

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08889

研究課題名（和文）非小細胞肺癌におけるドライバー遺伝子と細胞周期関連遺伝子を標的とした治療開発

研究課題名（英文）Targeting cell cycle-related genes in non-small cell lung cancer harboring driver mutations

研究代表者

小副川 敦 (Osoegawa, Atsushi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：90432939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：EGFR変異陽性肺癌切除症例におけるcyclinD1の発現と予後との関連を明らかにすること、EGFR変異陽性肺癌細胞株におけるEGFR-TKIとCDK4/6阻害剤の併用効果を検討することを目的とし、臨床検体、細胞株を用いて解析を行った。細胞株では、併用による相乗効果を認め、シグナル伝達経路、細胞周期の変化から説明可能であったが、臨床検体では、Cyclin D1高発現は、女性、非喫煙者に多い傾向が認められ、CyclinD1高発現群は低発現群より予後がよい傾向が認められた。肺癌ではcyclin D1の他に悪性度に関与している治療標的が存在すると考えられ、ER が関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮成長因子受容体(EGFR)変異陽性肺癌では、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)が奏効するが、進行再発症例においては約1.5年で耐性となるため、初期治療の強化が必要である。EGFR変異陽性肺癌では、細胞周期の異常を高頻度に認めるため、乳癌で広く用いられているCDK4/6阻害剤の併用効果を検討し、細胞株においてはEGFR-TKIとCDK4/6阻害剤の相乗効果と、その機序を明らかにした。一方、その標的であるcyclin D1は肺癌において予後良好な集団に発現しており、cyclin D1以外の標的を明らかにする必要がある。これらを明らかにしたことは学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We conducted analyses using clinical specimens and cell lines to investigate the association between cyclin D1 expression and prognosis in cases of surgically resected EGFR-mutant positive lung cancer, and to examine the combined effects of EGFR-TKI and CDK4/6 inhibitors in EGFR-mutant positive lung cancer cell lines. In cell lines, a synergistic effect of the combination was observed, which could be explained by changes in signaling pathways and cell cycle. However, in clinical specimens, high expression of cyclin D1 was more commonly found in females and non-smokers, and the group with high cyclin D1 expression tended to have a better prognosis than the low expression group. It is considered that, in lung cancer, there are other therapeutic targets involved in malignancy besides cyclin D1, and ER may be involved.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：上皮成長因子受容体 細胞周期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌は、1 次治療として第 3 世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブの単剤療法が奏効し、約 1.5 年の無増悪生存が示されている。

しかし、有効な 2 次治療がないため、治療成績の向上には薬剤併用療法を主体とした 1 次治療の強化が重要と考えられる。CDK4/6 阻害剤は細胞周期を標的とした初めての薬剤で、ホルモン受容体がドライバーである乳癌において内分泌療法との相乗効果が示されている。

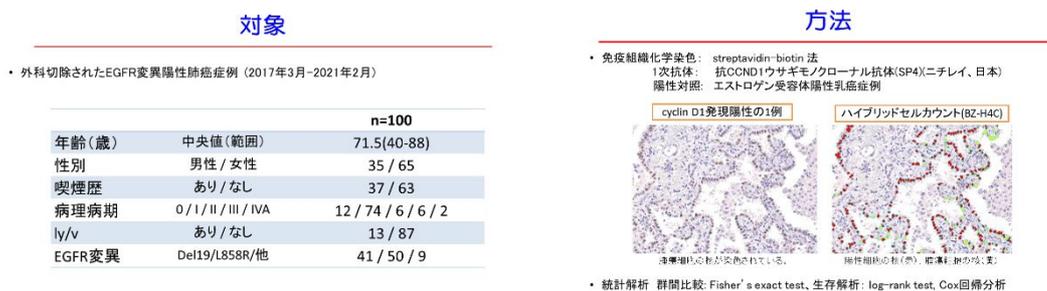
### 2. 研究の目的

本研究では、ドライバー陽性肺癌の臨床検体や PD0 を用いた薬剤併用試験を通じて、細胞周期を標的とした薬剤併用の効果と、そのシグナル伝達阻害メカニズムを解明し、新たな治療戦略の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

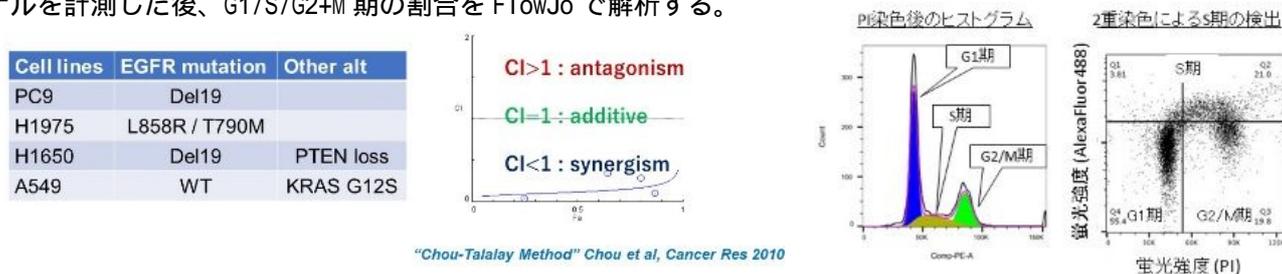
EGFR 変異陽性肺癌切除症例における cyclinD1 の発現と臨床病理学的背景や予後との関連を明らかにすること、EGFR 変異陽性肺癌細胞株における EGFR-TKI と CDK4/6 阻害剤の併用効果を検討することを目的とし、以下の解析を行う。

