

公益財団法人 寺岡記念育英会

2023 年度 海外留学滞在費助成事業 研究活動報告書一覧

悪性黒色腫における MITF 発現量の違いと ROCK 阻害薬による分子標的薬の治療効果の検討 岡山大学病院 皮膚科 皮膚外科 立花 宏太	・・・ 1
オシメルチニブ耐性肺癌に対する新規治療標的分子の探索 岡山大学 医学部 呼吸器内科 西井 和也	・・・ 3
iRGD による新規 DDS を利用した難治性口腔癌新規抗腫瘍・抗転移治療の開発 岡山大学 学術研究院医歯薬学域 口腔病理学 河合 穂高	・・・ 5

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

(表 題) 悪性黒色腫における MITF 発現量の違いと ROCK 阻害薬による分子標的薬の治療効果の検討

(所 属) 岡山大学学術研究院医歯薬学域 皮膚科学

(氏 名) 立花 宏太

(概要)

1. 渡航先 : Frazer Institute, Faculty of Medicine, the University of Queensland

2. 日程 : 2024 年 4 月 7 日から 2025 年 3 月 23 日

3. 研究及びその成果の概要

(背景・目的)

悪性黒色腫は日本の皮膚癌において 3 番目に多く発生する悪性腫瘍である。一年間の新規患者診断数は人口 10 万人あたり 1.5 人とされている。悪性黒色腫は進行が非常に早く、転移を来した場合の治療効果が乏しい。2014 年頃から新規の分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が使用可能となり、Stage IV の 5 年生存率が約 20%から約 30%に向上したものの未だ十分とは言えない。クイーンズランド州はオーストラリアの北東部に位置しており、紫外線が強く悪性黒色腫の罹患率が高い。そのため悪性黒色腫の研究が盛んであり、エキスパート達が揃っている。

悪性黒色腫の治療には細胞内シグナル経路の MAP キナーゼである BRAF および MEK に対する分子標的薬が用いられているが、これらの薬剤は抵抗性獲得が問題となっている。そのため、メラノーマにおける治療抵抗性を改善することが、今後のメラノーマ治療においての重要な課題である。当研究室では悪性黒色腫の細胞周囲環境に影響を与える microphthalmia-associated transcription factor (MITF) に注目しており、MITF の調節により腫瘍周囲環境を変化させることで薬剤の効果が増強するかどうかを検証する。

(研究方法および成果)

<1>MITF の発現量による分子標的薬への感受性変化の確認

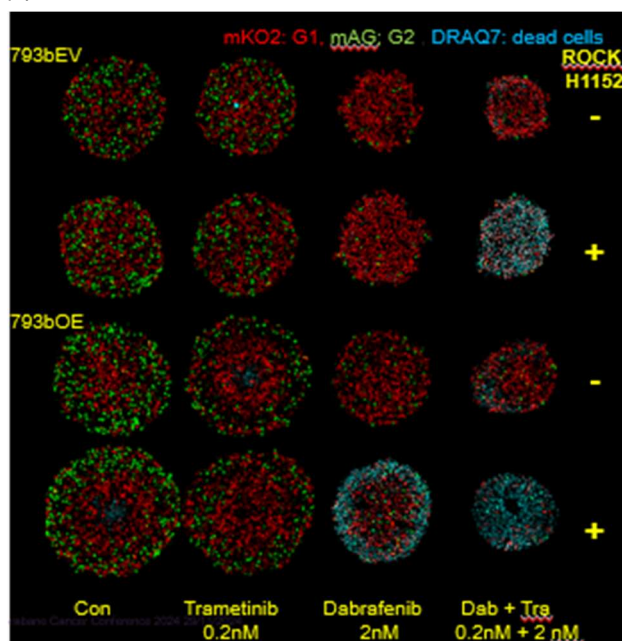
ウェスタンブロット法を用いて BRAF 遺伝子変異 (V600E) をもつそれぞれの細胞株の MITF 発現量について確認した。MITF 高発現の細胞株は MITF ノックダウン細胞株を作成し、MITF 低発現の細胞株は MITF を過剰発現させた細胞を作成した。これらの細胞株に現在臨床に使用されている Dabrafenib (BRAF 阻害薬) と Trametinib (MEK 阻害薬) を添加し、2D 培養細胞において Resazurin assay と画像解析より 50% 効果濃度 (IC50) を測定した。そこで得られた濃度を元にスフェロイド 3 次元培養細胞で同様の薬剤を添加し、共焦点顕微鏡を用いてスフェロイドの 3 次元画像を解析した。MITF が過剰発現している細胞では、MITF が低発現の細胞と比べて G2 期の細胞が増加しており、スフェロイドの大きさも増大した。BRAF、MEK 阻害薬の感受性が増強し、スフェロイド内の死細胞数が増加することを確認した。スフェロイドの中心部では低酸素状態でありより薬剤抵抗性であると考えているが、中心部においても薬剤感受性が改善することを確認した。

