

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07191

研究課題名(和文) 分子標的治療薬による間質性肺疾患の新規予防戦略の構築

研究課題名(英文) Strategy for prevention of interstitial lung disease induced by molecular targeted therapy.

研究代表者

山本 和宏 (Yamamoto, Kazuhiro)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30610349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)の特定の遺伝子多型を有する患者群は、mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害薬による間質性肺疾患の累積発症率が高いことを明らかにした。また、低リスク遺伝子型を有する肺胞上皮細胞株A549細胞は、エベロリムスを長期曝露することにより組織線維化の初期過程である上皮間葉転換(EMT)が誘導されるとともに、CXCL2の発現低下、Aktの活性亢進が認められた。これらの分子変動がILDの発現予防戦略において重要な知見となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によりSTAT3遺伝子多型とmTOR阻害薬による間質性肺疾患との関連を明らかにし、STAT3遺伝子多型が間質性肺疾患の事前予測因子となる可能性を示した。この関連が詳細に検証され、検査として臨床応用された場合、本研究成果は分子標的型抗がん薬による間質性肺疾患の死亡者数の減少やmTOR阻害薬治療患者のQOLの向上に加え、mTOR阻害薬の治療成績の向上にも寄与する。また、mTOR阻害薬の長期曝露により生じる組織線維化の初期過程に寄与する分子を特定した。この分子の間質性肺疾患の発症における役割を詳細に解析することで、間質性肺疾患のメカニズムに基づく予防法を確立することができる。

研究成果の概要(英文)：Our clinical study demonstrated that the patients with specific genotype of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) polymorphism have higher cumulative incidence of interstitial lung disease (ILD). Moreover, our basic study revealed that A549 cells, an alveolar epithelial cell line carried with ILD low-risk genotype, shown reduction of CXCL2 and enhancement of Akt activity by long-term exposure of everolimus in addition to induction of epithelial mesenchymal transition. These molecular expression and activity changes may be an important perception for the preventive strategy for ILD.

研究分野：医療薬学

キーワード：間質性肺疾患 分子標的治療薬 mTOR ILD

1. 研究開始当初の背景

がん薬物療法における副作用は患者の QOL の低下のみならず、ときに致死的な影響を及ぼすこともあるため、緻密なケアが必要不可欠である。中でも、薬剤性の間質性肺疾患(ILD)は多くの抗がん薬において重大な副作用である。抗がん薬による ILD の報告は経年的に増加しており、この背景として分子標的型抗がん薬の進展に寄るところが大きい¹⁾。「ゲフィチニブによる急性肺障害」の事例を皮切りに、分子標的型抗がん薬による ILD の危険性が問題視されてから 10 年以上経過したが、現在においても根本的な発症メカニズムは解明されていない。特に mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害薬による ILD は、発症頻度が高い一方で、治療効果との相関性が示唆されており²⁾、ILD の予防により治療感受性が高い患者の治療継続に直接的に繋がると考えられる。また、近年では、免疫チェックポイント阻害薬が多様ながん種に対して使用されているが、免疫関連有害事象として ILD の発症が報告されており、薬剤性 ILD の新たな起因薬剤として危惧されている。ILD 予防・回避法の構築は、今後の患者主体のがん治療を検討する上での緊要課題である。

分子標的型抗がん薬による ILD を精度良く事前に予測する方法は未だ確立されていない。ILD の詳細な分子メカニズムを解明することで、投与前から ILD の発症を予測する因子を特定することが可能となるのみならず、ILD の発症に早期・高感度に反応する分泌タンパク質の同定やメカニズムベースの新規治療・予防法の確立に発展させることが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、分子標的型抗がん薬による ILD の事前予測因子、モニタリングバイオマーカーを確立すると共に、新規治療・予防法を探索することにより、ILD の分子メカニズムに基づく新規予防戦略を構築することを目的とし、基礎・臨床の両面から検証的研究を行う。

3. 研究の方法

1) 臨床研究：ILD の事前予測因子を評価する観察研究（多施設共同研究）

(対象) エベロリムスまたはテムシロリムスを投与する腎細胞がん患者
(主要評価項目) mTOR 阻害薬による ILD の発症 (CTCAE ver4.0 の肺臓炎または肺線維症)
(検査項目) 入院・通院中の血液検査の残余検体を用いて、事前予測因子として *STAT3* 遺伝子多型(-1697C/G)の Taqman Probe タイピングを行う。また、交絡する因子を調整するために ILD のリスク因子 (喫煙歴、肺の手術歴など) や薬物血中濃度からベイズ推定されるクリアランスにおいても合わせて評価する。

2) 基礎研究：各種肺胞上皮細胞株における mTOR 阻害薬への反応性評価

各種肺胞上皮細胞株の *STAT3*-1697C/G を解析する。これらの各種細胞株にエベロリムスを曝露させた後の各種 EMT マーカーの発現変動について遺伝子型毎の傾向を評価する。