(1)EGFR 変異陽性肺癌切除症例 100 例に対し、Cyclin D1 免疫組織化学染色を行う。スライドの腫瘍組織を顕微鏡で撮影、解析ソフトウェア(BZ-H4C)を用いて陽性細胞数を自動計算する。計算後、各画像は目視で確認、補正し、Cyclin D1 の発現と臨床病理学的背景因子との関連を検討する。



(2)EGFR 変異陽性肺細胞株(H1650、H1975、PC9)に Abemaciclib (CDK4/6 阻害剤)と Osimertinib (EGFR-TKI) を単剤、または併用して投与し、細胞増殖抑制曲線からその相乗効果を明らかにする。薬剤投与によるシグナル伝達経路の変化や、相乗効果の機序について、蛋白解析を行い明らかにする。

さらに、細胞周期の変化を PI と EdU による 2 重染色を行い、フローサイトメーターで蛍光シグナルを計測した後、G1/S/G2+M 期の割合を FlowJo で解析する。

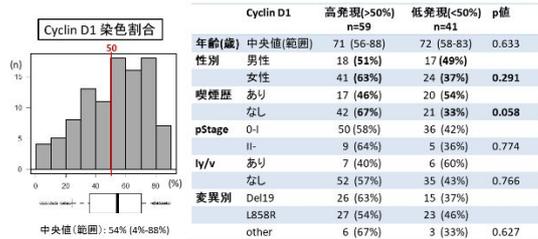


(3)cyclin D1 発現が女性、非喫煙者に多く、予後良好であったことから、エストロゲン受容体経路とのクロストークについて解析を行うこととし、肺癌細胞株 A549(EGFR 野生型), H1975, H1650, HCC827(EGFR 変異型)、乳癌細胞株 MCF7(ER 陽性)を用い、cyclin D1 と ER / の蛋白発現を解析した。A549, H1975, MCF7 における、エストラジオール(E2)投与下の細胞増殖曲線の変化を MTT アッセイにより検討し、その際のシグナル伝達の変化をウェスタンブロットングにより評価した。

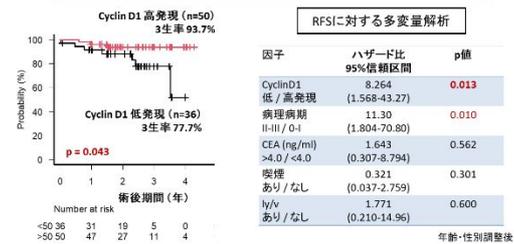
### 4. 研究成果

EGFR 変異陽性肺癌切除症例における cyclinD1 の発現と予後との関連を明らかにすること、EGFR 変異陽性肺癌細胞株における EGFR-TKI と CDK4/6 阻害剤の併用効果を検討することを目的とし、臨床検体、細胞株を用いて解析を行った。細胞株では、併用による相乗効果を認め、シグナル伝達経路、細胞周期の変化から説明可能であったが、臨床検体では、Cyclin D1 高発現は、女性、非喫煙者に多い傾向が認められ、CyclinD1 高発現群は低発現群より予後がよい傾向が認められた。

### Cyclin D1 発現と臨床病理学的背景因子



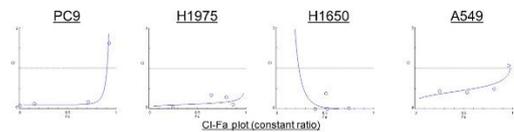
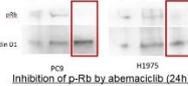
### 術後無再発生存期間 (I-III期, n=86)



