

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Targeting the miR-200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features

(上皮間葉移行の特性を示す EGFR-TKI 耐性非小細胞肺癌は microRNA200c/LIN28B 系に依存する)

佐藤博紀, 枝園和彦, 富田秀太, 岡安和寛, 諏澤 憲, 橋田真輔, 鳥越英次郎, 渡邊元嗣, 山本寛斉, 宗 淳一, 浅野博昭, 佃 和憲, 三好新一郎, 豊岡伸一

Scientific Reports 13(7):40847 (1-10), 2017

平成 28 年 12 月第 17 回世界肺癌学会に発表

副 論 文

Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/Lapatinib in breast cancer

(Yes1 は乳癌においてトラツズマブおよびラパチニブへの薬剤耐性に関与する)

武田達明, 山本寛斉, 神崎浩孝, 諏澤 憲, 吉岡貴裕, 富田秀太, Xiaojiang Cui, Ramachandran Murali, 難波 圭, 佐藤博紀, 鳥越英次郎, 渡邊元嗣, 枝園和彦, 宗 淳一, 浅野博昭, 佃 和憲, 北村佳久, 三好新一郎, 千堂年昭, 豊岡伸一

PLoS One 3;12(2):e0171356 (1-17), 2017

主論文

Targeting the miR-200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features

(上皮間葉移行の特性を示す EGFR-TKI 耐性非小細胞肺癌は microRNA200c/LIN28B 系に依存する)

【緒言】

進行非小細胞肺癌の予後は依然として不良である。上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) などの分子標的薬は、一旦は著効するものの、その後、薬剤耐性を獲得することが知られており、進行非小細胞肺癌の治療の上での大きな問題となっている。薬剤耐性の原因として様々なメカニズムが知られているが、その中の一つとして上皮間葉移行 (EMT) が報告されている。我々はこれまでに、EGFR-TKI に対して耐性を獲得した非小細胞肺癌細胞株を樹立し、この細胞株が EMT の特性を示していること、その細胞株においてプロモーターのメチル化により microRNA (miR) -200 の発現が抑制されていることを報告した。しかしながら EMT と薬剤耐性メカニズムの詳細な関係は未だ不明な部分が多い。miR-200 は様々な癌で発現が抑制されていることが知られており、さらには、EMT に関与する E-cadherin, ZEB1, ZEB2 などのタンパク質の発現を調節する因子であることが知られている。この中で ZEB1 自体も、miR-200 の発現を調節していることが報告されており、EMT において miR-200 が重要な働きを担っていることが示唆される。今回我々は非小細胞肺癌における miR-200 の働きを調べるとともに、EGFR-TKI に対する耐性獲得の原因としての EMT について検討した。

【材料と方法】

細胞株

非小細胞肺癌の細胞株 (34 種類)、乳癌細胞株 (4 種類)、大腸癌細胞株 (3 種類)、胃癌細胞株 (4 種類)、正常気管支上皮細胞株 (1 種類)、我々のグループで樹立した EGFR-TKI に耐性を獲得した細胞株 (2 種類; HCC4006-GRS, HCC4006-GRH) を用いた。

PCR

miR-200, LIN28B の mRNA レベルでの発現を定量 PCR によって、DNA のメチル化の程度をメチル化特異的 PCR によって測定した。

DNA 脱メチル化剤

miR-200 のプロモーターのメチル化と miR-200 の発現の関係を調べるために、DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine を用いた。

Western blot analysis

EMT 関連タンパク質、アポトーシスマーカー、LIN28B のタンパクレベルでの発現の測定に Western blot analysis を用いた。

遺伝子発現解析

34 種類の非小細胞肺癌細胞株のうち Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) に情報のある細胞株 28 種類を用いた。miR-200c の発現および DNA のメチル化の程度によってこれらの細胞株を 2 つのグループ (miR-200c 高発現グループ, miR200c 低発現グループ) に分け、遺伝子発現解析 (GSEA) を行うことで、miR-200c の発現と相関する遺伝子、パスウェイの検索を行った。

miR-200c transfection

非小細胞肺癌細胞株における miR-200c の働きを調べるために、miR-200c 高発現株 (HCC4006-parent), miR-200c 低発現株 (HCC4006-GRS, HCC4006-GRH) に miR-200c を導入し、細胞増殖への影響を調べた。増殖の評価は MTT 試験で行った。

