

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03535

研究課題名(和文) ユビキチン化を標的とした細胞死と細胞老化誘導による小細胞肺癌新規治療法の探索

研究課題名(英文) Exploration of novel therapies for small cell lung cancer by targeting ubiquitination to induce cell death and senescence

研究代表者

田島 健 (Tajima, Ken)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50384102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：緊急に必要とされる小細胞肺癌(SCLC)の新規治療法開発を目的とし、SCLCの脆弱性を特定するために、Project Achillesデータベースを利用し、SKP2とCKS1Bが1位と2位の必須遺伝子であることを同定した。組織マイクロアレイの免疫染色解析から、SKP2は95%以上のサンプルで発現しており、一般的な神経内分泌マーカーと比べても非常に強いことが明らかになった。予想通り、SCLC細胞株はSKP2阻害剤に感受性であった。SKP2抑制による増殖抑制の機序はRB1野生型と変異型とで異なっていたが、SKP2はRB1変異の有無に関係なく、SCLC患者に対する新規治療標的として考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌(SCLC)は、肺癌の中で最も恐れられているタイプの一つである。ここ数十年、大きな治療上のブレイクスルーがないため、全生存期間の大幅な改善はみられていない。従来の網羅的遺伝子解析から新たな治療標的の同定には至っておらず、新たな着眼点が必要であると考えられた。本研究では網羅的な遺伝子機能解析が可能なProject Achillesのデータベースを利用しSKP2を同定した。SKP2はSCLCの生物学にとって重要であり、臨床診断に役立つだけでなく、RB1変異の有無にかかわらずSCLC患者にとって有望な治療標的である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A genome-wide loss-of-function screening database was used to identify vulnerabilities for the development of urgently needed novel therapies for small cell lung cancer (SCLC). This screening identified SKP2 and CKS1B as the first and second essential genes, respectively. Surprisingly, immunohistochemistry on tissue microarrays revealed that SKP2 was expressed in more than 95 percent of the samples and was even much more intense compared to commonly used neuroendocrine markers. As expected, SCLC cell lines were sensitive to the SKP2 inhibitor. Although the mechanism of growth inhibition by SKP2 suppression was different between RB1 wild-type and mutant SCLC, SKP2 could be considered as a novel therapeutic target for SCLC patients regardless of RB1 mutation status.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌 ユビキチン プロテオソーム経路 SKP2 細胞周期 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんは日本において、がんによる死亡の第一位であり、がん対策における優先度が極めて高い疾患である。近年、非小細胞肺がんでは、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害など新規の治療法が驚くべき速さで進歩している。一方、小細胞肺がんは、肺がん全体の約 15 ~ 20% 前後を占める極めて予後不良の疾患である。

2002 年に Japan Clinical Oncology Group (JCOG) から報告された第三相比較試験 (JCOG9511) によりシスプラチン + イリノテカン併用療法がシスプラチン + エトポシド併用療法と比較し有意に生存期間延長をきたすこと (生存期間中央値 9.4 ヶ月対 12.8 ヶ月) が報告され、我が国の標準的治療となった。しかし非小細胞がんでは分子標的薬により中央生存が 3 年を超えるのに対し、小細胞肺がんでは 6 ~ 12 ヶ月程度で長期生存はほとんど見込めない。予後の改善のため、さまざまな研究が行われてきたが、驚くべきことにシスプラチン + イリノテカン併用療法が標準的治療となってから 15 年以上が経過しているが、最新の肺がんガイドライン 2017 においても依然としてグレード A として推奨され、新規治療法の開発は遅々として進んでいない。

小細胞肺がんは他の悪性腫瘍に比較して遺伝子変異頻度が高く、ゲノム不安定性が発がんや進展に関与していると考えられ、ゲノム不安定性の素因となる DNA 損傷応答の破綻、すなわちがん抑制遺伝子の関与が示唆され、事実 TP53 や RB1 では 100% 近くこの経路の失活がみられる。小細胞肺がんは明確なドライバー遺伝子変異はもたず、がん抑制遺伝子の破綻に基づき発がんや進展するものと考えられ、従来の網羅的遺伝子解析から新たな治療標的の同定には至っておらず、新たな着眼点が必要であると考えられる。

