

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06874

研究課題名(和文) EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における癌幹細胞マーカーCD44vの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of cancer stem cell marker CD44v in EGFR-mutated non-small cell lung cancer

研究代表者

岡本 勇 (Okamoto, Isamu)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10411597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異によるリガンド非依存性のEGFRシグナルがROS産生に関連することを示した。EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株では、定常ROS濃度とCD44v発現が相関しており、CD44 v高発現EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株では、CD44vがGSH合成を促進し、ROSに対する防御能に寄与することを示した。更に、CD44 v高発現細胞株にGSH阻害剤を投与すると、シスプラチンによる殺細胞効果が増強された。CD44 v高発現EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌では、CD44v発現はレドックス適応に関連していることを明らかにし、CD44v-GSH機構が治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Activating mutations of the epidermal growth factor receptor gene (EGFR) are oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC), but it has remained unknown whether ligand-independent EGFR signaling conferred by EGFR mutation triggers reactive oxygen species (ROS) generation in NSCLC cells. We showed EGFR signaling due to EGFR mutation increased ROS levels. The expression of CD44v isoforms was found to be inversely correlated with basal ROS levels in EGFR-mutated NSCLC cell lines. Knockdown of CD44v induced depletion of intracellular glutathione (GSH) and increased ROS levels in EGFR-mutated NSCLC cells that express CD44v at a high level (CD44vhigh). In addition, depletion of GSH enhanced the cytotoxicity of cisplatin in CD44vhigh EGFR-mutated NSCLC cells. Knockdown of CD44v also enhanced cisplatin cytotoxicity in CD44vhigh EGFR-mutated NSCLC cells. Our results thus implicate CD44v in redox adaptation and as a potential target for treatment in CD44vhigh EGFR-mutated NSCLC cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：CD44バリエーション(CD44v) 活性酸素 上皮成長因子受容体(EGFR) 非小細胞肺癌 グルタチオン 抗癌剤感受性

1. 研究開始当初の背景

多くの癌種では正常細胞と比較して、活性酸素(ROS)が高濃度であることが知られている。ROS濃度が中等度であると、種々の癌の進行に関するシグナルが活性化され、癌細胞の生存や進行が促されるが、ROSが極めて高濃度になると、細胞は不可逆性の酸化損傷を受ける。そのため、レドックスバランスの制御は、癌細胞にとって重要である。癌細胞の内臓酸化ストレスについて、正確な機序は分かっていないが、RASやBCR-ABL、MYCのような癌遺伝子の発現によって、ROS産生が誘導されることが報告されている。上皮成長因子受容体(EGFR)は様々な癌種で高発現しているが、リガンドのEGFによるEGFR活性化はROS濃度の上昇を促す。非小細胞肺癌において、EGFR遺伝子変異は、リガンド非依存性にEGFRを活性化させ、ドライバー遺伝子として同定されている。しかしながら、非小細胞肺癌細胞株において、EGFR遺伝子変異によるEGFRの活性化が、ROS産生を誘導するかは分かっていない。

2. 研究の目的

EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株におけるレドックスバランスの維持に関して、発癌に関与するEGFRシグナルとCD44v発現に関連があるかを調べた。また、EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株において、CD44vを介したレドックスバランスの変化が、化学療法への感受性に影響するか検討した。

3. 研究の方法

細胞培養と試薬

ヒト非小細胞癌細胞株(PC9、H1650、HCC827、A549、H23、H2122、H1437、H1573、H1944)とHEK293T細胞はAmerican Type Culture Collectionから購入し、11-18細胞は、九州大学の前原教授より譲渡された。PC9、H1650、HCC827細胞は活性型変異であるEGFRエクソン19欠失変異(Ex19del)、11-18細胞はEGFRエクソン21L858R変異を有している。他の非小細胞癌細胞株はすべてEGFR野生型である。これらの細胞株は、加湿された37°C、5%CO₂の環境下で、最終濃度10%牛胎児血清(FBS)を添加したRPMI 1640培地(Gibco, Carlsbad, CA, USA)、又はDulbecco's modified Eagle's medium培地(Gibco)で培養された。EGFの投与については、EGF投与前日までに、細胞をディッシュに80~90%コンフルエントに培養し、PBSで洗浄後、無血清培地で一晩培養し、組換え型ヒトEGF(Peprotech社より購入)を投与した。エルロチニブ(Selleck Chemicals社より購入)は、dimethyl sulfoxide(DMSO)(Wako社より購入)で溶解し、-20°Cで保存し、2週以内に使用した。Buthionine-[S, R]-sulfoximine(BSO)、N-acetyl-L-cysteine(NAC)、シスブ

