

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08563

研究課題名(和文)薬物療法が与える免疫原性細胞死の評価

研究課題名(英文)Immunogenic cell death by cytotoxic agents

研究代表者

笠原 寿郎 (Kasahara, Kazuo)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30272967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌培養細胞を用いて抗悪性腫瘍薬がもたらす免疫原性細胞死に関して検討した。本研究において細胞障害性抗癌薬は免疫原性細胞死をもたらさないが、細胞が死に至る過程で様々なメカニズムが働き、異なった経路をたどることが判明した。シスプラチンは直接的にアポトーシスを誘導するが、ペメトレキセドでは直接的にはアポトーシスを誘導せず異なった機序が示唆された。シスプラチンとペメトレキセド併用ではパクリタキセルでは細胞老化を抑制することが示された。多様な細胞死が誘導されることが示され、今後の免疫療法との併用の選択に有用と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において細胞障害性抗癌薬は免疫原性細胞死をもたらさないが、細胞が死に至る過程で様々なメカニズムが働き、異なった経路をたどることが判明した。シスプラチンは直接的にアポトーシスを誘導するが、ペメトレキセドでは直接的にはアポトーシスを誘導せず異なった機序が示唆された。パクリタキセルでは細胞老化を抑制することが示された。多様な細胞死が誘導されることが示され、今後の免疫療法との併用の選択に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated cell death induced by antineoplastic drugs using cultured lung cancer cell lines. In this study, we found that cytotoxic anticancer drugs do not induce immunogenic cell death, but that different mechanisms were discovered and followed by different pathways during cell death. Cisplatin directly induces apoptosis, whereas pemetrexed does not, suggesting a different mechanism. A combination of cisplatin and pemetrexed was shown to suppress cell senescence. These results indicate that various types of cell death are induced, and are thought to be useful in selecting future immunotherapy combinations.

研究分野：呼吸器腫瘍学

キーワード：免疫原性細胞死 アポトーシス 細胞老化 オートファジー

## 1、 研究開始当初の背景

肺癌薬物療法は分子標的治療、免疫療法が臨床応用されて治療成績が向上してきた。我々も免疫チェックポイント阻害薬治療が実地診療において臨床試験と同等の治療成績を示すことを報告した(Tambo et al. Clin. Lung Cancer. 2020 :e366-e379 DOI: 10.1016/j.clcc.2020.02.017)。しかしまだ改善の余地がある。ICI の効果に影響する細胞障害性抗癌剤(抗癌剤)治療の役割は十分理解されていない。我々は抗癌剤治療が免疫原性細胞死 (ICD) をはじめとする細胞死に与える影響を評価することを計画した。近年細胞死の形態にはアポトーシス、ネクロトーシスといった従来よく知られた細胞死の形状に加え、ネクロトーシス、免疫原性細胞死、オートファジー依存性細胞死、ICD などが知られるようになり、また非致命的細胞変化として Cellular senescence (細胞老化) が報告されている。抗悪性腫瘍薬が誘導する細胞死についてアポトーシスの誘導は広く知られているが、上記の様々な形態の細胞死についての知見は少ない。我々は ICD をはじめとする様々な細胞死を解析することにより、新たな知見を得ることで肺癌薬物療法をさらに進化させると仮説して研究を行った。

## 2、 研究の目的

我々の研究の目的は肺癌培養細胞株を用いて抗悪性腫瘍薬が誘導する細胞死の形態を確認することである。

## 3、 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌株を用いて解析した。ICD は免疫応答を誘発するあらゆるタイプの細胞死である。ICD は損傷関連分子パターン( Damage-associated molecular patterns, DAMPs ) の分泌によって特徴付けられる。ICD の解析としてこれらの測定を Western blot 法、ELISA を用いて解析した。

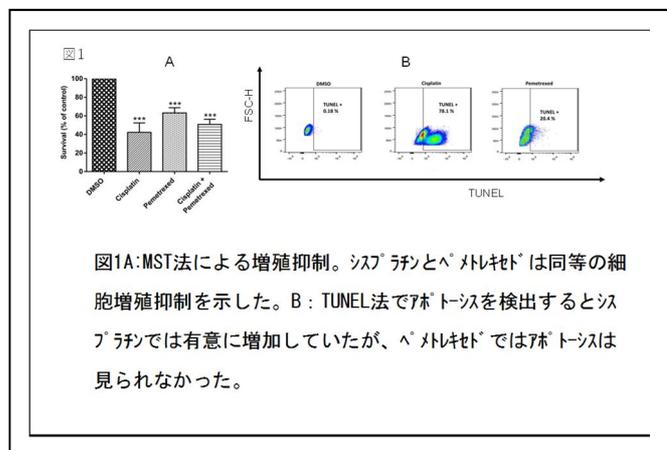
(2) アポトーシスをフローサイトメータ、Tunel 染色、PARP や Caspase 3,9 といった関連パクの Western blot 法で測定した。