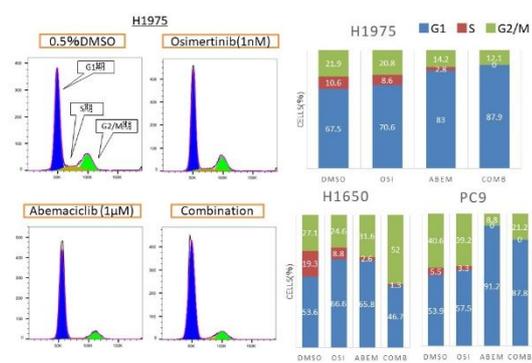
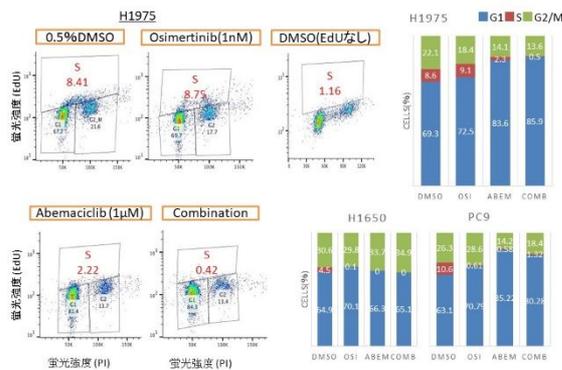
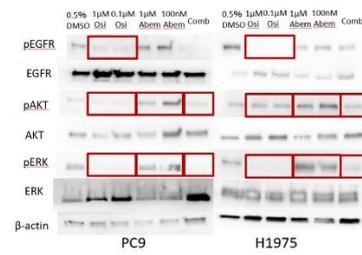
細胞株を用いた検討では、EGFR 変異陽性肺癌において、EGFR-TKI osimertinib と CDK4/6 阻害剤 abemaciclib の併用療法は、相乗効果を認め、CDK4/6 阻害に伴う AKT のリン酸化を EGFR-TKI が抑制していることで併用療法の効果が得られていることが判明した。

### Osimertinib/Abemaciclib combination in lung cancer cells

Cell lines	Osimertinib GI50%	Abemaciclib GI50%	Constant ratio Osi : Abem
PC9	3 nM	1 μM	1:1000
H1975	10 nM	1 μM	1:1000
H1650	1 μM	5 μM	1:1
A549	5 μM	1 μM	1:1



### Mechanism of synergy (osi/abem combination)



肺癌では cyclin D1 の他に悪性度に関与している治療標的が存在すると考えられ、ER が関与している可能性がある。Cyclin D1 と ER 経路の関連に関する追加の検討では、肺癌細胞株では、ER の蛋白発現をほとんど認めず、E2 による cyclin D1 の増加も認めなかった。一方、MCF7 と比較し、A549 では E2 濃度依存性に細胞増殖が促進されたが、H1975 ではそれが抑制された。MCF7 においては E2 により G1/S 移行が進み、細胞増殖が促進されたが、H1975 においては E2 による G1/S 移行を認めず、MAPK 経路の活性化を認めた。肺癌細胞株では E2 による ER の増加を認め、抑制的に働く可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Atsushi Osoegawa, Yohei Takumi, Takafumi Hashimoto, Shotaro Nakatsuji, Mayu Hori, Mayu Sakai, Takashi Karashima, Miyuki Abe, Michiyo Miyawaki, Kenji Sugio	4. 巻 41
2. 論文標題 Cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibition in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Investigational New Drugs	6. 最初と最後の頁 183-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10637-023-01337-8.	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 Osoegawa Atsushi, Abe Miyuki, Takumi Yohei, Hashimoto Takafumi, Karashima Takashi, Miyawaki Michiyo, Sugio Kenji	4. 巻 14
2. 論文標題 Significance of programmed death ligand 1 expression in resected lung cancer and its relationship with EGFR mutation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2467 ~ 2472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.15031	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 Osoegawa Atsushi, Karashima Takashi, Takumi Yohei, Sato Takahiro, Abe Miyuki, Hashimoto Takafumi, Sugio Kenji	4. 巻 15
2. 論文標題 Osimertinib as first-line treatment for recurrent lung cancer patients with EGFR mutation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 5566 ~ 5573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd-23-537	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、堀 真優、中辻 祥太郎、前田 有珠、鎌田 紘輔、安部 美幸、宮脇 美千代、武内 秀也、杉尾 賢二
2. 発表標題 上皮成長因子受容体（EGFR）変異陽性肺癌における細胞周期関連因子の意義と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小副川 敦
2. 発表標題 まれなEGFR 遺伝子変異 (uncommon mutation) 陽性肺癌におけるPD-L1 発現の検討
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osoegawa A, Takumi Y, Karashima T, Abe M, Hashimoto T, Miyawaki M, Sugio K
2. 発表標題 First Line Osimertinib in Lung Cancer Patients with Postoperative Recurrence.
3. 学会等名 IASLC 2022 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小副川 敦、内匠 陽平、橋本 崇史、辛島 高志、安部 美幸、宮脇 美千代、杉尾 賢二
2. 発表標題 術後再発に対するosimertinib の有効性について
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osoegawa A, Karashima T, Takumi Y, Takamori S, Abe M, Sugio K.
2. 発表標題 Osimertinib as first-line treatment for recurrent lung cancer patients with EGFR mutation.
3. 学会等名 The 2nd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小副川敦、内匠陽平、高森信吉、安部美幸、辛島高志、杉尾賢二
2. 発表標題 肺癌周術期治療におけるバイオマーカー研究
3. 学会等名 第74回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、酒井 麻有、中辻 祥太郎、辛島 高志、安部 美幸、杉尾 賢二
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性肺癌におけるCyclinD1発現の意義
3. 学会等名 第40回 日本呼吸器外科学会総会
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	宮脇 美千代 (Miyawaki Michiyo)  (30404388)	大分大学・医学部・講師  (17501)	
研究分担者	杉尾 賢二 (Sugio Kenji)  (70235927)	大分大学・医学部・教授  (17501)	

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