化が、肺腺癌のEGFR-TKI抵抗性を誘導する分子機序を解明することを目的とする。C末端リン酸化に対する拮抗作用に留まらない未知のSMAD2/3リンカーリン酸化の作用を解明することで、肺腺癌EGFR-TKI抵抗性獲得を予防する治療標的の同定に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

EGFR-TKI感受性EGFR変異肺腺癌細胞株HCC827とEGFR-TKI抵抗性EGFR変異肺腺癌細胞株NCI-H1975を用いて、EGFR-TKI感受性と抵抗性に及ぼすリンカーリン酸化SMAD2/3の役割を分子細胞レベルで解析し、EGFR-TKI抵抗性を誘導するリンカーリン酸化SMADの標的遺伝子をRNA sequencing (RNA-Seq)によって同定し、発現調節機序を解明する。マウス肺癌モデルを用いて生体レベルでの検討を行い、患者検体と臨床データを解析し治療感受性との相関を明らかにする。

平成30年度

(1) EGFR変異肺腺癌のEGFR-TKI抵抗性獲得とSMADシグナル伝達経路:

EGFR-TKI感受性EGFR変異肺腺癌細胞株HCC827 (EGFRE746_A750del)とEGFR-TKI抵抗性EGFR変異のうち最も頻度の高いEGFR T790Mを発現する肺腺癌細胞株NCI-H1975を、GefitinibとIL-6、TGF- β 、TGF- β I型受容体であるALK5の阻害薬LY2157299、EW7197 (Yoon JH, Mamura M et al, EMBO Mol Med. 11:1720-1739, 2013)の様々な組み合わせで刺激し、細胞周期をPI染色、アポトーシスをAnnexin V/PI染色でフローサイトメトリーを用いて分析する。SMAD2/SMAD3/SMAD4の発現及びC末端/リンカー部位リン酸化を、proximity ligation assay (PLA)にて検出し、共焦点顕微鏡を用いて観察する。予備実験でIL-6とALK5阻害薬がHCC827にSMAD2リンカーリン酸化とGefitinib抵抗性を誘導することを見出した。

(2) EGFR変異肺腺癌のEGFR-TKI感受性に対するSMAD2/3リンカー部位リン酸化とC末端リン酸化の効果:

HCC827とNCI-H1975にSMAD2/3リンカー及びC末端変異体をトランスフェクションし培養する。変異体移入細胞株をGefitinib、IL-6、TGF- β 、EW7197、LY2157299で刺激し、細胞周期及びアポトーシスをフローサイトメトリーで分析する。SMAD2/3の発現及びC末端/リンカー部位リン酸化をPLAにて検出し共焦点顕微鏡を用いて観察する。IL-6、TGF- β の下流でR-SMADsリンカー部位をリン酸化させるキナーゼを同定するため、変異体移入細胞株をGefitinib、IL-6、TGF- β 、EW7197、LY2157299と共に各種小分子阻害薬(ERK inhibitor: PD98059, JNK inhibitor: SP600125, p38 inhibitor: SB203580, GSK3 inhibitor: SB216763)で刺激し、細胞周期及びアポトーシスをフローサイトメトリーで分析する。予備実験としてHCC827にSMAD2リンカー部位変異体をトランスフェクションし、SMAD2リンカー部位S245とS245がGefitinib抵抗性に重要であることを見出した。

(3) RNA-Seqによる肺癌細胞株でのリンカーリン酸化 SMAD2/3 標的遺伝子同定：
(2)によって同定された Gefitinib 抵抗性を誘導する SMAD 変異体を発現した HCC827 と NCI-H1975 を用い RNA-Seq を行う (ebiogen, Korea, ExDEGA 分析ソフトウェア)。

(4) リンカーリン酸化 Smad2/3 の転写共役因子同定と標的遺伝子発現制御機序の解明：
IL-6 シグナルを伝達する STAT3 の発現とリン酸化及び SMADs との結合を PLA にて検出し、共焦点顕微鏡にて観察する。STAT3 リン酸化部位変異体(STAT3Y705F、STAT3S727A)を HCC827、NCI-H1975 にトランスフェクションする。Gefitinib、IL-6、TGF- β 、EW7197、LY2157299 で刺激し、SMADs との結合を PLA、共焦点顕微鏡にて観察、細胞周期及びアポトーシスをフローサイトメトリーで分析する。(3)で同定されたリンカーリン酸化 Smad2/3 標的遺伝子の発現調節機序を解析するため、SMADs、STAT3、転写補助因子(p300、Ski/SnoN、TGIF 等)の各種プラスミドを用い、プロモーターアッセイ、クロマチン免疫沈降を行う。

平成 31 年度以降

(5) 肺癌細胞移植 NOD/SCID マウスを用いた病態機序解析：
同定された SMAD2/3 リンカー部位の変異体、野生型 SMAD2/3、コントロール DNA を発現した HCC827 と NCI-H1975 を NOD/SCID マウスに移入して Gefitinib を投与し、in vivo イメージングシステムを用いて腫瘍増殖を比較検討する。

(3)の RNA-Seq により SMAD2/3 リンカーリン酸化と相互作用を有する新規シグナル伝達経路が同定され、当該シグナル伝達阻害薬が既存である場合、各種肺癌細胞株移入マウスに Gefitinib と共に投与し、感受性を比較検討する。

マウス実験が高価であるため、研究協力者と共同研究を行う。

(6) 肺癌患者検体 (I, II 期手術例) の組織免疫染色と治療感受性及び予後との相関評価：
本学医学研究倫理委員会にて承認されたプロトコールに則り肺癌患者より採取した手術検体を用いて上記検討によって同定された Gefitinib 抵抗性関連因子の発現を各種免疫染色で検討し、患者予後との相関を調べる。

