

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09175

研究課題名（和文）FOX M1を介した肺癌の抗癌剤耐性メカニズムの解明と耐性の克服

研究課題名（英文）Elucidation of anticancer drug resistance mechanism of lung cancer through FOX M1

研究代表者

大瀧 容一（Ohtaki, Yoichi）

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00625402

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）：化学療法耐性株ではFOX M1発現が上昇しており、FOX M1の抑制で殺細胞性抗がん剤の感受性が改善した。小細胞肺癌（SCLC）では非小細胞肺癌に比較しFOX M1の発現が高いことが示されていることから、SCLCとFOX M1発現の関連について着目した。SCLCの4つのサブタイプのうち、NeuroD1 typeでFOX M1発現が高かった。外科切除検体ではASCL1やNeuroD1などの神経内分泌的特性の高い検体でもFOX M1発現が高かった。FOX M1は殺細胞性抗がん剤の耐性に関与し、特にHGNECのASCL1やNeuroD1などの神経内分泌的特性の高い腫瘍で効果が高い可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果により、FOX M1は殺細胞性抗がん剤の耐性に寄与しており、FOX M1の阻害によって抗がん剤耐性を改善できる可能性が示された。肺癌の中で、特に新規治療法の開発が遅れている高悪性度神経内分泌癌での治療標的としてのFOX M1の有用性が明らかとなった。本研究は高悪性度神経内分泌癌に対する新規標的治療の基礎的データとして価値をもつものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the transcription factor FOX M1 to elucidate the mechanism by which lung cancer cells become resistant to cytotoxic anticancer drugs. FOX M1 expression was upregulated in the resistant lines, and FOX M1 suppression using shRNA improved sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. Since previous data have shown that FOX M1 expression is higher in small cell lung cancer (SCLC) than in non-small cell lung cancer, we focused on the relationship between SCLC and FOX M1 expression. FOX M1 expression was significantly higher in NeuroD1 type cell lines of high-grade neuroendocrine carcinoma (SCLC+LCNEC). FOX M1 expression was also high in specimens with high neuroendocrine characteristics, such as ASCL1 and NeuroD1. Thus, FOX M1 is involved in the resistance to cytotoxic anticancer drugs and may be especially effective in tumors with high neuroendocrine characteristics such as ASCL1 and NeuroD1 in HGNECs.

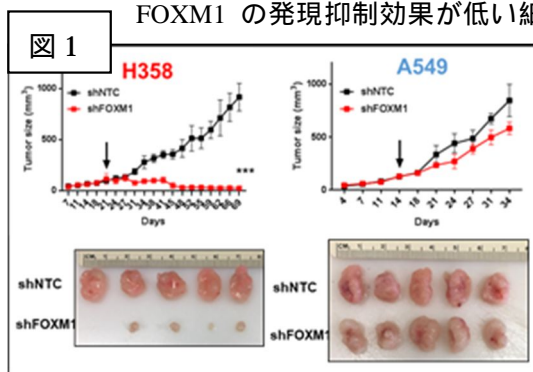
研究分野：呼吸器悪性腫瘍

キーワード：原発性肺癌 FOX M1 小細胞肺癌

1. 研究開始当初の背景

近年肺癌に対しては、様々な分子標的治療薬の出現により、IV期の症例や再発症例でも長期生存が望めるようになってきた。一方で、EGFR 遺伝子や ALK 遺伝子といったドライバー遺伝子の変異や転座がない症例も多く、ドライバー変異を有している EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)や ALK-TKI が適応となる症例でも、いずれは耐性を獲得してしまう。また、免疫チェックポイント阻害剤(ICI)も肺癌に対する抗腫瘍効果が高い症例がある一方で、その割合は 20%程度と高くない。ドライバー遺伝子の関与がない症例や ICI 無効例を含めた肺癌の多くの症例では、従来の細胞障害性抗がん剤の対腫瘍効果が予後を規定する因子である。

FOXM1 (Forkhead box protein M1)は、Forkhead スーパーファミリーに属する転写因子で、その発現は、39 種類のヒトがん組織にわたる横断的網羅的生存解析で、最も予後不良に關与する分子であることが明らかとなった。FOXM1 は腫瘍組織のみに発現しており、機能としては、細胞周期の調整(G1/S, G2/M 移行)や DNA damage repair をはじめとして、上皮間葉移行や、浸潤、血管新生、腫瘍新生など Cancer Hallmarks の多くに關連することが知られている。申請者の先行研究では、short hairpin RNA による FOXM1 発現の抑制により肺癌細胞株の増殖およびマウス皮下移植腫瘍の増殖抑制効果を示した(図 1)。一方で



細胞も認め、これらの差異は下流の cell cycle genes(CCNA2, CCNB1)へのシグナルの違いによることを明らかにした。

1. 研究の目的

本研究では、細胞障害性抗がん剤や TKI 治療と FOXM1 阻害の併用による抗腫瘍効果の相乗効果を実証し、肺癌治療の臨床において抗がん剤の効果を高め、転移・再発肺癌症例の予後改善を目的とし、そのために下記実験を行うこととした。

- (1) 肺癌細胞での細胞障害性抗がん剤および TKI 治療後に FOXM1 の発現は変化するか？
- (2) FOXM1 の阻害により薬剤感受性は改善するか？
- (3) FOXM1 阻害が抗がん剤耐性克服に關与するメカニズム・pathway はどのようなものか？

