

学 位 論 文 要 旨

氏名 大智 宏祐

題 目 : Exploring novel therapeutics for lung cancer with drug repositioning.
(ドラッグリポジショニングを活用した肺癌に対する新規治療薬の探索)

論文要旨 :

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Significant advances have been made in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) with the development of drugs targeting oncogenic driver mutations or immune checkpoint molecules, which have enabled precision medicine. However, while most molecular-targeted therapies initially show significant effect, acquired resistance to the drugs eventually develops; and efforts are being made to develop complementary therapies to maximize the effects of the targeted therapies or overcome the acquired drug resistance. A variety of resistance mechanisms to anticancer drugs, especially to molecular-targeted drugs, have been elucidated, including second-site mutations in the kinase domain, bypass signaling pathway activation, copy number changes, and histologic transformation, although many questions still remain.

Drug repositioning (or repurposing/reprofiling) is the process of finding new therapeutic indications for existing drugs. It is an attractive approach toward rapid drug discovery and development at a relatively low-cost and high efficiency, because clinical and pharmacokinetic data of existing drugs are already established.

In this study, the effect of monensin on the prevention of drug resistance was examined in chapter 1.

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a key process in tumor progression and metastasis and is also associated with drug resistance. Thus, controlling EMT status is a research of interest to conquer the malignant tumors. In this study, a drug repositioning analysis of transcriptomic data from a public cell line database identified monensin, a widely used in veterinary medicine, as a candidate EMT inhibitor that suppresses the conversion of the EMT phenotype. Using TGF- β -induced EMT cell line models, the effects of monensin on the EMT status and EMT-mediated drug resistance were assessed. The results showed that TGF- β treatment induced EMT in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and the EGFR-mutant NSCLC cell lines with TGF- β -induced EMT acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitor. The addition of monensin effectively suppressed the TGF- β -induced-EMT conversion, and restored the growth inhibition and the induction of apoptosis by the EGFR-tyrosine kinase inhibitor. AS a conclusion, our data

suggested that combined therapy with monensin might be a useful strategy for preventing EMT-mediated acquired drug resistance.

In chapter 2, we assessed the inhibitory effect of tranilast to overcome Cancer-associated fibroblast (CAF)-mediated acquisition of drug resistance in cancer treatment.

CAFs are a major component of the tumor microenvironment that mediate resistance of cancer cells to anticancer drugs. Tranilast is an antiallergic drug that suppresses the release of cytokines from various inflammatory cells. In this study, we investigated the inhibitory effect of tranilast on the interactions between non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and the CAFs in the tumor microenvironment. Three EGFR-mutant NSCLC cell lines, two KRAS-mutant cell lines, and three CAFs derived from NSCLC patients were used. To mimic the tumor microenvironment, the NSCLC cells were cocultured with the CAFs in vitro, and the molecular profiles and sensitivity to molecular targeted therapy were assessed. Crosstalk between NSCLC cells and CAFs induced multiple biological effects on the NSCLC cells both in vivo and in vitro, including activation of the STAT3 signaling pathway, promotion of xenograft tumor growth, induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT), and acquisition of resistance to molecular-targeted therapy, including EGFR-mutant NSCLC cells to osimertinib and of KRAS-mutant NSCLC cells to selumetinib. Treatment with tranilast led to inhibition of IL-6 secretion from the CAFs, which, in turn, resulted in inhibition of CAF-induced phospho-STAT3 upregulation. Tranilast also inhibited CAF-induced EMT in the NSCLC cells. Finally, combined administration of tranilast with molecular-targeted therapy reversed the CAF-mediated resistance of the NSCLC cells to the molecular-targeted drugs, both in vitro and in vivo. Our results showed that combined administration of tranilast with molecular-targeted therapy is a possible new treatment strategy to overcome drug resistance caused by cancer-CAF interaction.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	大智 宏祐
審査委員	主 査：山口大学 教授 水野 拓也
	副 査：山口大学 教授 佐藤 晃一
	副 査：山口大学 教授 島田 緑
	副 査：鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副 査：鳥取大学 教授 岡本 芳晴
題 目	Exploring novel therapeutics for lung cancer with drug repositioning. (ドラッグリポジショニングを活用した肺癌に対する新規治療薬の探索)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>肺癌は、世界のがん死亡原因の第 1 位である。非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療は、発がん性ドライバー変異や免疫チェックポイント分子を標的とした薬剤の開発により大きく進歩し、精密医療が可能になった。しかし、多くの分子標的薬は、始めは大きな効果を示すものの、やがて薬剤に対する耐性を獲得するため、分子標的薬の効果を最大限に発揮させる、あるいは獲得した薬剤耐性を克服するための補完療法の開発が進められている。</p> <p>第 1 章で抗生物質であるモネンシンのチロシンキナーゼ阻害剤による薬剤耐性の獲得防止効果について検討した。薬剤耐性獲得のメカニズムとして、上皮間葉転換 (EMT) がある。EMT は、上皮の特徴から間葉の特徴への表現型の変換であり、細胞内接着と細胞極性の減少、マトリックスマデリングと運動性の増加が見られる。これらの変化は、がん細胞の浸潤と移動という腫瘍転移の挙動をもたらす。TGF-β などを含むいくつかの重要なシグナル伝達経路が関与していると報告されており、EMT は、殺細胞性抗癌剤や分子標的薬による化学療法、放射線療法など、様々な治療法に対する抵抗性に関与することが知られている。本実験において、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) のデータベースからのドラッグリポジショニング分析により、EMT 阻害剤の候補として、獣医学で広く使用されているモネンシンが特定された。そこで、TGF-β 誘導 EMT 細胞株モデルを使用し、EMT 関連タンパクの発現および薬剤耐性に対するモネンシンの効果を評価した。結果として、TGF-β は NSCLC 細胞株で EMT を誘導し、TGF-β により EMT 化した NSCLC 細胞株は EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性を獲得した。モネンシンの添加は、TGF-β 誘導 EMT 化を効果的に抑制し、EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤による薬剤感受性を回復させ、アポトーシス誘導を示した。以上から、モネンシンの併用療法が、EMT を介し獲得した薬剤耐性化を予防するために有用であることが示</p>	

