

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16879

研究課題名（和文）肺腺がんにおけるEGFR-TKI耐性機構の一細胞解析による解明

研究課題名（英文）Single-cell analyses reveal diverse mechanisms of resistance to EGFR-TKI in lung cancer

研究代表者

鹿島 幸恵 (Kashima, Yukie)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：80831883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：EGFR変異肺がんでは、EGFR-TKIが有力な手段であるが、耐性獲得が報告されてきた。本研究では、EGFR-TKI阻害薬オシメルチニブとエルロチニブを用い、薬剤耐性の過程を「一細胞レベル」で、「経時的に」、「モデル系」及び「臨床データ」を利用して、解析することで薬剤耐性メカニズムの解明を行った。モデル系の解析から、トランスクリプトームやエピゲノムのレベルで耐性化に関与が示唆される因子が同定された。これらの因子は、臨床での薬剤耐性症例においても一部関与が示唆された。本研究の成果は国際査読雑誌に掲載された(Kashima et al, Cancer Research, 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の非小細胞がん患者ではEGFR変異が、50%の割合を占めることが先行論文で報告されている。EGFR-TKIの耐性獲得に関しては、基礎実験、臨床検体の解析、バルクレベルのNGS解析等からいくつかの経路が示唆されてきたが、多層オミクスを利用した解析や不均一性に着目した研究は数が限られていた。本研究の成果は、一細胞RNA-seqと一細胞ATAC-seqを利用し、がんの不均一性や経時変化に着目し、薬剤耐性獲得の過程を明らかにした。これらの結果は、今後の個別化医療や創薬研究においても基盤となるデータになりうるという意味で高い社会的意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：EGFR-TKI, EGFR-tyrosine kinase inhibitor, is a promising therapy in EGFR-mutated lung cancer, but acquisition of resistance during treatment has been reported. In this study, we investigated the mechanism of drug resistance using EGFR-TKI inhibitors, osimertinib and erlotinib, by analyzing the process of drug resistance at the single-cell level longitudinally, using model lung cell lines and clinical biopsy samples. The analysis of model cell lines demonstrated some genes be involved in acquiring drug resistance. Those genes were also implicated in some clinical cases of drug resistance. The results of this study were published in an international peer-reviewed journal (Kashima et al, Cancer Research, 2021).

研究分野：シングルセル解析

キーワード：シングルセル解析 がん不均一性 EGFR-TKI オシメルチニブ 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

非小細胞がん患者において EGFR 変異は、欧米では 5-15%、日本人では 50%の割合を占める(Kohno et al, 2015, Takahashi et al, 2016)。EGFR 感受性変異を持つ患者では、第一、第二世代 EGFR-TKI が有力な手段とされてきたが、ほぼ全例で耐性の獲得が報告され、50%以上が T790M の変異獲得によるものである(Kobayashi et al, 2005, Pao et al, 2005)。第三世代 EGFR 阻害薬の一つであるオシメルチニブは、第一世代、第二世代に抵抗性を示す T790M だけでなく、感受性変異である Exon19del、L858R 変異を持つ患者に対しても効果があることが知られている。その一方で、第一世代、第二世代 EGFR-TKI と同様、第三世代 EGFR-TKI においても薬剤耐性が獲得されることが既に報告されている。

オシメルチニブでは、耐性につながる変異として、C797S、T790M loss の耐性変異が報告されているが(Thress et al, 2017)、体系立った解釈は未だにされていない。がんの変異はトランスクリプトームから始まり、ゲノムに固定されるという報告もあることから(Takahashi et al, 2017)、トランスクリプトーム解析は特に耐性獲得初期の理解を行うにあたり重要な意義を持つと考えられる。