3) 基礎研究：長期曝露細胞によるタンパク質発現解析

mTOR 阻害薬であるエベロリムスを長期的に曝露し、組織線維化の初期過程である上皮間葉転換(EMT)を確認したモデル細胞(A549/EV 細胞)を用いて、先行研究で実施したマイクロアレイ解析で変化を示した遺伝子のコードするタンパク質発現変化を Western blot 法により検証した。また、A549 細胞と A549/EV 細胞の培養液サンプルを回収し、ケモカインマルチプレックス解析により半網羅的な分泌タンパク質の発現変動を解析した。

4) 基礎研究：標的タンパク質の変動による EMT の可逆性の評価

上記発現解析の結果、薬剤の曝露に相互に反応して変動する因子を、細胞内タンパク質であれば siRNA によるノックダウン、分泌タンパク質であれば抗体による中和ならびに既存の阻害剤による標的因子の発現・活性制御を施した環境下における EMT を評価し、標的因子の EMT への寄与と可逆性について検討する。EMT は vimentin、E-cadherin の発現により評価する。

4. 研究成果

1) 臨床研究：ILD の事前予測因子を評価する観察研究

主要解析対象患者 57 名のうち、主要評価項目である 140 日以内の ILD の発症は 23 症例で確認された。*STAT3*-1697C/G genotype による ILD の発症頻度を Table 1 に示す。*STAT3*-1697C/G の GG genotype は他の遺伝子型と比較して有意に ILD の頻度が高かった。また、同集団において、一般的な ILD のリスク因子に有意な差は認められなかった。

Table 1. The association of the risk of interstitial lung disease within 140 days of mammalian

target of rapamycin inhibitor treatment initiation with the *signal transducer and activator of transcription 3-1697C/G genotype*³⁾

| Genotype | Incidence within 140 days | | | |
|----------|---------------------------|------------|--------------------|--------|
| | ILD | Non-ILD | OR (95%CI) | P |
| CC + GC | 9 (23.1%) | 30 (76.9%) | 1 | <0.001 |
| GG | 14 (77.8%) | 4 (22.2%) | 11.67 (3.06–44.46) | |

また、*STAT3-1697C/G* の GG 保有患者は他の遺伝子型を有する患者と比較して ILD の累積発症が早期に高まるが (Figure 1A)、無増悪生存期間および治療成功期間 (Figure 1B および 1C) に有意な差は認めなかった。

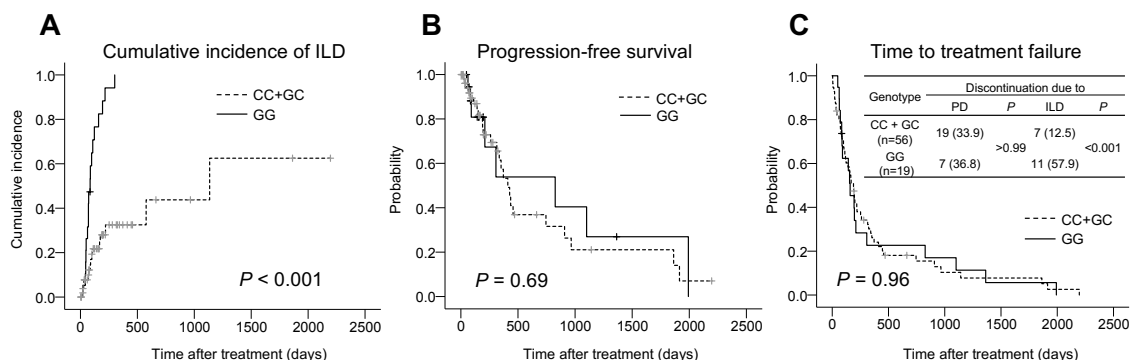


Figure 1 Time to event analysis according to the *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) -1697C/G genotype*³⁾

Time to event analyses for all enrolled patients were performed using Kaplan–Meier curves. The solid line represents patients carrying the GG genotype of *STAT3 -1697C/G*, and the dotted line represents patients carrying the GC and CC genotypes. (A) The cumulative incidence of ILD for each genotype group. (B) Progression-free survival for each genotype group. (C) Time-to-treatment failure for each genotype group. The table in Figure 2C presents the rate of treatment discontinuation attributable to PD and ILD according to the *STAT3 -1697C/G* genotype. *P* values in the figures and table were calculated using the log-rank test and Fisher’s exact test, respectively. ILD: interstitial lung disease, PD: progressive disease

2) 基礎研究：各種肺胞上皮細胞株における mTOR 阻害薬への反応性評価

各種肺胞上皮細胞の *STAT3-1697C/G* をタイピングした結果、A549 細胞は CC、LK-2 細胞は CG、EBC-1、ABC-1、SK-MES-1 及び COR-L23 細胞は GG であった。A549 細胞にエベロリムスを 72 時間曝露した結果、EMT マーカーである Fibronectin、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin の発現に有意な変動は認められなかった。また、EBC-1、ABC-1、SK-MES-1 及び COR-L23 細胞では、エベロリムスの曝露により上皮系マーカーである E-cadherin の発現低下または間葉系マーカーである Fibronectin、N-cadherin、Vimentin の発現増大が認められ、これらの細胞では EMT が生じている可能性が示唆された。