＜2＞ROCK 阻害薬による分子標的薬への感受性変化の確認

MITF が下流の Rho-ROCK 経路を経由して細胞周囲環境の変化をもたらし、細胞周期や腫瘍細胞の浸潤能力に影響すると予測している。ROCK は MITF と反比例して変動することを確認しており、ROCK 阻害薬によって MITF 高値のときの細胞形態を再現できると考えている。そこで＜1＞と同様の実験系を用いて ROCK 阻害薬と共に BRAF 阻害薬、MEK 阻害薬をスフェロイドに使用し、ROCK 阻害薬の使用によって分子標的薬の効果が増強するかどうかを確認した。ROCK 阻害薬は、MITF の高発現状態を模倣し、BRAF、MEK 阻害薬の感受性を増強することを確認した。またその増強効果は MITF 高発現の状態よりも更に強いこともわかった。低酸素状態で治療抵抗性である中心部においても死細胞の増加を確認できた（図 1）。

（まとめと今後の展望）

本研究は、MITF の発現量および ROCK 阻害薬が悪性黒色腫における分子標的薬の治療効果を改善する可能性を示した。この結果は、治療抵抗性を克服するための新たなアプローチとなる可能性があると考えられている。今後は、他の細胞株や異なる ROCK 阻害薬を使用して、同様の結果が得られるかどうかを検討し、そのメカニズムをさらに解明していく予定である。また、臨床応用に向けて実験系を改善し、治療効果を一層高めるための新たな因子の特定も進めていきたい。



(表 題)

オシメルチニブ耐性肺がんに対する新規治療標的分子の探索
(所 属) 岡山大学大学院 医師薬学総合研究科 血液・腫瘍・呼吸器内科学

(氏 名) 西井 和也

(概要)

1. 渡航先

The University of Texas MD Anderson Cancer Center

2. 日程

2024 年 10 月 7 日より研究開始、2025 年 4 月現在研究継続中。

3. 研究及びその成果の概要

研究の背景

上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異肺がんは、非喫煙者において最も高頻度に発症する肺がんで、分子標的治療薬である EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が高い奏効率を示し、近年その生存率が向上している (Ramalingam SS, et al. N Engl J Med. 2020)。しかし、ほとんどの症例は一定期間奏効を維持した後に再増大する。その理由の一つとして腫瘍細胞集団の中に薬物耐性がん細胞という薬剤に強い細胞が一部存在し、薬物によってほとんどのがん細胞を除去してもそれらを根絶できないためと考えられている (Pu Y, et al. Nat Rev Clin Oncol. 2023)。

近年この薬剤耐性がん細胞に関する研究が進み、薬剤耐性がん細胞にはどのような生物学的特徴があり、なぜ強い耐性を示すのかが報告されてきた (He J, et al. Signal Transduct Target Ther. 2024)。私の所属する研究室では EGFR-TKI 投与後の薬物耐性がん細胞の表面に CD70 という分子が高発現し、上皮間葉転換 (EMT) という現象に関与していること、CD70 を標的とする CAR-T 療法等の治療が薬物耐性細胞に有効であることを報告している (Nilsson MB, et al. Cancer Cell. 2023)。しかし、本研究の解析には近年一次治療として広く用いられている第三世代 EGFR-TKI の薬剤耐性がん細胞は対象に含まれておらず、また薬剤耐性がん細胞は多様性に富む集団のため CD70 のみを標的とした治療で完全に除去することは困難と考えられるため、更なる研究開発が求められている。

研究の目的

近年 EGFR 遺伝子変異陽性肺がんに対して一次治療として広く用いられている第三世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブ投与後の薬物耐性がん細胞の表面に発現している分子を同定し、肺がん治癒を目標とした新規治療法を検討する。

研究の方法

アメリカ国立生物工学情報センターの GEO (Gene Expression Omnibus) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) で公開されているオシメルチニブ薬物耐性がん細胞の RNA シークエンスのデータを網羅的に解析する。治療前のがん細胞と比較して薬物耐性がん細胞の表面により選択的に発現する分子を同定し、その機能解析並びに治療標的となり得るかどうかを検証する。