そこで本研究では、網羅的な遺伝子機能解析が可能な Project Achilles のデータベースを利用した。小細胞肺がん依存度の高い分子として E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子である SKP2/CKS1B を同定し、小細胞肺がんにおいて新規の治療標的の可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「長期にわたり新規治療法が開発されていない小細胞肺がんにおける、新規治療標的の同定ならびにその機能解析」である。

より早く確実に新薬の開発につながるのは活性型遺伝子変異への阻害剤であり、実際に多くの製薬企業ならびに研究者はジェネティック、特に活性型遺伝子変異に注目しており、一般的に癌抑制遺伝子やエピジェネティクスを治療標的と考えている者は極めて少ない。しかし前述のとおり小細胞肺がんの特徴は「明確なドライバー変異遺伝子もたず、癌抑制遺伝子の破綻」であり、癌抑制遺伝子やエピジェネティクスが治療標的となる可能性が高い。申請者らは以前より癌抑制遺伝子とエピジェネティクスに着目し、現在も研究を継続中であるが、本研究もジェネティクスとエピジェネティクスを最も包括的に遺伝子の機能解析が可能な Project Achilles を利用し、癌抑制遺伝子を直接または間接的に含めて解析を行う。さらに当院で集積された多数の小細胞肺がんの臨床検体を解析に加え、標的分子として同定された SKP2/CKS1B を中心に解析を行い、小細胞肺がんにおいて機能解析を行うことで新規治療標的としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究において、小細胞肺がんにおける新規治療標的の同定ならびにその機能解析のため、以下の検討を行った。

(1) SKP2 の新規診断マーカーとしての可能性

Project Achilles に登録されている小細胞肺がん細胞株ならびに非小細胞肺がん細胞株の RNA-seq データを用いて SKP2 の発現の比較を行った。さらに小細胞肺がん細胞株ならびに非小細胞肺がん細胞株における Project Achilles による SKP2 の dependency score と SKP2 の発現比較を行った。また小細胞肺がん細胞株、非小細胞肺がん細胞株ならびに他癌腫の細胞株を用いて、SKP2 の発現を qPCR ならびに WB により比較を行った。

さらに臨床検体における SKP2 の発現解析として小細胞肺がん大細胞神経内分泌がんから構成される Tissue microarray (TMA) を用いた IHC により解析を行った。また現在臨床で用いられている神経内分泌マーカーも染色し、SKP2 と比較を行う。さらに対象として非小細胞肺がんの TMA を用いて SKP2 の発現解析を行った。また気管支鏡下などによる微小生検検体ももちいて IHC により SKP2 の発現解析を行った。

(2) 実際の小細胞肺がん細胞株において SKP2/CKS1B への依存度

SKP2 阻害剤を用いて、小細胞肺がん細胞株ならびに他癌腫での抗がん剤感受性試験を行い、

Project Achilles による SKP2 の依存度が高いことの validation を行う。

(3) 新たな治療標的としての可能性

SKP2 ならびに CKS1B に対して siRNA ならび shRNA による抗腫瘍効果を検討する。SKP2、CKS1B をノックダウン後にアポトーシスの誘導がされているのか、さらに細胞老化が誘導されているのか解析を行う。

(4) 小細胞肺癌において SKP2/CKS1B への依存度が高いメカニズムの解明

抗腫瘍効果のメカニズムの解明として、アポトーシスと老化の誘導がどのように誘導されているのか細胞周期やアポトーシスに関与している各種マーカーを WB により解析を行う。