唆された。

第 2 章では、がん治療におけるがん関連線維芽細胞 (CAF) を介した薬剤耐性獲得に対するトラニラストの抑制効果を評価した。CAF は、腫瘍間質の主要な構成要素の一つであり、腫瘍の微小環境に寄与している。CAF はインターロイキン-6 (IL-6)、TGF- β 、上皮成長因子 (EGF) などのサイトカインを放出し、がん細胞の複数のシグナル伝達経路を活性化して、がん細胞の増殖、浸潤、転移、化学療法抵抗性を促進することが明らかになっている。CAF が分泌するサイトカインによりがん細胞の IL-6/STAT3 シグナル伝達経路が活性化し、薬剤耐性獲得に寄与することが報告されている。しかし、近年 CAF による薬剤耐性も注目されている。一方、トラニラストは、さまざまな炎症細胞からのサイトカインの放出を抑制する日本で開発された抗アレルギー薬であり、本研究では、NSCLC と腫瘍微小環境における CAF の相互作用に対するトラニラストの効果について検討した。3 種類の EGFR 変異をもつ NSCLC 細胞株と、2 種類の KRAS 変異をもつ NSCLC 細胞株、および NSCLC 患者由来の 3 種類の CAF を使用した。腫瘍の微小環境を模倣するために、NSCLC 細胞を *in vitro* で CAF と共培養し、分子プロファイルと分子標的療法に対する感受性を評価した。NSCLC と CAF 間の相互作用は、STAT3 シグナル伝達経路の活性化、腫瘍増殖の促進、上皮間葉転換 (EMT) の誘導など、*in vivo* と *in vitro* の両方でがん細胞が薬剤耐性を獲得することが示された。また、トラニラストを加えがん細胞と CAF を共培養することで、CAF からの IL-6 分泌が阻害され、その結果、CAF によるリン酸化 STAT3 の活性化及び EMT 化を阻害することが示された。さらに、トラニラストと分子標的薬の併用療法により、*in vitro* 及び *in vivo* で、分子標的薬に対する肺がん細胞の CAF を介した薬剤耐性獲得を阻害した。本研究の結果は、トラニラストと分子標的薬の併用療法が、腫瘍細胞と CAF の相互作用が引き起こす薬剤耐性を克服する新しい治療戦略となる可能性が示唆された。

以上の研究結果から、モネンシンおよびトラニラストといった別の目的で使用されている薬剤が、NSCLC の分子標的薬に対する薬剤耐性獲得を阻害する効果が示された。いずれの薬剤も FDA において、すでに認可されている薬剤であり、今後の治験を含めた研究はさらにスピードを上げ治療効果が検討されると考えられる。これらの薬剤の併用療法が今後の治療の一つの選択肢となることが期待される。以上により、審査員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。