研究の成果

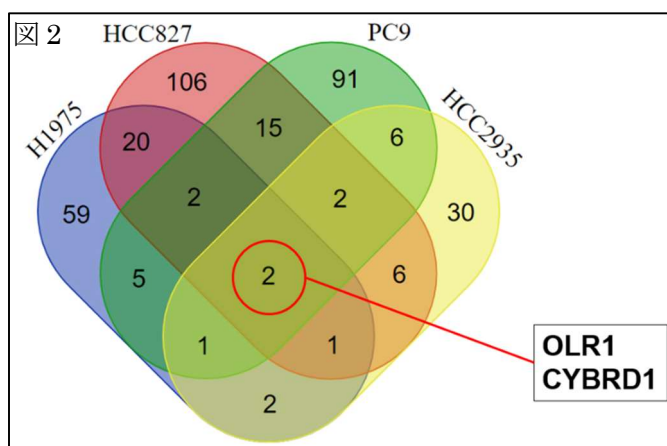
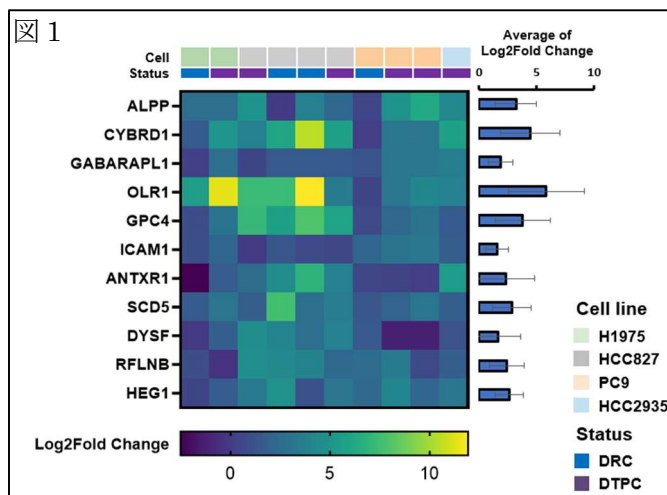
2024年12月までにGEOに公表されたオシメルチニブに関するデータセット114件の内、薬物耐性がん細胞のデータを含むものは23件で、その中で治療前群との比較が可能であった10個のデータセットを解析した。細胞株別ではH1975 (Exon 21 L858R および T790M 変異) が2件、HCC827 (Exon19 変異) が4件、PC9 (Exon 19 変異) が3件、HCC2935 (Exon 19 変異) が1件であった。解析はGE02Rを用いて行った。

まず薬剤耐性がん細胞群で治療前群に比べ統計学的に優位に発現が上昇しているRNAを抽出し、その中から細胞表面に発現するたんぱく質のRNAに絞り、発現上位50位までをリストアップした。その後各データセットで共通して上昇しているものを特定した(図1)。その結果、OLR1が治療前に比べ薬剤耐性がん細胞に最も強く発現していることが判明した。また、細胞株別によるベン図も作成したところ、今回の解析に用いた4つの細胞株で共通してRNA発現の上昇が認められたのはOLR1とCYBRD1の2つのみであった(図2)。

OLR1 (Oxidized low density lipoprotein receptor) は主にLOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor 1) というタンパク質をコードする遺伝子で、このタンパク質はC型レクチンスーパーファミリーに属し、主に酸化LDL (Oxidized LDL, Ox-LDL) の受容体として機能している。OLR1 (LOX-1) は多くのがんで高発現しており、その発現量は腫瘍の進行や転移、腫瘍関連の血管新生と関係している。また、頭頸部腫瘍では前述のEMTにも関与していることが報告されている (Wu L, et al. Int J Mol Sci 2023)。肺がんとの関連も報告されているが (Hao F, et al. Can Respir J. 2022)、現時点でEGFR-TKIの耐性に関わる報告は認めていない。

まとめと今後の展開

今回オシメルチニブの薬物耐性がん細胞にOLR-1等の遺伝子が複数のデータセットに共通して発現が上昇していることを発見した。今後MDアンダーソンがんセンターのデータサイエンスチームと協力してRNAシーケンスデータの更なる解析、たんぱく質発現解析などを行い治療標的となり得るか検証を行う。その後標的となる細胞表面分子に対するCAR-T療法等による治療の可能性について研究を行う予定である。



iRGD による新規 DDS を利用した難治性口腔癌新規抗腫瘍・抗転移治療の開発

(所 属) 岡山大学学術研究院 医歯薬学域 口腔病理学分野

(氏 名) 河合穂高

(概要) 申請者は、コロンビア大学 Sugahara 博士と、新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) である iRGD の開発・臨床適用に向け 2022 年より共同研究を行ってきた。同システムはアメリカやオーストラリアで治験が始まっており、現在も申請者はその病理組織評価を担当している。本共同研究は、科研費の国際共同研究強化 A にも採択された研究であり、まだ日本ではほぼ行われていない研究である。申請者は、全国に先駆けて共同研究を開始し、今回の派遣は実際の臨床組織の評価や、現地でしか手に入れることのできない材料を用いた組織学的研究を行った。さらに研究を主導する Sugahara 博士と密にコミュニケーションを取り、プロジェクトをより円滑に進められるシステム構築に努めた。実際、2025 年 3 月に帰国後も、週に数回オンラインによる会議を行い、論文の作成や組織学的なコンサルなどを継続している。また、複数の招待講演や、新しい共同研究者も獲得でき、ネットワーキングの目的も大いに達成できた。