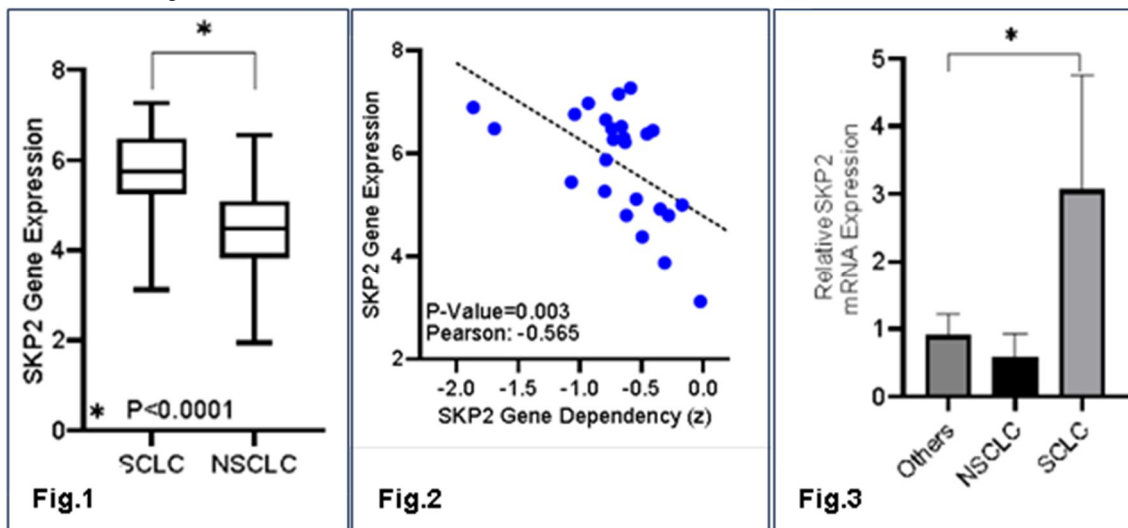
4 . 研究成果

(1) SKP2 の新規診断マーカーとしての可能性

Project Achilles に登録されている小細胞肺癌細胞株ならびに非小細胞肺癌細胞株の RNA-seq データを用いて SKP2 の発現の比較を行った。この結果、SCLC において SKP2 の発現は優位に上昇していることが明らかになった (Fig.1)

さらに SKP2 の発現と Project Achilles の dependency score を比較したところ、強い負の相関が明らかとなり、SKP2 は SCLC において重要な役割を担っている可能性が示唆される結果となった (Fig.2)

また小細胞肺癌細胞株と非小細胞肺癌細胞株ならびに他癌腫の細胞株における SKP2 の発現を qPCR により確認したところ、小細胞肺癌細胞株において明らかに上昇していることが確認された (Fig.3)



実際の臨床検体における SKP2 の発現を小細胞肺癌ならびに大細胞神経内分泌がんから構成される TMA を用いた IHC により検証し、また以前より小細胞肺癌の免疫組織染色において神経内分泌マーカーとして使用している synaptophysin、Chromogranin、CD56 ならびに近年新規の