また、耐性獲得初期段階では、耐性に関与する細胞は限られた集団であり、獲得の機序は複数存在することから(Garraway et al, 2012)、従来のバルク解析では困難であった網羅的な解析を、近年利用が進んでいる一細胞解析であれば可能でないかと考えた。がんの不均一性は、治療抵抗性の獲得に大きな役割を果たしており、一細胞解析はこの点においても、本研究に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、『耐性獲得初期段階での一細胞レベルでのトランスクリプトーム変化、それらの変化と EGFR 変異との関連、細胞集団の構成の変化の解析』を行い、薬剤耐性のメカニズムを網羅的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

i) モデル細胞株の樹立

はじめに、肺腺がん培養細胞から耐性株を樹立した。今回の解析では、PC9 と H1975 という異なる変異を持つ 2 つの肺がん由来細胞株を利用した。具体的には、PC9 からオシメルチニブ耐性を獲得させた PC9-OR、エルロチニブ耐性を獲得させた PC9-ER、PC9-ER からさらにオシメルチニブ耐性を獲得させた PC9-EROR、H1975 からオシメルチニブ耐性を獲得させた H1975-OR を準備した。これらの細胞株では、モデル系の利点を生かし、獲得耐性前後だけでなく、中間点を含む複数のタイムポイントを解析した。

ii) モデル細胞株の一細胞解析

次に、これらの耐性細胞株を一細胞解析に供した。今回は、scRNA-seq によるトランスクリプトームの解析だけでなく、scATAC-seq によるエピゲノムの解析も行なった。細胞の状態ごとにライブラリを作製し(親株, 30 nM 耐性株(初期耐性), 2000 nM 耐性株(耐性後期))、NGS によりシーケンスを行なった。得られたデータセットは、主に R のパッケージを利用して解析を行なった。ここまでの結果から、いくつかの遺伝子が耐性への関与を示唆された。

iii) 検証実験/ 臨床検体の利用

耐性が関与された遺伝子に関しては、検証実験を行った。最後に、EGFR-TKI 耐性となった患者からの生検サンプルを取得し、モデル系や実験で耐性への関与が示唆された遺伝子が実際の EGFR-TKI 耐性肺がんにおいて、どのような発現パターンを示すのかを確認した。今回の解析では、モデル系の樹立の際に第一世代の Erlotinib と第三世代の Osimertinib を利用したため、臨床検体も、いくつかの EGFR-TKI 治療の症例の検体を取得、解析した。

4. 研究成果

モデル系細胞株の一細胞解析から、肺腺がん細胞が耐性を獲得する過程で、トランスクリプトームやエピゲノムのレベルで耐性化に関与が示唆される複数の遺伝子が同定された。これらの遺伝子の中には既に EGFR-TKI 耐性に関する先行報告がある AURKA, AXL, VIM 等が含まれていた一方で、CD74 が新規候補遺伝子として上げられた。これらの遺伝子発現パターンは、細胞株にかかわらず類似するものがある一方で、差が見られるものも存在した。これらの基礎実験から得られたデータをもとに解析を行なったところ、耐性獲得患者の臨床検体においても同様の発現上昇

パターンの細胞が存在することが確認された。本研究は、EGFR-TKI に対する耐性の基礎となるメカニズムについて新たな知見を提供した(Kashima et al, Cancer Research, 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kashima Yukie, Shibahara Daisuke, Suzuki Ayako, Muto Kyoko, Kobayashi Ikei S., Plotnick David, Udagawa Hibiki, Izumi Hiroki, Shibata Yuji, Tanaka Kosuke, Fujii Masanori, Ohashi Akihiro, Seki Masahide, Goto Koichi, Tsuchihara Katsuya, Suzuki Yutaka, Kobayashi Susumu S.	4. 巻 81
2. 論文標題 Single-Cell Analyses Reveal Diverse Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4835 ~ 4848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-2811	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 Nagasawa Satoi, Kashima Yukie, Suzuki Ayako, Suzuki Yutaka	4. 巻 41
2. 論文標題 Single-cell and spatial analyses of cancer cells: toward elucidating the molecular mechanisms of clonal evolution and drug resistance acquisition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-021-00170-x	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鹿島幸恵
2. 発表標題 一細胞解析による肺がん薬剤耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会
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
---------	---------