(3) Cellular senescence を SA-β-Galactosidase (SA-β-Gal) を指標に評価した。

(4) オートファジーを Atg8(LC3)、AMPK を Western Blot 法で測定した。

## 4、 研究成果

(1) ICD を評価するためにシスプラチン、ペメトレキセド、パクリタキセル、ゲフィチニブの抗悪性腫瘍薬を用いた。各種薬剤の暴露後に CRT、HMGB1 には変化が見られなかった。解析の経過の中でアポトーシスの評価を同時に行ったところ興味深いことにシスプラチン、パクリタキセルではアポトーシスを誘導されたが、ペメトレ



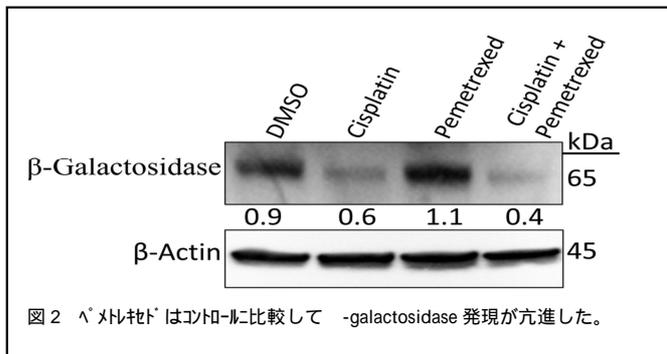


図2 ペメトレキセドはコントロールと比較して β-galactosidase 発現が亢進した。

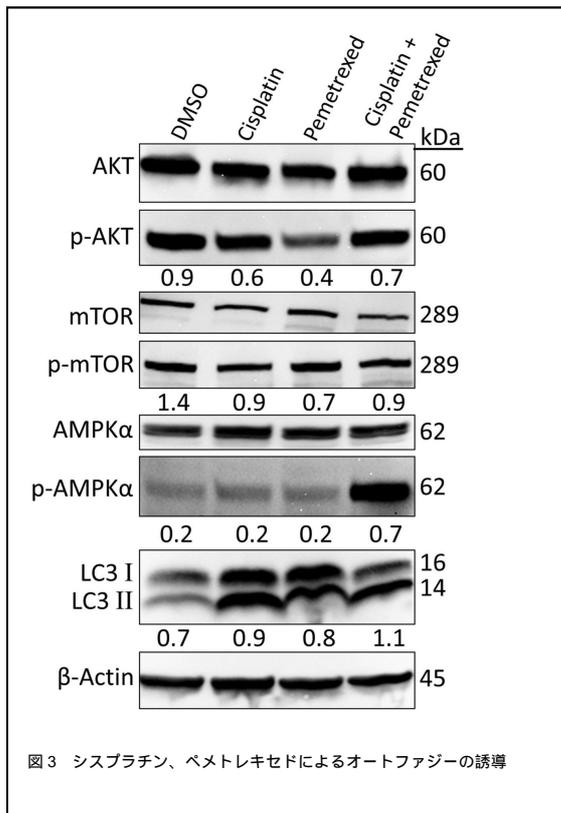


図3 シスプラチン、ペメトレキセドによるオートファジーの誘導

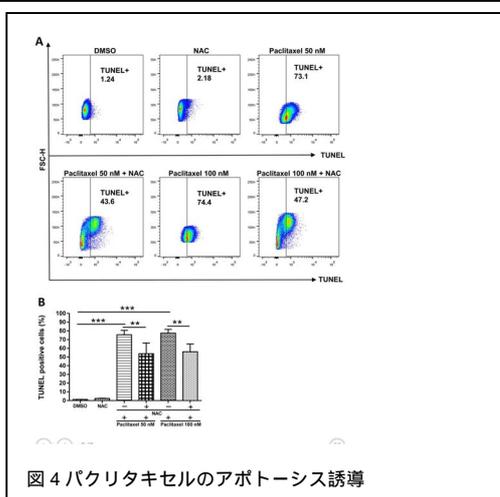


図4 パクリタキセルのアポトーシス誘導

キセドではアポトーシスは誘導されなかった(図1)。細胞老化のマーカーである SA-β-Gal 発現はシスプラチンでは低下したものの、ペメトレキセドでは亢進していた(図2)(M. Mohiuddin and K. Kasahara. Cancer Genomics Proteomics 2021. 18(4) 579)。この所見はペメトレキセドの作用機序には細胞老化を介した可能性が考えられる。抗癌剤によ

って細胞増殖の機序が異なる(アポトーシスか、それ以外か)可能性を示唆するものと考えられる。また一方で耐性に関する可能性も示唆された。

(2) シスプラチン、ペメトレキセドがオートファジーに与える影響

オートファジーは細胞死を誘導する面と細胞死に対して耐性に働く二面性を持つとされている。シスプラチンとペメトレキセドではアポトーシス誘導能に大きな変化があったことからオートファジーについても検討した(図3)。mTOR や LC3 には大きな変化は見られなかったが、リン酸化 AMPK は両薬剤を併用した場合に発現が大きくみられた。この変化は临床上両薬剤の併用療法の有用性が高いことの説明となるかもしれない。