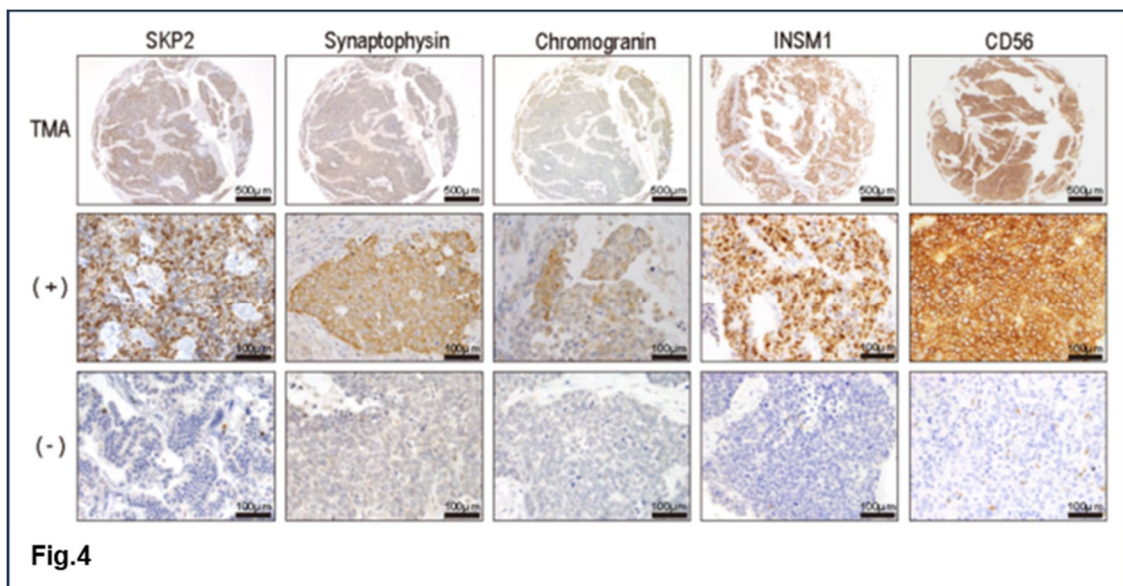


Fig.4

小細胞肺癌マーカーとして報告された insulinoma-associated protein 1 (INSM1)と比較を行った。SKP2 は細胞核に染色され、従来の神経内分泌マーカーである synaptophysin、synaptophysin、CD56 と比較して染色は明瞭であり、また強度は強い傾向になった (Fig.4)。さらに SKP2 の陽性率はこれらのマーカーと比較して明らかに高く、また INSM1 と比較しても同等またはそれ以上であった。

さらに IHC において偽陰性が問題となる微小検体においても SKP2 は高い染色強度を持つ事が明らかとなった (Fig.5)。また非小細胞肺癌からなる TMA を用いて SKP2 の発現を確認したところ、小細胞肺癌と比較して明らかに陽性率は低いことが明らかとなった。これらの結果から SKP2 は小細胞肺癌の新規の診断マーカーとしての可能性が示唆された。

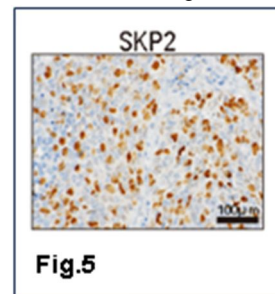


Fig.5

(2) 実際の小細胞肺癌細胞株において SKP2/CKS1B への依存度

複数の小細胞肺癌細胞株 (SBC3、HCC827、SBC3、DMS273、DMA114、H196) ならびに非小細胞肺癌細胞株 (H460、A549) において、SKP2 阻害剤を用いて抗がん剤感受性試験を行った。この結果、小細胞肺癌細胞株では非小細胞肺癌細胞株と比較して明らかに IC₅₀ の濃度が低いことが示された (Fig.6)。小細胞肺癌細胞株では SKP2 阻害剤に対して高い感受性を示し、Project Achilles による dependency と同様に SKP2 への高い依存度が確認された。

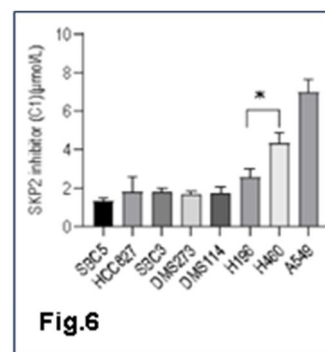


Fig.6

(3) 新たな治療標的としての可能性

Project Achilles のデータベースから小細胞肺癌で依存度の高い分子として E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成分子である SKP2/CKS1B を同定したが、小細胞肺癌細胞株において、これら SKP2/CKS1B を siRNA ならびに shRNA により阻害し抗腫瘍効果を検討した。抗がん剤感受性試験では RB1 野生型また変異型において IC₅₀ に明らかな差はなく、両者ともに SKP2 阻害剤に対して感受性であった。非常に興味深いことに、RB1 が野生型の小細胞肺癌細胞株 (DMS114) において、SKP2 をノックダウンしたところアポトーシスの誘導がみられないが、RB1 変異型の小細胞肺癌細胞株 (H196) ではアポトーシスの誘導が確認された (Fig.7)。