1. 渡航先

機関名 : Columbia University Vagelos College of Physicians and Surgeons, Department of Surgery (コロンビア大学 ヴェゲロス医科外科カレッジ 外科学分野), Sugahara Lab

2. 日程

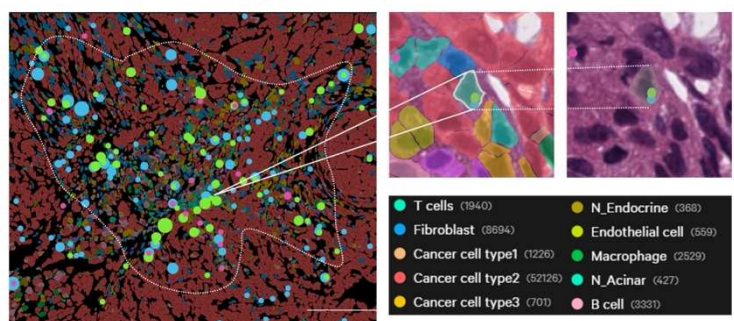
2024 年 4 月 15 日～2025 年 3 月 26 日

※ 当初 2024 年 12 月 31 日までの渡航予定であったが、研究がより発展したため滞在期間を延長した。

3. 研究及びその成果の概要

コロンビア大学では、実際に臨床材料におけるインテグリン $\beta 5$ の局在を免疫染色で検討を行い、間質に発現しているインテグリンの発現強度の違いなどについて、新たな発見があった。また、最新のスパーストランスクリプトームの技術である Xenium 5K を用いて、ヒト免疫化マウスにヒト膀胱癌細胞を移植し、得られた組織において遺伝子の発現について検討を行った。本技術は、組織上に存在するすべての細胞の 5000 遺伝子の情報を取得し、さらに AI により読み取られた組織上の細胞の位置情報を合わせることで、組織のどこで、そんな遺伝子が発現しているかを理解することができる技術である。この技術には、高度なバイオインフォマティクスの技術と、病理学的な解析能力が必要であり、複数のスペシャリストが参画して初めて成立する研究である。申請者は本研究の病理学的解析において中心的な役割を果たし、MAYO Hospital のバイオインフォマティクスのチームと共同して共同解析を行った。

New Technology of Spatial Transcriptome



また、近年、腫瘍組織近傍に形成されるリンパ組織である TLS (Tertiary lymphoid structure) は、腫瘍免疫

を活性化することから、患者の予後に良好に働くことが知られている。フロリダの Johns Hopkins School of Medicine の Komatsu 博士は、薬剤を用いて人工的に TLS を形成することができる技術を開発した。申請者が渡米した際に新しい研究プロジェクトとして iRGD との併用投与による腫瘍への影響を検討する計画が開始された。申請者は、同プロジェクトの Sugahara Lab の主研究者として関わり、同共同研究の立ち上げ及び研究を行った。同研究では、通常の併用投与では薬剤の効果が発揮されないが、投与時期を変化させることで、劇的に腫瘍サイズが減少することを明らかにし、現在もそのメカニズムについて研究を継続している。

さらに、ニューオリンズの Tulane University School of Medicine の Iwanaga 博士の元を表敬し、靱帯について解剖学的観点と病理学的観点から解析を行い、新しい靱帯の概念を定義するプロジェクトの構想について打ち合わせを行った。本プロジェクトは複数の研究室が参画する多国籍国際共同研究になる予定であり、帰国後も共同研究を進める方向を双方で確認した。

【招待講演】

JASS ニューヨーク日本人理系勉強会 Guest Speaker

『同一のサイトカインでも組織の中で挙動が変わる ～不均一で複雑な癌組織の中で起こっていること～』

Icham School of Medicine at Mount Sinai, Andrew Lab research seminar, Guest Speaker

『Double-faced CX3CL1 enhances lymphangiogenesis-dependent metastasis in an aggressive subclone of oral squamous cell carcinoma.』

【国際共著論文】

Iwanaga, Joe; Kikuchi, Keshiro; Hur, Mi-Sun; **Kawai, Hotaka**; Tabira, Yoko; Reina, Miguel Angel; LaPrade, Robert; Watanabe, Koichi. What Do We Know About Ligaments? Clinical Anatomy; 2025, Accepted.