

2020年度 北陸大学特別研究助成 【 若手・女性研究 】 報告書

代表者	所属	薬学部・助手	氏名	佐藤栄子
-----	----	--------	----	------

研究課題名	ヒトEGFR-TKI初期耐性肺腺癌細胞を用いたEGFR遺伝子野生型肺腺癌薬の探索
-------	--

交付額	600,000	円
-----	---------	---

研究成果の概要

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子野生型の肺腺癌に有効な治療法の開発につながるため、EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine kinase inhibitor: TKI) 低感受性細胞のTetrandrineによるEGFR-TKI感受性増強作用におけるオートファジー関連因子のさらなる解明を行い、新たな知見を得た。

また、EGFR-TKI獲得耐性肺腺癌克服の可能性を開くため、EGFR-TKI感受性ヒト肺腺癌細胞のPC-9細胞にGefitinib濃度を段階的に増加させてGefitinib獲得耐性PC-9細胞 (D3細胞) を作成し、TetrandrineがD3細胞のEGFR-TKI感受性を亢進することを確認し、その機序にPC14細胞と同様のリソソーム阻害の関与が考えられた。

研究目的

本研究の目的は、TetrandrineのEGFR-TKI耐性克服におけるオートファジーへの関与をさらに明らかにするとともに、細胞にもともと備わっているオートファジー機構を利用した薬剤をさらに探索し、EGFR遺伝子野生型の肺腺癌に有効な治療法の開発につなげ、EGFR-TKI獲得耐性肺腺癌克服の可能性を開くことである。

肺癌は、我が国で最も死亡率が高い癌であるが、中でも腺癌の割合が最も多く、肺腺癌の45%にEGFR遺伝子変異があることが報告されている (Midha A et al. Am J Cancer Res. 2015, 5: 2892-2911)。EGFR遺伝子変異陽性患者にはEGFR-TKIが奏功するが、約1年程で耐性となり、耐性化した症例の50-60%でEGFR遺伝子exon20のT790M変異が認められること、T790M変異を標的としたオシメルチニブなどの第三世代EGFR-TKIでも、耐性化の出現が報告されるなど、根本的な解決には至っていない。一方、肺腺癌全体では約5割を占めるEGFR-TKI非感受性の肺腺癌に対する治療法は、ALK遺伝子転座陽性の場合、ROS1遺伝子転座陽性の場合、PD-L1 50%以上の場合でアレクチニブ、クリゾチニブ、ペムブロリズマブなど、エビデンスの高い分子標的治療薬を用いた治療法が認められ、さらに近年、PD-L1 1%未満の場合でもペムブロリズマブ・カルボプラチン・ペメトレキセドの併用で効果が見られたことから (Langer CJ et al. Lancet Oncol. 2016, 17:1497-1508.)、免疫チェックポイント阻害薬であるペムブロリズマブの使用が一次治療から推奨されたが、効果が出ず特有の副作用だけが出て中断となる人たちがいる。一方、オートファジーは細胞が持っている細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つであり、細胞ストレスとオートファジーの間の関連が癌に影響を与えるとの報告 (Perera RM et al. Nature. 2015 524:361-365) や粉防已成分のTetrandrineには肝癌細胞において低濃度ではオートファジーを引き起こすとの報告がある (Gong K et al. J Biol Chem. 2012, 287:35576-88)。

報告者らはこれまで、非小細胞肺癌のEGFR-TKI感受性増強化合物を探索し、Tetrandrineが有意にEGFR-TKIの感受性を増強させることを見出した。また、TetrandrineのEGFR-TKI耐性解除機序を解明しようと実験研究する中で様々な現象を発見し、Tetrandrineによりオートファジーマーカーの増加が見られるとともに、Gefitinibによりさらに増強される傾向が得られ、Tetrandrineにリソソーム阻害作用があることおよびこの作用によりTetrandrineがEGFR-TKIの感受性を増強させることを証明した。

研究の方法

EGFR-TKIに初期耐性を示すPC-14細胞のTetrandrineのEGFR-TKI感受性増強作用の機序にオートファジーが関与することを報告している。EGFR-TKI低感受性細胞のTetrandrineによるEGFR-TKI感受性増強作用におけるオートファジー関連因子のさらなる解明のため、以下の方法を用いて検討した。

- 1) Gefitinib感受性試験…3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 法。
- 2) オートファジー関連タンパク質 (LC3, p62, pp62) および関連経路タンパク質 (Keap1, Nrf2) の検出…Western Blotting法。
- 3) 2) のタンパク質の細胞内局在の確認…免疫蛍光染色 (Immuno Fluorescence: IF) 法。

また、Gefitinib獲得耐性肺腺癌細胞を用いた実験を行うため、EGFR-TKI感受性ヒト肺腺癌細胞のPC-9細胞にGefitinib濃度を段階的に増加させてGefitinib獲得耐性PC-9細胞 (D3細胞) を作成した。TetrandrineがD3細胞のEGFR-TKI感受性を亢進することを確認し、そのメカニズムを探るため、以下の方法を用いた。

- 1) Gefitinib感受性試験…MTT法。
- 2) オートファジーかどうかの確認…Autophagy flux assay法。
- 3) リソソーム阻害剤を用いたGefitinib感受性試験…MTT法。

研究成果

EGFR遺伝子に変異を持たないヒト肺腺癌PC14細胞は、EGFR遺伝子のExon19に欠損をもつヒト肺腺癌PC9細胞と比較してGefitinib感受性が低いことを確認している。演者らはStephaniae tetrandraeから単離されたbisbenzylisoquinoline alkaloidであるTetrandrineが、PC14細胞のGefitinib感受性を増強すること、そのメカニズムとしてAutophagy fluxへの関与を明らかにしている<引用文献>。