ラチンはCayman Chemical社、Sigma-Aldrich社、日医工からそれぞれ購入した。

プラスミドの導入

EGFRエクソン19欠失変異(E746-A750)プラスミド(pBabe-19del)、ヒトEGFR野生型プラスミド(pBabe-EGFR-WT)は、Addgene社から購入し、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(タカラバイオ社より購入)を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増殖させた。PCR産物は、シークエンスで配列を確認し、In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech社より購入)を用いて、Xho I、Kpn I間でpcDNA3.1ベクター(Invitrogen社より購入)と結合させた。HEK293T細胞への発現ベクターの導入は、Lipofectamine 3000 reagent(Life Technologies社より購入)を用いて、48時間かけて行った。

RNA干渉

細胞を24時間培養し、RNAiMAX reagent(Life Technologies社)を用いて、低分子干渉RNA(siRNA)を48時間かけて導入した。siRNA(日本バイオサービス社より購入)は、以下の配列を利用した。CD44 #1 : 5'-AAAUGGUCGCUACAGCAUUCTT-3'、5'-GAUGCUGUAGCGACCAUUUTT-3、CD44 #2 : 5'-GUAUGACACAUAUUGCUUCTT-3'、5'-GAAGCAAUAUGUGUCA UACTT-3'、コントロール配列 : 5'-AGCAAAUCGCGUGCAUCAUTT-3'、5'-AUGAUGCACGCGAUUUGCUTT-3'。論文中的数据は、CD44 #1 siRNAを用いたものであるが、CD44 #2 siRNAを用いた場合も結果は同様であった。

フローサイトメトリー解析

マウス由来の抗ヒトCD44v9モノクローナル抗体(Cosmo Bio社より購入)を用いて、細胞を4°C下で30分染色した。その後、FACS Verse(BD Biosciences社)で、フローサイトメトリー解析を行った。

イムノブロット解析

細胞をPBSで洗浄後、SDSサンプルバッファー(組成:2% SDS、10%グリセロール、50 mM Tris-HCl [pH 6.8]、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤カクテル)で溶解、95°Cで5分間インキュベートした後に、ブROMOFENOLブルーとジチオトレイトール(最終濃度100 mM)を添加した。蛋白はBCAアッセイ(Thermo Fisher Scientific社)で定量した。等量の蛋白抽出液をSDSポリアクリルアミドアシドゲル電気泳動(SDS-PAGE)し、分離した蛋白をポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。転写後のメンブレンは、ウサギ由来ポリクローナル抗体である各種1次抗体(抗Y1068-リン酸化ヒトEGFR、総EGFR、抗xCT、抗β-actin抗体(Cell Signaling Technology社より購入)、CD44細胞内ドメインを認識する抗CD44抗体(CD44cyto)(Trans Genic社より購入))で

反応後、HRP(horseradish peroxidase)標識 2 次抗体(GE Healthcare 社より購入)で反応させた。その後、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific 社)を添加し、ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で解析した。

ROS 濃度の測定

細胞内 ROS 濃度はジクロロフルオレセイン (DCF)染色を用いて測定した。細胞を 5 μ M H₂DCFDA (Life Technologies) を用いて、37°C下で 15 分反応させ、その蛍光強度を、PerkinElmer ARVO X3 (PerkinElmer 社) または FACS Verse (BD Biosciences)で解析した。

