

MiR-200/ZEB Axis Regulates Sensitivity to Nintedanib in Non-Small Cell Lung Cancer Cells

非小細胞肺癌細胞株における MiR-200/ZEB axis の Nintedanib 感受性促進効果に関する検討

背景： Nintedanib は VEGFR-1-3, PDGFR- α and β , and FGFR-1-3 に対するアンジオキナーゼ阻害薬である。また、Nintedanib は Epithelial- Mesenchymal Transition (EMT) を解除することが知られている。Nintedanib は、既治療進行非小細胞肺癌に対する第Ⅲ相試験でドセタキセルと併用することにより、ドセタキセル単剤と比較して有意に無増悪生存期間を延長することを示した。今回我々は Nintedanib の治療予測因子と EMT 解除による EGFR-TKI の感受性改善効果の検討を行った。

方法： 16 種類の非小細胞肺癌細胞株を用いて MTS assay で Nintedanib に対する各々の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を評価し、感受性の高い 5 つの細胞株を感受性群、感受性の低い 5 つの細胞株を耐性群に分類した。次にチロシンキナーゼリン酸化アレイ解析を行い、両群のチロシンキナーゼリン酸化の差を解析した。更に、マイクロ RNA マイクロアレイ解析を行い、両群のマイクロ RNA の発現の差を解析した。発現に差のあった miR-200b, miR-141, miR-429 の両群における発現量を real time RT-PCR を用いて測定した。また両群の E-cadherin, vimentin, ZEB1 のタンパク発現を western blot を用いて評価した。同様に Nintedanib に一番感受性のある PC1 を用いて、その耐性株 (PC1-R) を樹立し、PC1 の miR-200b, miR-141, miR-429 の発現と E-cadherin, vimentin, ZEB1 のタンパク発現を評価した。miR-200b, miR-141 が Nintedanib 感受性と関連するかを調べるため、元々 Nintedanib 耐性株である A549 と PC1-R に miR-200b と miR-141 を transfection し、MTS assay で Nintedanib 感受性の変化を評価した。最後に Nintedanib による EMT 解除による EGFR-TKI の感受性改善効果を検討するため、A549 に TGF- β (5ng/mL) を曝露し、EMT を生じさせ、その後 Nintedanib を曝露し、EGFR-TKI の感受性を MTS assay で評価した。

結果： 16 種類の非小細胞肺癌細胞株のうち、Nintedanib 感受性群は PC1 (1.0 μ M)、QG56、LK2、EBC1、PC9、耐性群は A549、SQ5、PC3、LC1/sq、LC2/ad (>100 μ M) であった。両群間で Nintedanib の標的である FGFR、PDGFR、VEGFR のリン酸化に有意な差は認めなかったが、miR-200 family である miR-200a, miR-200b, miR-141 の発現が感受性群で有意に高く、また miR-429, miR-200c の発現が感受性群で高い傾向にあった。次に Real-time RT-PCR を行い、感受性群で、miR-200a, miR-200b, miR-429 の発現が高かった。western blot では感受性群で E-cadherin の発現が高く、vimentin, ZEB1 の発現が低かった。PC1-R を用いて同様に Real-time RT-PCR、western blot を行い、PC-1 に比し miR-200b, miR-429, miR-141 の発現は有意に低下し、miR-200a, miR-200c の発現は低い傾向にあり、vimentin, ZEB1、

ZEB2 の発現は上昇した。A549 に miR-141、miR-200b を transfection したところ、control と比較して E-cadherin の発現は上昇し、vimentin、ZEB1 の発現は低下した。また、A549、PC1-R に miR-141、miR-200b を transfection し、Nintedanib を用いて MTS assay を施行したところ、Nintedanib の感受性が有意に改善した。更に、A549 に TGF- β を添加し、EMT を生じさせた後 Nintedanib を曝露させると、EMT は解除された。最後に、TGF- β で EMT 化した A549 を用いて MTS assay で Gefitinib 曝露群と Gefitinib+Nintedanib 曝露群の IC50 を測定し、有意に後方で IC50 の低下を認めた。

結論 : miR-200 family と ZEB1 の発現は非小細胞肺癌における Nintedanib の効果予測因子になりうる事が考えられた。非小細胞肺癌において、EGFR-TKI の耐性化の 1 つである EMT を Nintedanib で解除することで、EGFR-TKI の感受性が改善する可能性が示唆され、今後の新たな肺癌治療戦略の 1 つになりうる事が期待された。