

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16370

研究課題名(和文) シングルセル解析から解き明かすEGFR変異陽性肺がんの薬剤耐性変異獲得メカニズム

研究課題名(英文) Elucidating molecular mechanisms of anti-cancer drug resistance of EGFR mutation-positive lung cancer by using single-cell technology

研究代表者

瀬戸 陽介 (SETO, Yosuke)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 基礎研究部・研究員

研究者番号：50738614

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活性化変異陽性肺がん患者への治療にはEGFRを標的としたEGFR阻害剤が劇的な治療効果をもたらしてきたが、薬剤耐性変異獲得によるがんの再発が大きな問題となっている。本研究では、EGFR活性化変異陽性肺がんにおける薬剤耐性変異獲得のメカニズムを解明するために患者由来の細胞を用いてシングルセルRNA-seqやシングルセルATAC-seqを行った。その結果、耐性変異獲得前のがん細胞ではEGFR阻害剤に対する炎症応答が生存に関与している可能性が示された。また、治療前がん細胞集団にがん不均一性が存在し、薬剤耐性変異獲得の過程で塩基の置換パターンが変化していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんにおける分子標的薬を用いた治療は劇的な治療効果をもたらすが、治療数年内に薬剤耐性変異の出現が起こることが臨床で大きな問題となっている。しかしながら、耐性変異獲得に至るがん進化メカニズムはほとんど明らかとなっていない。本研究により、治療前がん細胞集団から薬剤耐性変異獲得の過程で塩基置換パターンが変化することやその変化にかかわる可能性のある遺伝子の発現、さらに、耐性変異獲得前のがん細胞では、薬剤存在下での生存に炎症応答が関与していること示唆され、がん進化プロセスを理解する上で重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：EGFR molecular-targeted drugs (EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI)) are treated for activating EGFR mutation-positive non-small cell lung cancers (NSCLCs). However, acquired resistance after initial clinical response is widely observed. To elucidate mechanisms of emergence of the drug resistance against EGFR-TKI, we conducted single-cell (sc) RNA-seq, scATAC-seq using EGFR mutation-positive NSCLC patient-derived cancer cells (PDCs). In this study, we found that NF-kappa B mediated inflammatory response may play an important role in survival under EGFR-TKI treatment. We further found tumor heterogeneity in the PDC populations and T790M resistance mutation-positive PDC-specific nucleotide substitution pattern (e.g. higher C-to-T mutation). These results suggested that the mutational pattern was changed during the process of the emergence of drug-resistance mutation.

研究分野：分子進化

キーワード：シングルセル解析 薬剤耐性 肺がん

1. 研究開始当初の背景

肺がんは最も死亡者数が多く、アジアにおける肺がん患者の約半数は上皮成長因子受容体遺伝子 (EGFR) のチロシンキナーゼドメインに生じる活性化変異によって引き起こされる。EGFR 活性型変異陽性の肺がんの治療薬として、EGFR を分子標的とした EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) が用いられ、劇的な腫瘍の縮小と生存期間の大幅な延長をもたらしてきた。しかしながら、少数のがん細胞が薬剤抵抗性を示し、その中から、これら分子標的薬に耐性を持つがんの再発が起こることが臨床上で大きな問題となっている。

EGFR-TKI であるゲフィチニブやエルロチニブによる治療における薬剤耐性の獲得メカニズムの一つとして、EGFR の 790 番目のアミノ酸がスレオニンからメチオニンへ変わる T790M 薬剤耐性変異の獲得が知られている。さらに、T790M 耐性変異肺がん患者に抗腫瘍効果を示すオシメルチニブを用いた治療では、EGFR の 797 番目のアミノ酸がシステインからセリンに変化する C797S 耐性変異の出現が知られている。T790M 変異はゲフィチニブやエルロチニブを用いた治療における薬剤耐性再発肺がん患者の約 50~60% を占め、C797S 変異はオシメルチニブを用いた治療における薬剤耐性再発肺がん患者の約 10~30% を占める。なぜ特定の薬剤耐性変異がこれほど高頻度に出現するのか、そのメカニズムはほとんど分かっていない。