4. 研究成果

(1) EGFR 変異肺腺癌の EGFR-TKI 抵抗性獲得と SMAD シグナル伝達経路：
IL-6 刺激が TGF- β 受容体 SMAD リンカー部位をリン酸化し、EGFR-TKI 抵抗性を誘導することを明らかにした。IL-6 と TGF- β 阻害薬はヒト肺腺癌細胞株 HCC827、NCI-H197、マウス肺癌細胞株 Ex3LL-luc の Gefitinib、Osimertinib による細胞死に抵抗性を誘導し、IL-6 は Smad2 リンカー部位リン酸化を誘導した。

(2) EGFR 変異 NSCLC の EGFR-TKI 感受性に対する SMAD2/3 リンカー部位リン酸化と C 末端リン酸化の効果：

TGF- β 受容体 SMAD 各種変異体を移入した細胞株を用いて、EGFR-TKI 抵抗性を誘導するリン酸化部位を同定した。Smad2 リンカー部位のリン酸化を受ける残基の恒常的活性型変異体を移入したヒト肺腺癌細胞株 HCC827、NCI-H197、マウス肺癌細胞株 Ex3LL-luc は、各 EGFR-TKI による細胞死に抵抗性を示す一方、不活性型変異体を移入した細胞株では細胞死が促進された。Smad2 リンカー部位をリン酸化する IL-6 シグナル伝達を担うキナーゼを同定した。

(3) RNA-Seq による肺癌細胞株でのリンカーリン酸化 SMAD2/3 標的遺伝子同定：
SMAD2 リンカー部位遺伝子変異体を導入した細胞株と対照群を用いて RNA シーケンスを行い、リンカー部位リン酸化 SMAD2 が EGFR-TKI 抵抗性を誘導する標的遺伝子を同定し、EGFR-TKI 抵抗性誘導機序を解明した。

(4) リンカーリン酸化 Smad2/3 の転写共役因子同定と標的遺伝子発現制御機序の解明：
IL-6 刺激後 EGFR-TKI 抵抗性を獲得した肺癌細胞株において TGF- β 受容体 SMAD と会合する因子を同定し、pSmad2L は STAT3 と協調して遺伝子転写を調節することを示した。

(5) 肺癌細胞移植 NOD/SCID マウスを用いた病態機序解析：
当初は異種移植モデルを用いる計画だったが、免疫系が正常な Ex3LL-luc マウス同種移植モデルに変更した。pSmad2L は生体内における Ex3LL の増殖を促進し、各 EGFR-TKI 抵抗性を誘導した。SMAD2 リンカー部位のリン酸化を受ける残基の恒常的活性型変異体を移入したヒト肺腺癌細胞株 HCC827、NCI-H197、マウス肺癌細胞株 Ex3LL-luc は、各 EGFR-TKI による細胞死に抵抗性を示す一方、不活性型変異体を移入した細胞株では細胞死が促進された。

(6) 肺癌患者検体 (I, II 期手術例) の組織免疫染色と治療感受性及び予後との相関評価：
本学医学研究倫理委員会にて承認されたプロトコールに則り肺癌患者より採取した手術検体

または生検検体を用いて、各種 EGFR-TKI に感受性がある EGFR 変異を有するにも関わらず抵抗性を示した症例と感受性を示した症例の組織を免疫染色し、SMAD2 リンカーリン酸化とその標的遺伝子産物の発現のレベルが治療抵抗性と有意に相関することを見出した。各 EGFR-TKI に一次抵抗性を示す肺癌患者検体では Smad2 リンカー部位がリン酸化されていたが、治療感受性症例においては SMAD2 リンカー部位リン酸化が認められなかった。

本研究によって EGFR 変異肺腺癌において、IL-6 刺激が TGF- β 受容体 SMAD リンカー部位をリン酸化し、EGFR-TKI 抵抗性を誘導することを明らかにした。この結果は、治療前の肺癌組織の SMAD2 のリンカーリン酸化状態を調べることが EGFR-TKI の薬剤治療効果を予測するバイオマーカーとなり得る可能性を示唆している。

また、実臨床でより問題となっているのは EGFR-TKI の獲得耐性だが、その 30%程度は二次的遺伝子変異 (secondary mutation) によらない未知の治療抵抗性メカニズムである。このメカニズムの一部は癌微小環境の炎症の影響が示唆されており、炎症局所において活性化され、多様な機能を有するサイトカインである TGF- β と IL-6 による EGFR-TKI 抵抗性誘導の解明が未知の獲得耐性メカニズムの解明につながる可能性がある。さらに言えば SMAD2 のリンカーリン酸化を抑えることによって、EGFR-TKI 耐性を予防する治療戦略につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Eunjin Bae
2. 発表標題 Linker-phosphorylated SMAD2 induces resistance to tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutated lung adenocarcinoma
3. 学会等名 第 85 回 日本インターフェロン・サイトカイン学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	真村 瑞子 (Mamura Mizuko) (60400686)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	
研究分担者	尹 晶煥 (Yoon Jeong-Hwan) (30748885)	東京医科大学・医学部・兼任助教 (32645)	
研究分担者	裴 恩真 (Bae Eunjin) (40773388)	東京医科大学・医学部・兼任助教 (32645)	
研究分担者	大平 達夫 (Ohira Tatsuo) (40317847)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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	池田 徳彦 (Ikeda Norihiko) (70246205)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

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