その文献中で、オートファジー関連蛋白質の中でも主たるLC3の他、p62の関与も示唆されたが、p62の挙動については、LC3の挙動やGefitinib感受性と相関しないなど不明な点があった。そこで、詳細な検討を行うべく、短時間（6 h）処理でも検討を行ったところ、短時間でもp62の有意な増加が認められた。（日本生化学会北陸支部第38回大会にて報告）

一方、p62は様々な部位がリン酸化され、それぞれの部位のリン酸化が連続的に起きることで選択的オートファジーなどの生体防御に関わっていることが知られている。P62のSer349（ヒト）/Ser351（マウス）がリン酸化されると、p62とKeap1との親和性が増し、転写因子として働くNrf2がKeap1から離れて核に移行できるようになる経路（p62-Keap1-Nrf2経路）が知られていることから、その経路の探索を行った。まず、リン酸化p62 Ser349（pp62）の挙動を検討した所、6・24 hともに有意な増加が認められた。さらにLC3の挙動と比較検討した所、LC3とp62の挙動は一致しないが、LC3とpp62の挙動は同様であった。一方、Keap1蛋白質の発現を確認した所、6 hではTetrandrineおよびGefitinib単独、Gefitinib併用処置で減少傾向が認められた。24 hではTetrandrine及びGefitinib単独、Gefitinib併用処置で有意な低下が認められた。そこで、Nrf2蛋白質についても同様の検討を行ったが、各処置により全く変動が認められなかった（未発表データ）。Nrf2は活性化すると核に局在し、様々な転写を介して標的遺伝子の発現を増加させたりすることが知られているため、細胞全体で量が増加しなくとも、局在が変化する可能性を考え、Nrf2蛋白質の細胞質と核画分の発現を確認した。すると、PC14細胞ではNrf2がControlにおいても核に局在していることが判明し、各処置による有意な変化も認められなかった。PC14細胞ではpp62蛋白質の増加に伴うKeap1蛋白質の低下は認められたものの、Nrf2蛋白質がもともと核に局在しており、p62-Keap1-Nrf2経路が破綻している可能性が考えられた。（日本薬学会第141年会にて発表）

また、同条件下で、p62およびpp62タンパク質の細胞内局在をオートファゴソームマーカーのLC3タンパク質と共染色し、共焦点顕微鏡によるIF法を用いて確認を行った（未発表）。Tetrandrine単独およびGefitinib併用処置でp62とLC3が増加し、ほぼ共局在もしくは極めて近傍に局在していること（6, 24 h）、p62はTetrandrine単独および早期（6 h）でも増加するのに対し、pp62の蓄積やリソソームの膨張は併用処置や後期（24 h）に顕著になることが明らかとなった。LC3はすでに併用処置等により、リソソームマーカーのLAMP1と共局在することを報告している<引用文献>ことから、Western Blotting法により認められた増加するp62およびpp62はリソソーム内もしくは極めて近傍に蓄積する可能性を考えていたが、実際pp62はLAMP1とも共局在していたことから、Tetrandrine単独およびGefitinib併用処置で増加するpp62はリソソームに蓄積している可能性が示唆された。Keap1のIF法からは、Gefitinib併用24 h処置でのみ細胞内局在が変化することを見出し、このことがTetrandrineのGefitinib感受性増強作用と関係している可能性が考えられたが、Nrf2のIF法については抗体がうまく働かず、細胞内局在を明らかにすることができなかつたので、核画分と細胞質画分に分画し、Western Blotting法にて検出を行った。さらに、PC14細胞ではp62-Keap1-Nrf2経路が破綻している可能性を証明するため、他の細胞と比較検討を行った所、マウス表皮JB6 C141 P+細胞では、核にも細胞質にもNrf2がほとんど発現していない事、ヒト肺基底上皮腺癌A549細胞ではPC14細胞と同様にNrf2がもともと核に局在していることがわかった（未発表データ）。Keap1とNrf2は通常結合していて、特に必要がなければプロテアソームで分解されるが、酸化ストレスや細菌の感染などによりKeap1が不活化してNrf2と解離するとNrf2が核へ移行して、抗酸化タンパク質や解毒酵素、抗炎症性酵素を合成し、細胞における恒常性維持に働くと考えられている。今回の知見は肺腺癌細胞では何らかのメカニズムにより何の刺激がなくても（もしくは過去に何らかの刺激を受けたため）Nrf2が核に局在・活性化し、様々なタンパク質の合成を引き起こしている可能性を示しており、肺癌細胞の特徴や成立を知る上で興味深い結果となった。この知見が、肺癌の治療に結び付く様、今後もさらなる検討を行う。

一方、EGFR-TKI獲得耐性肺腺癌細胞モデルであるD3細胞においてもTetrandrineによるGefitinib感受性の増強作用が確認され、Autophagy flux assay及びChloroquineを用いたGefitinib感受性試験の結果、Tetrandrineのリソソーム阻害作用によるものであることが明らかとなった。

探索にあたって、EGFR-TKI耐性腫瘍細胞の増殖メカニズムを明らかにし、その制御分子を見出すことは、現在抱える種々の問題点を解決する上でも重要であり、今回の特別助成のおかげでその一端を明らかにすることができた。

<引用文献> Tetrandrine Increases the Sensitivity of Human Lung Adenocarcinoma PC14 Cells to Gefitinib by Lysosomal Inhibition. Sato E, Ohta S, Kawakami K, Ikeda M, Takahashi T, Kobayashi S and Nomura M. Anticancer Research 2019; 39, 6585-6593.

主な発表論文等

- ・日本生化学会北陸支部 第38回大会（2020. 6. 13. 誌上開催）
- ・日本薬学会第141年会（広島）オンライン開催（2021. 3. 28ポスター発表）