これまでの研究から、突然変異率は遺伝子の発現量やゲノム中のエピジェネティックマーカーと相関することが報告されており、発現量の高い遺伝子やヒストンのアセチル化によって起こるオープンクロマチン領域は突然変異率が低く、一方で、CG 配列におけるメチル化シトシンは、C から T への塩基置換のホットスポットとなっている。以上のことから、薬剤治療下におけるがん細胞の薬剤抵抗性のメカニズムを解明し、薬剤耐性変異獲得に至るがん進化プロセスを分子レベルで理解することは非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR 活性化変異陽性肺がん患者由来細胞を用いて、薬剤治療下におけるがん細胞の薬剤抵抗性のメカニズムを解明し、さらに、遺伝子発現パターンやクロマチン構造と突然変異のパターンの間に相関があるかどうか調べることで、エピジェネティックな遺伝子発現制御が遺伝的な耐性変異獲得の原動力となっているかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

治療前の EGFR 活性化変異陽性肺がん患者由来のがん細胞集団 (治療前細胞群) と、そこから実験的に樹立し、T790M 耐性変異を持たない薬剤耐性細胞株 (薬剤耐性細胞群)、そして実臨床での EGFR-TKI 治療によって出現した T790M 耐性変異陽性細胞集団 (T790M 変異細胞群) を用い、EGFR-TKI であるエルロチニブを経時的に処理することで、エルロチニブに応答する遺伝子発現とオープンクロマチン領域の変動をシングルセル RNA-seq やシングルセル ATAC-seq により調べた。シングルセル RNA-seq では薬剤耐性細胞群にエルロチニブを 24 時間、4 日間、7 日間と経時的に処理を行い、シングルセル ATAC-seq では治療前細胞群と薬剤耐性細胞群にエルロチニブを 24 時間、4 日間処理を行ったものを用いた。さらに、突然変異パターンとエピジェネティックなゲノム構造の変化に相関があるかどうか調べるため、linked-read 合成ロングリード解析に基づいてゲノムワイドな変異検出を行い、シングルセル解析のデータから得られる変異情報と比較した。

4. 研究成果

シングルセル RNA-seq とシングルセル ATAC-seq による遺伝子発現解析から、耐性変異獲得前の薬剤耐性細胞株ではエルロチニブ処理時間に依存して細胞集団が大きく変化することを明らかとした。耐性変異獲得前の薬剤耐性細胞株はエルロチニブ存在下で上皮間葉転換 (EMT) 様の形態変化を起こすことが分かっており、シングルセル解析の結果は観察される形態的变化を反映するものだった。また、それぞれのがん細胞集団はより細かなクラスターに分けられることからがん不均一性の存在も確認された (図 1、図 2)。これら薬剤耐性細胞株では、エルロチニブ処理の初期では抗アポトーシス応答や小胞体ストレス応答に関わる遺伝子群が発現上昇し、また、エルロチニブ処理 4 日間から 7 日

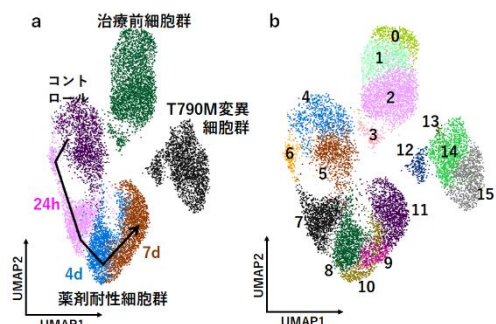


図1. シングルセルRNA-seqデータを用いた(a)薬剤処理群ごとのクラスタリングと(b)より詳細なクラスタリング。矢印はEGFR-TKI 処理時間 (24時間: 24h、4日間: 4d、7日間: 7d) に依存した薬剤耐性細胞群の分化の向きを表す。