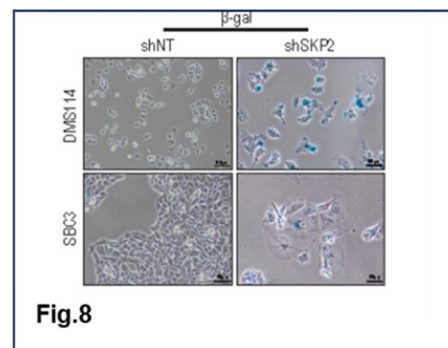


Fig.8

さらに RB1 が野生型の小細胞肺癌細胞株 (SBC3、DMS114) において ガラクトシダーゼ染色を施行したところ、SKP2 ノックダウン後に明らかに ガラクトシダーゼ染色陽性細胞が増加することが明らかになり、細胞老化が誘導されていることが示唆された (Fig.8)。これらの結果から、SKP2 の阻害は、RB1 の変異の有無により、アポトーシスまたは細胞老化が誘導されることが示唆された。

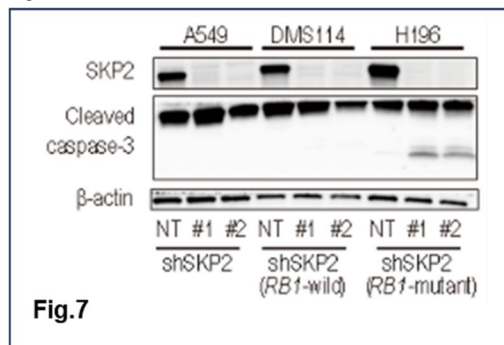


Fig.7

(4) 小細胞肺癌において SKP2/CKS1B への依存度が高いメカニズムの解明

SKP2/CKS1B を siRNA ならびに shRNA により阻害することで、抗腫瘍効果が示されたが、RB1 変異の有無によりメカニズムが異なる可能性が示された。このためどのような機序によりアポトーシスまたは老化が誘導されるのかを RB1 野生型小細胞肺癌細胞株 (DMA114) ならびに RB1 変異型小細胞肺癌細胞株 (H196) において、SKP2 をノックダウン後に SKP2 の基質であり細胞周期やアポトーシスに参与する蛋白の発現を WB により確認した (Fig.9)。しかしこれらの細胞周期ならびにアポトーシスに参与する因子の発現は一定の傾向がみられなかった。

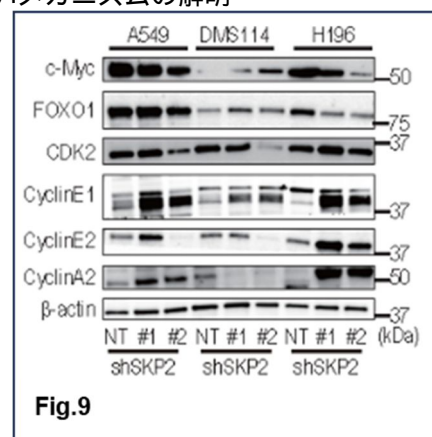


Fig.9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Aditya Wirawan, Ken Tajima, Fumiyuki Takahashi, Yoichiro Mitsuishi, Wira Winardi, Moulid Hidayat, Daisuke Hayakawa, Naohisa Matsumoto, Kenta Izumi, Tetsuhiko Asao, Ryo Ko, Naoko Shimada, Kazuya Takamochi, Kenji Suzuki, Masaaki Abe, Okio Hino, Yoshitaka Sekido, Kazuhisa Takahashi	4. 巻 20
2. 論文標題 A Novel Therapeutic Strategy Targeting the Mesenchymal Phenotype of Malignant Pleural Mesothelioma by Suppressing LSD1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 127-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-21-0230	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田島 健
2. 発表標題 Approaches to Malignant Pleural Mesothelioma by Targeting Epigenetic Modifiers
3. 学会等名 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本直久
2. 発表標題 小細胞肺癌における診断・治療標的としてのSKP2の有効性についての研究
3. 学会等名 日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2023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	高橋 和久 (Takahashi Kazuhisa) (80245711)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	眞鍋 理一郎 (Manabe Riichiro) (30280837)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 上級研究員 (82401)	
研究分担者	高橋 史行 (Takahashi Fumiyuki) (70327823)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	柳下 薫寛 (Yagishita Shigehiro) (80781674)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員 (82606)	

	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
研究協力者	松本 直久 (Matsumoto Naohisa)		

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