(3) パクリタキセルと cellular senescence、オートファジー

ここまでシスプラチン、ペメトレキセドの細胞死の機序について研究してきたが、他の抗癌薬としてパクリタキセルについて解析した。パクリタキセルで最も興味深い知見は Cellular senescence に与える影響であった。パクリタキセルもシスプラチンと同様に強くアポトーシスを誘導したが(図4)、パクリタキセルは SA-β-Gal を強く抑制した(図5)。この所見はシスプラチン、ペメトレキセドいずれと

も異なる所見であり、新規の知見と考えられる。

5, 考察と結論として、細胞障害性抗癌薬(シスプラチン、ペメトレキセド、パクリタキセル)は従来の知見以外にも細胞内に大きな変化をもたらしており、それぞれに特徴があることが判明した。Cellular senescence やオートファジーが細胞障害性に働くか、薬剤耐性に働くかもその他の環境によって異なることが示唆された。

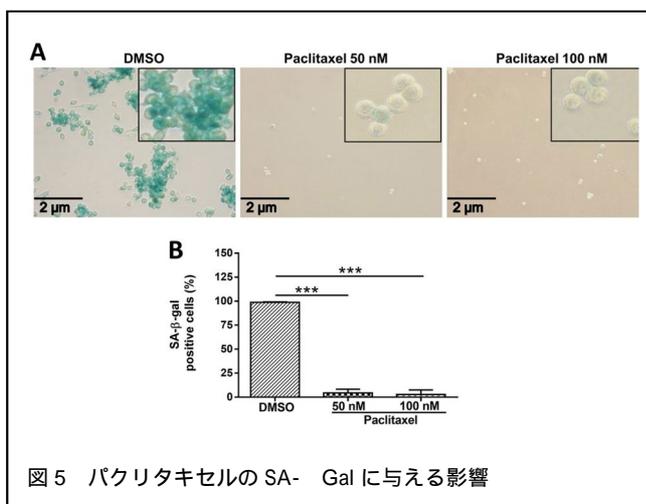


図5 パクリタキセルの SA-β-Gal に与える影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0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 MOHIUDDIN MD, KASAHARA KAZUO	4. 巻 41
2. 論文標題 Pemetrexed Disodium Heptahydrate Induces Apoptosis and Cell-cycle Arrest in Non-small-cell Lung Cancer Carrying an EGFR Exon 19 Deletion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2963 ~ 2977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15078	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 MOHIUDDIN MD, KASAHARA KAZUO	4. 巻 18
2. 論文標題 Cisplatin Activates the Growth Inhibitory Signaling Pathways by Enhancing the Production of Reactive Oxygen Species in Non-small Cell Lung Cancer Carrying an EGFR Exon 19 Deletion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 471 ~ 486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20273	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 MOHIUDDIN MD, KASAHARA KAZUO	4. 巻 18
2. 論文標題 Cisplatin and Pemetrexed Have Distinctive Growth-inhibitory Effects in Monotherapy and Combination Therapy on <i>KRAS</i>-dependent A549 Lung Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 579 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20282	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 MOHIUDDIN MD, KASAHARA KAZUO	4. 巻 18
2. 論文標題 Paclitaxel Impedes EGFR-mutated PC9 Cell Growth <i>via</i> Reactive Oxygen Species-mediated DNA Damage and EGFR/PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 645 ~ 659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20287	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 MOHIUDDIN MD, KASAHARA KAZUO	4. 巻 18
2. 論文標題 The Mechanisms of the Growth Inhibitory Effects of Paclitaxel on Gefitinib-resistant Non-small Cell Lung Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 661 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cgp.20288	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 Matsuoka Hiroki, Araya Tomoyuki, Kita Toshiyuki, Terada Nanao, Yamamura Kenta, Nishikawa Shingo, Tambo Yuichi, Sone Takashi, Kimura Hideharu, Ooi Akishi, Kasashima Satomi, Kawashima Atsuhiko, Kasahara Kazuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Suitability of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration versus Paired Transbronchial Biopsy Specimens for Evaluating Programmed Death Ligand-1 Expression in Stage III and IV Lung Cancer: A Comparative Retrospective Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 4478 ~ 4487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.55738	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 Koba Hayato, Kimura Hideharu, Yoneda Taro, Sone Takashi, Ohkura Noriyuki, Hara Johsuke, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Kasahara Kazuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular features of tumor-derived genetic alterations in circulating cell-free DNA in virtue of autopsy analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-87094-1	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 Koba Hayato, Kimura Hideharu, Yoneda Taro, Ogawa Naohiko, Tanimura Kota, Tambo Yuichi, Sone Takashi, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Kasahara Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 NOTCH alteration in EGFR-mutated lung adenocarcinoma leads to histological small-cell carcinoma transformation under EGFR-TKI treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4161 ~ 4173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-21-536	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0件

〔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	曾根 崇  (Sone Takashi)  (30420334)	金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授   (13301)	
研究分担者	木村 英晴  (Kimura Hideharu)  (40444202)	金沢大学・附属病院・講師   (13301)	

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