間では細胞骨格形成に関わる遺伝子群の発現上昇が観察され、EMTはエルロチニブ処理4日後に引き起こされていることがGene Ontology (GO) 解析から明らかとなった。さらに、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)により耐性変異獲得前の薬剤耐性細胞株はエルロチニブ処理下では細胞分裂が停止すること、そして、TNFAシグナルが活性化していることが明らかとなった。同様に、シングルセルATAC-seqではNFkBファミリーの活性化が観察され、炎症応答が耐性変異獲得前の薬剤耐性に重要な役割を果たしていることが示唆された(図3)。これらのNFkBファミリーの活性化は治療前がん細胞集団やがん再発細胞集団であるT790M変異細胞群でも観察され、実臨床でのがん再発の過程においても重要な役割を担っていた可能性が示された(図4)。

次に、シングルセルATAC-seqデータからオープンクロマチン領域の変異解析を行った結果、治療前がん細胞集団と比較してT790M変異細胞群ではCからTへの変異が増加していることが、一方で、CからA、CからGへの変異が減少していることが明らかとなった(図5a)。T790M変異はEGFR遺伝子の2369番目の塩基のC>T変異により生じることが分かっており、薬剤治療の過程でのがん細胞集団における突然変異パターンの変化がT790M耐性変異の出現を誘導した可能性が示された。さらに、本研究では突然変異パターンとエピジェネティックなゲノム構造の変化に相関があるかどうか調べるために、linked-reads合成ロングリード解析を用いてゲノムワイドな変異解析を行い、オープンクロマチン領域以外のゲノム領域(クロズドクロマチン領域と想定)の変異を検出した。それぞれを比較した結果、オープンクロマチン領域でCからGの変異が、クロズドクロマチン領域でTからAの変異が高くなっていることが明らかとなった(図5b)。この結果は、薬剤治療の過程においてがん細胞集団で突然変異パターンが変化してきたことによりT790M耐性変異が出現した可能性を示唆している。以上より、本研究によりエピジェネティックなゲノム構造の変化がゲノムに生じる突然変異パターンに影響を与える可能性が示唆され、薬剤治療下における薬剤耐性変異の出現に至るがん進化プロセスを分子レベルで理解する上で重要な知見が得られた。

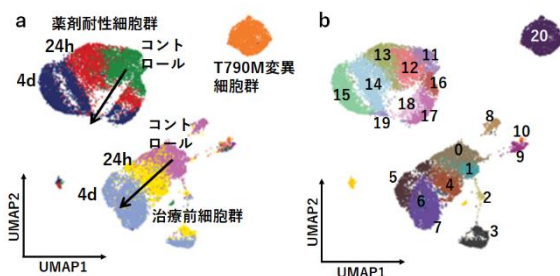


図2、シングルセルATAC-seqデータを用いた(a) 薬剤処理群ごとのクラスタリングと(b)より詳細なクラスタリング。矢印はEGFR-TKI 処理時間(24時間: 24h、4日間: 4d)に依存した薬剤耐性細胞群の分化の向きを表す。

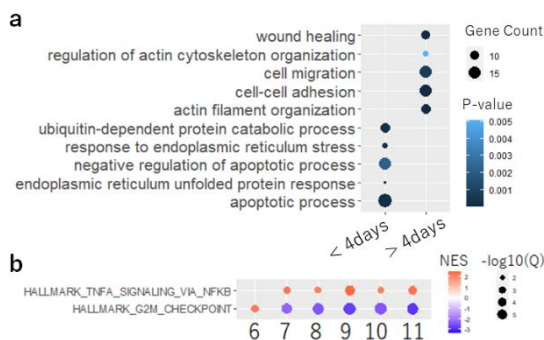


図3、シングルセルRNA-seqにおける(a) エルロチニブ4日間処理前後 (< 4 days, > 4 days) のGO解析と(b) クラスターごとのGSEAの結果。