3) 基礎研究：長期曝露細胞によるタンパク質発現解析

STAT3-1697C/G が GG であった A549 細胞にエベロリムスを 3 ヶ月曝露させた長期曝露モデル細胞 (A549/EV 細胞) を樹立した。A549/EV 細胞は、A549 細胞と比較して、上皮系マーカーである E-cadherin の発現低下と間葉系マーカーである Fibronectin、N-cadherin、Vimentin の発現増大が認められ、EMT を誘導している可能性がある。また、mTOR 関連シグナル伝達因子の活性を評価した結果、Akt のリン酸化の亢進を認めた。A549 細胞および A549/EV 細胞によるマイクロアレイ解析の結果、A549/EV 細胞において 2 倍以上の発現変動を示した遺伝子は 19 種であった。また、細胞培養液を用いたケモカインマルチプレックス解析の結果、A549/EV 細胞で CXCL2、CXCL5、IL-8 の発現が有意に低値を示し、CCL15 が有意に高値を示した。また、細胞培養液への分泌変動の中で CXCL2 の低値がマイクロアレイ解析の結果と一致した。

4) 基礎研究：標的タンパク質の変動による EMT の可逆性の評価

A549/EV 細胞に対して Akt の選択的リン酸化阻害剤である MK-2206 を曝露することで、A549 細胞より発現が増大した Fibronectin が MK-2206 の濃度依存的に低下する傾向を示した。エベロリムスの長期曝露により亢進した Akt の活性を阻害することにより、上皮系細胞への再転換が生じる可能性がある。CXCL2 の添加による A549/EV 細胞の EMT マーカーの発現変動につ

いては今後の検討が必要である。

<引用文献>

1. 日本呼吸器学会薬剤性肺障害の診断・治療の手引き第2版作成委員会, 編. 薬剤性肺障害の診断・治療の手引き第2版. メディカルレビュー社. 2018.
2. Atkinson BJ, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor-associated non-infectious pneumonitis in patients with renal cell cancer: predictors, management, and outcomes. *BJU Int.* 2014; 113: 376-382. PMID: 24053120
3. Yamamoto K, et al. STAT3 Polymorphism Associates With mTOR Inhibitor-Induced Interstitial Lung Disease in Patients With Renal Cell Carcinoma. *Oncol Res.* 2022; 29: 11-23. PMID: 35016744

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 山本和宏 | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 ゲノム医療の発展と薬剤師の役割 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Apo Talk | 6. 最初と最後の頁 2-4 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 Yamamoto K, Iroji T, Shinomiya K, Yoshida A, Harada K, Fujisawa M, Omura T, Ikemi Y, Nakagawa S, Yonezawa A, Ogawa O, Matsubara K, Iwamoto T, Nishikawa K, Hayashi S, Tohara D, Murakami Y, Motoshima T, Jono H, Yano I. | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 <i>STAT3</i> Polymorphism Associates With mTOR Inhibitor-Induced Interstitial Lung Disease in Patients With Renal Cell Carcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics | 6. 最初と最後の頁 11~23 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3727/096504022X16418911579334 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 山本和宏 |
| 2. 発表標題 薬剤師が知っておきたいゲノムと薬のはなし |
| 3. 学会等名 千葉病院薬剤師会スキルアップセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本和宏 |
| 2. 発表標題 よくわかる腎機能低下患者の抗がん薬個別化投与設計 |
| 3. 学会等名 第14回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浜崎美月, 山本和宏, 瀧口常男, 國正淳一, 矢野育子 |
| 2. 発表標題 肺由来細胞のエベロリムス反応性におけるSTAT3遺伝子多型の影響 |
| 3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 第27回 クリニカルファーマシーシンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 8.Tomoyuki Sakaue, Kazuhiro Yamamoto, Takahito Endo, Takeshi Ishimura, Tomohiro Omura, Ikuko Yano |
| 2. 発表標題 Population pharmacokinetic modeling of everolimus in renal transplant patients with multiple immunosuppressive therapy. |
| 3. 学会等名 日本薬物動態学会 第34回年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本和宏 |
| 2. 発表標題 最新のPGx研究: STAT3遺伝子多型と分子標的型抗がん薬の副作用 |
| 3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuhiro Yamamoto |
| 2. 発表標題 Role of STAT3 in hand-foot skin reaction induced by multi-targeted tyrosine kinase inhibitors |
| 3. 学会等名 日本薬物動態学会 第34回年会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 山本和宏 |
| 2. 発表標題 経口分子標的型抗がん薬のTDM |
| 3. 学会等名 第41回日本病院薬剤師会近畿学術大会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|
| | |