2. 研究の方法

- (1) in vitro assay による FOXM1 阻害による薬剤耐性評価として殺細胞性抗がん剤耐性の肺癌細胞株における FOXM1 発現を親株と比較した。
- (2) 殺細胞性抗がん剤耐性株に shRNA を遺伝子導入して FOXM1 をノックダウンし、薬剤の感受性の変化について CCK assay で評価した。
- (3) HGNEC の細胞株および切除検体についてサブタイプと FOXM1 発現の相関を検討した。

3. 研究成果

まず、肺癌細胞株 H1299 に、殺細胞性抗がん剤 (CBDCA+PTX) を長期曝露し耐性を持った肺癌細胞株 H1299-T18 を作成した。この耐性株 H1299-T18 では、FOXM1 発現が上昇していた(図 2)。殺細胞性抗がん剤(PTX)の感受性について CCK assay で評価を行ったところ、shRNA を用いて FOXM1 発現の抑制を行った場合に、H1299 の親株で IC50 が低下し、抗がん剤感受性が上昇していることが改善していることがわかった(図 3)。さらに、耐性株 H1299-T18 においても FOXM1 の抑制により PTX の感受性が改善していた。以上より FOXM1 抑制による殺細胞性抗がん剤の効果改善が示された。

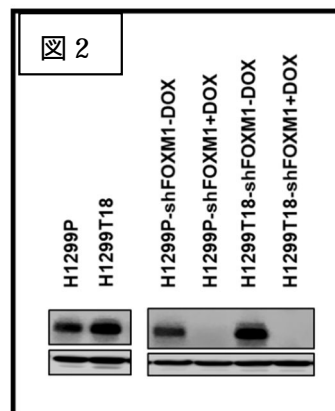
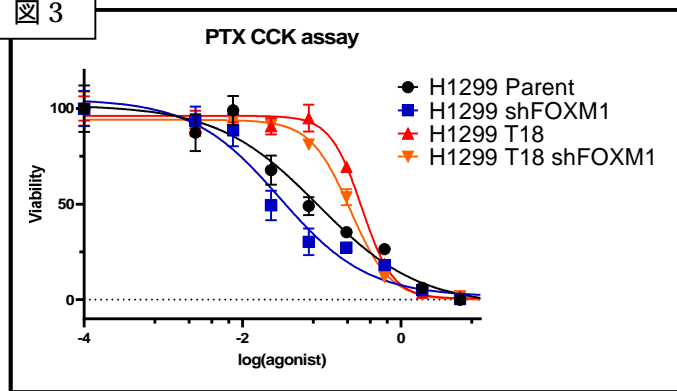


図 3



一方で、これまでの文献的なデータから小細胞肺癌(SCLC)などの高悪性度内分泌癌(HGNEC)では、非小細胞肺癌(NSCLC)に比較し FOXM1 の発現が高いことが示されていること、から HGNEC における FOXM1 発現に着目することとした。さらに、近年 SCLC は転写因子の発現別で ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1 の4つのサブタイプに分類されることが明らかとなっていることを考慮し、このサブタイプと FOXM1 発現、その阻害効果について検討を行うこととした。

HGNEC 細胞株について、ASCL1, NeuroD1, POU2F3, YAP1 の4つのサブタイプ別に、FOXM1 の発現を確認したところ、FOXM1 発現は、特に NeuroD1 type の細胞株で高発現が認められた。一方で、HGNEC の切除検体約 200 例について、免疫組織化学染色で FOXM1 と各サブタイプについて解析をしたところ、NeuroD1 に加え ASCL1 などの神経内分泌的特性の高い検体で FOXM1 発現が高いことが示された。ゆえに FOXM1 は HGNEC のサブタイプとの関連を認めた。

SCLC において、FOXM1 阻害剤単剤では抗腫瘍効果は高いとは言えなかったため、他の抗腫瘍薬との併用効果を期待し、ATR や Chk1 などの DNA ダメージ修復関連因子の阻害剤の併用を行ったが、これらの併用でも抗腫瘍効果はそれほど高くなかった。

以上から、本研究において、FOXM1 は肺癌で高く発現しており、殺細胞性抗がん剤の感受性・耐性に関与していること、HGNEC で新規治療標的となりうる可能性があることを示した。残念ながら現時点で、臨床的な効果が示された FOXM1 阻害薬は存在せず今後は、新規の FOXM1 阻害剤開発の観点からも研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ohtaki Yoichi, Kaira Kyoichi, Yajima Toshiki, Erkhem Ochir Bilguun, Kawashima Osamu, Kamiyoshihara Mitsuhiro, Igai Hitoshi, Onozato Ryoichi, Ibe Takashi, Kosaka Takayuki, Nakazawa Seshiru, Nagashima Toshiteru, Oyama Tetsunari, Shirabe Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive expressional analysis of chemosensitivity related markers in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2666-2679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14102	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 -

1. 著者名 Ohtaki Y, Kawabata-Iwakawa R, Nobusawa S, Goto Y, Shimizu K, Yajima T, Nakazawa S, Kawatani N, Yoshida Y, Sano T, Shirabe K.	4. 巻 61
2. 論文標題 Molecular and expressional characterization of tumor heterogeneity in pulmonary carcinosarcoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Carcinog.	6. 最初と最後の頁 924-932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.23448.	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	矢島 俊樹 (Yajima Toshiki) (20346852)	香川大学・医学部・教授 (16201)	
研究分担者	横堀 武彦 (Yokobori Takehiko) (60420098)	群馬大学・未来先端研究機構・准教授 (12301)	

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	川端 麗香 (Kawabata Reika) (90721928)	群馬大学・未来先端研究機構・講師 (12301)	

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