LIN28B knockdown

LIN28B の EGFR-TKI 耐性株における働きを調べるために siRNA を用いて knockdown を行った。増殖の評価は MTT 試験で行った。

免疫染色

岡山大学病院で手術を行った非小細胞肺癌患者の検体を用いて免疫染色を行った。T790M 変異など、EMT 以外の EGFR-TKI 耐性化の原因がわかっている症例は除外した。EGFR-TKI による治療前後での E-cadherin, Vimentin, LIN28B の発現の変化を調べた。

[結果]

非小細胞肺癌細胞株における miR-200 の発現とプロモーターのメチル化の関係

34 種類の非小細胞肺癌細胞株と正常上皮細胞株を用いて miR-200 の発現と DNA のメチル化の程度を調べたところ、miR-200 の発現とプロモーターのメチル化の程度が逆相関していた。脱メチル化剤でプロモーターがメチル化されている細胞株を処理したところ、プロモーターの脱メチル化に伴い、miR-200 の発現の上昇がみられた。これらの結果から miR-200 の発現がプロモーターのメチル化によりコントロールされていることが示唆された。

miR-200 の発現と EMT の関係

CCLE に情報のある 28 種類の非小細胞肺癌細胞株を、miR-200c の発現および DNA のメチル化の程度によって 2 つのグループ(miR-200c 高発現グループ, miR200c 低発現グループ)に分け、GSEA を行った。その結果 miR-200c の発現と EMT 関連遺伝子群の間に逆相関の関係がみられた。さらに、個々の遺伝子について解析すると、上皮系マーカーである E-cadherin の発現が miR-200 の発現と正の相関を示したのに対して、stem-cell factor として知られている LIN28B の発現が、間葉系マーカーである ZEB1 と同様に miR-200 の発現と逆相関していることが分かった。また、western blot でも miR-200 の発現が低い細胞株では E-cadherin の発現が低く、vimentin, ZEB1 の発現が高い結果となり、miR-200 の発現と間葉系マーカーの発現とが逆相関している結果であった。同様の現象は非小細胞肺癌細胞株だけでなく、乳癌、大腸癌、胃癌の細胞株でも確認された。

EGFR 変異と miR-200 の発現の関係

非小細胞癌 34 種類について、EGFR 変異と miR-200 の発現の関係を調べた。EGFR 変異を起こしている細胞株で、miR-200 の高発現がみられる傾向にあることが示された。

miR-200c の非小細胞肺癌細胞株における働き

我々の樹立した EMT の特性を示す EGFR-TKI 耐性細胞株(HCC4006-GRS, HCC4006-GRH)において、miR-200 の発現は抑制されていた。miR-200c を HCC4006-GRS および HCC4006-GRH に導入したところ、細胞増殖能が有意に抑制された。一方で HCC4006-parent では miR-200c の導入は細胞の増殖能に影響を与えなかった。

EGFR-TKI 耐性細胞株における LIN28B の発現

HCC4006-GRS および HCC4006-GRH で、親株に比べて LIN28B が高発現していた。miR-200c をこれらの細胞株に導入することで間葉系マーカーである Vimentin や ZEB1 と同様に、LIN28B の発現が抑制された。

EGFR-TKI 耐性細胞株における LIN28B の働き

HCC4006-GRS および HCC4006-GRH において、siRNA を用いて LIN28B の発現を抑制したところ、増殖能が有意に抑制された。Western blot analysis では LIN28B を knockdown することによって cPARP の高発現がみられておりアポトーシスが誘導されていることが示唆された。EMT に関しては、LIN28B の発現抑制により E-cadherin の高発現、vimentin および ZEB1 の発現抑制が誘導されていた。これらの結果は LIN28B が新たな EMT の調節因子であることを示唆している。

臨床検体での miR-200c と LIN28B の関係

EGFR-TKI による加療前(耐性獲得前)と加療後(耐性獲得後)の臨床検体を用いて、EGFR-TKI 耐性獲得による miR-200c および LIN28B の発現の変化を調べた。その結果、細胞株での結果と同様に、EGFR-TKI に対する耐性を獲得する過程で miR-200c の発現が抑制され、LIN28B の高発現が誘導されていた。