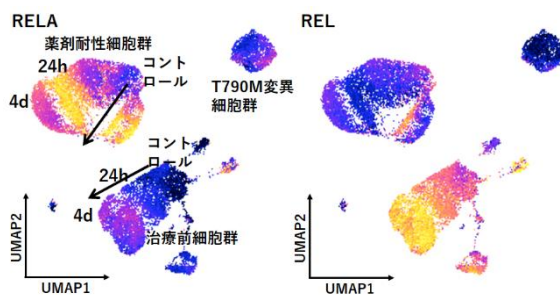


図4、シングルセルATAC-seqで観察されたNFkBファミリーであるRELAとRELの活性化。

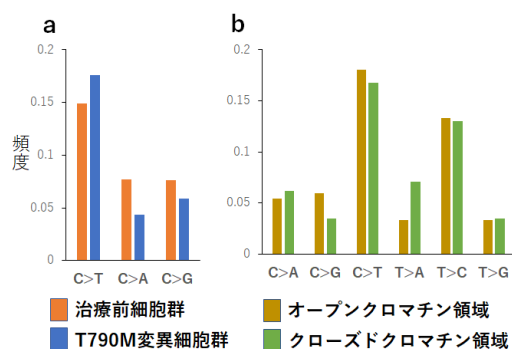


図5、(a) 治療前細胞群とT790M変異細胞群での突然変異パターンの違いと(b) 治療前細胞群におけるクロマチン構造による突然変異パターンの違い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takahashi Ken, Seto Yosuke, Okada Koutaroh, Uematsu Shinya, Uchibori Ken, Tsukahara Mika, Ohhara Tomoko, Fujita Naoya, Yanagitani Noriko, Nishio Makoto, Okubo Kenichi, Katayama Ryohei	4. 巻 11
2. 論文標題 Overcoming resistance by ALK compound mutation (I1171S + G1269A) after sequential treatment of multiple ALK inhibitors in non small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 581 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13299	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 Yoshizawa Takahiro, Uchibori Ken, Araki Mitsugu, Matsumoto Shigeyuki, Ma Biao, Kanada Ryo, Seto Yosuke, Oh-hara Tomoko, Koike Sumie, Ariyasu Ryo, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Takeuchi Kengo, Yanagitani Noriko, Takagi Satoshi, Kishi Kazuma, Fujita Naoya, Okuno Yasushi, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 5
2. 論文標題 Microsecond-timescale MD simulation of EGFR minor mutation predicts the structural flexibility of EGFR kinase core that reflects EGFR inhibitor sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	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/s41698-021-00170-7	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 Takagi Satoshi, Sasaki Yuki, Koike Sumie, Takemoto Ai, Seto Yosuke, Haraguchi Mizuki, Ukaji Takao, Kawaguchi Tokuchi, Sugawara Minoru, Saito Masanori, Funauchi Yuki, Ae Keisuke, Matsumoto Seiichi, Fujita Naoya, Katayama Ryohei	4. 巻 40
2. 論文標題 Platelet-derived lysophosphatidic acid mediated LPAR1 activation as a therapeutic target for osteosarcoma metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5548 ~ 5558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01956-6	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 Tachiwana Hiroaki, Dacher Mariko, Maehara Kazumitsu, Harada Akihito, Seto Yosuke, Katayama Ryohei, Ohkawa Yasuyuki, Kimura Hiroshi, Kurumizaka Hitoshi, Saitoh Noriko	4. 巻 10
2. 論文標題 Chromatin structure-dependent histone incorporation revealed by a genome-wide deposition assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	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) 10.7554/eLife.66290	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 Sagawa Ray, Sakata Seiji, Gong Bo, Seto Yosuke, Takemoto Ai, Takagi Satoshi, Ninomiya Hironori, Yanagitani Noriko, Nakao Masayuki, Mun Mingyon, Uchibori Ken, Nishio Makoto, Miyazaki Yasunari, Shiraishi Yuichi, Ogawa Seishi, Kataoka Keisuke, Fujita Naoya, Takeuchi Kengo, Katayama Ryohei	4. 巻 7
2. 論文標題 Soluble PD-L1 works as a decoy in lung cancer immunotherapy via alternative polyadenylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	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) 10.1172/jci.insight.153323	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀬戸陽介、藤田直也、片山量平
2. 発表標題 シングルセルレベルで解き明かすがんの薬剤耐性の分子メカニズム
3. 学会等名 日本進化学会第23回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬戸陽介、藤田直也、片山量平
2. 発表標題 シングルセル技術を用いたがんの薬剤耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Seto, Naoya Fujita, Ryohei Katayama
2. 発表標題 EGFR-TKI tolerant mechanisms of non-small cell lung cancer revealed by single-cell technologies
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

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