【考察】

この研究で我々は、EMT の特性を示す EGFR-TKI 耐性獲得細胞株において miR-200c の導入および LIN28B の抑制が共に細胞増殖を抑制することを示した。この現象は miR-200c の発現抑制や LIN28B の高発現を示す EGFR-TKI 耐性細胞株において miR-200c/LIN28B の系が重要な働きを担っていることを示唆している。

EMT とは細胞が上皮系から間葉系の性質を獲得することであり、癌の転移や薬剤耐性に関与していることが知られている。また、EMT はいくつかの上皮系腫瘍の予後不良因子であることも報告されている。これまで EMT を起こすとなぜ薬剤耐性の原因となるのか、そのメカニズムについては不明な点が多かったが、我々は LIN28B を新たな候補遺伝子として提唱した。

LIN28B は哺乳類の幹細胞の自己複製を調整しているとされ、癌の進展に関わっているさまざまなパスウェイに関与している。さらに LIN28B は、予後不良の上皮型の卵巣癌において、プラチナベースの化学療法に対する耐性獲得のバイオマーカーとして報告されている。これらの報告および我々の結果は、LIN28B が薬剤耐性に関与している因子であることを示唆している。また、LIN28B は c-Myc の発現によって誘導されることが報告されており、LIN28B および c-Myc の高発現が上皮型の腫瘍をより未分化な性質へと転換することが知られている。我々の行った GSEA において、Myc に関連する遺伝子群が miR-200c の発現が抑制されている細胞株で高発現していた。この GSEA の結果は、miR-200c の発現が抑制されている細胞で LIN28B が高発現しているという結果を補強するものとなっている。

【結論】

miR-200c/LIN28B の系は EGFR-TKI に耐性を獲得した細胞において重要な働きを担っており、新たな治療標的となり得る。現段階では miR-200c または LIN28B を直接ターゲットとした薬剤は開発されておらず、この系についてさらに理解を深めることが EGFR-TKI 耐性に対する治療の発展につながると考えられる。

副 論 文

Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/Lapatinib in breast cancer

(Yes1 は乳癌においてトラツズマブおよびラパチニブへの薬剤耐性に関与する)

【緒言】

乳癌において HER2 の過剰発現は 15-23% に認められる。これらの HER2 陽性乳癌に対してトラツズマブがファーストラインの薬剤として用いられており、これにより HER2 陽性乳癌の患者の予後は改善した。しかしながらトラツズマブに対する獲得耐性は大きな問題であり、その原因解明、対策が急務といえる。また、トラツズマブに耐性となった患者に対して用いられるラパチニブについても獲得耐性は同様に問題となっている。本研究の目的は HER2 陽性乳癌の治療における主要な 2 剤であるトラツズマブおよびラパチニブに対する耐性機序を解明することである。

【方法】

トラツズマブとラパチニブにともに感受性のある乳癌細胞株 BT-474 を、トラツズマブに曝露した状態で培養することでトラツズマブ耐性細胞株 BT-474-R を樹立した。さらに BT-474-R をラパチニブに曝露することで両剤に耐性のある細胞株 BT-474-RL2 を樹立した。この 2 つの細胞株を用いて耐性機序の解明を行った。

【結果】

樹立した耐性株において、がん原遺伝子チロシンプロテインキナーゼである Src family に属する Yes1 の増幅、過剰発現を認めた。siRNA を用いて Yes1 を knockdown することで耐性株のトラツズマブおよびラパチニブへの感受性は回復した。Src 阻害剤であるダサチニブの投与によっても、耐性株のトラツズマブおよびラパチニブへの感受性は回復した。ダサチニブとトラツズマブの併用療法は HER2 およびその下流の AKT のリン酸化を抑制し、さらに細胞の G1 期停止状態およびアポトーシスを誘導した。データベースを用いた解析では、Yes1 の発現が HER2 陽性乳癌患者の予後不良因子であった。

【結論】

Yes1 はトラツズマブおよびラパチニブへの獲得耐性において重要な働きをしている。我々の結果は、Yes1 を薬理的に阻害することが、トラツズマブとラパチニブに対する獲得耐性を克服するための有効な手段である可能性を示唆している。

【主論文との関連性】

◎主論文の内容と副論文の内容との直接的関連性について

両論文ともに受容体チロシンキナーゼを標的とした治療薬に対する獲得耐性の機序の解明を目的とした研究についての論文である。

◎論文相互間の引用の有無について

例：主論文において副論文を引用していない。