GSH 測定

細胞内 GSH 濃度は、GSH-Glo Glutathione アッセイ (Promega 社)を用いて測定した。このアッセイは、GSH-トランスフェラーゼによって、GSH 存在下でルシフェリン誘導体がルシフェリンに変換される反応がベースとなっている。生成したルシフェリンは、ホタルルシフェラーゼとの共役反応で検出され、生じたシグナルはサンプルの GSH 量に比例する。96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 3 \times 10³ 個の細胞を撒いた 24 時間後、本アッセイを行い、発光シグナルを、Flex station3 (Molecular Devices 社)を用いて検出した。本アッセイの結果は、キットに添付の GSH 標準液を用いて、補正した。

細胞毒性試験

96 ウェルプレートに細胞を撒き、薬剤を表記通りに投与した。その後、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社)を用いた MTS アッセイで細胞の生存率を評価した。

配列解析

All Prep Kit (Qiagen 社)を用いて、非小細胞肺癌細胞株(PC9, H1650, 11-18) から DNA を抽出した。NF-E2-related factor 2 gene (*NRF2*)の恒常的な活性化を引き起こすことが報告されている、*NRF2*エクソン 2 を標的としたプライマーを用いて[24]、ポリメラーゼ連鎖反応で DNA を増幅させた。ポリメラーゼ連鎖反応による産物は、ABI Prism 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems 社) と BigDye Terminator Kit (version 3.1, Applied Biosystems 社より購入)を用いて、配列を確認した。

4. 研究成果

活性型 *EGFR* 変異による *EGFR* シグナルが ROS 産生を誘導する

活性型 *EGFR* 変異の細胞内 ROS 濃度に対する影響を調べるため、HEK293T細胞に、ヒト *EGFR* エクソン 19 欠失変異 (E746-A750) ベクターを導入し、強制発現させた。抗リン酸化 *EGFR* 抗体または抗総 *EGFR* 抗体を用いて、イムノブロット解析を行い、ベクターを導入した HEK293T 細胞で、*EGFR* のリン酸化が認められることを確認した。ROS 感受性プロ

ブである H₂DCFDA を用いて、*EGFR* 活性化は、ROS 濃度を有意に上昇させ、その上昇は *EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤であるエルロチニブによって有意に低下することを示した (Figure 1)。これらのデータから、活性型 *EGFR* 変異による *EGFR* シグナルが、ROS 産生を促進することが示唆された。

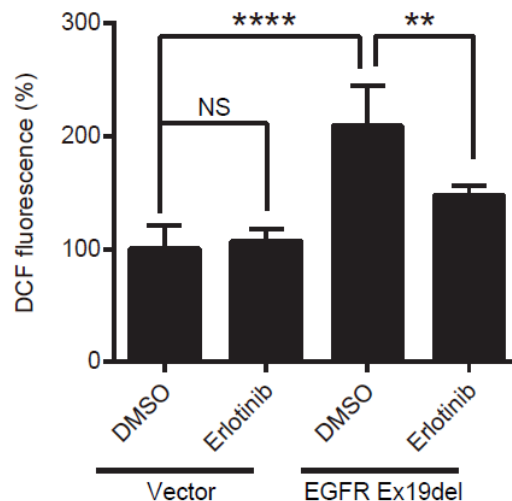


Figure 1: *EGFR* 遺伝子変異によるリガンド非依存性の *EGFR* シグナルは細胞内 ROS 濃度を上昇させる。

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株において、CD44v 発現は GSH を介して、ROS 濃度を制御する。

我々は次に、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株 (PC9, H1650, HCC827, 11-18) の定常 ROS 濃度を調べた。PC9, H1650 細胞の定常 ROS 濃度は、ほとんどの *EGFR* 野生型細胞株と比較して、同等あるいは低濃度であるのに対し、HCC827, 11-18 細胞では野生型と比較して高濃度であった。*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株の ROS 濃度に多様性が見られたことから、癌発生に関わる *EGFR* シグナル以外にも、レドックスバランスに関連する機序があることが示唆された。

CD44v は、癌の ROS に対する防御能に関連しているため、我々は、様々な非小細胞肺癌細胞株の CD44v 発現を評価した。定常 ROS 濃度が低い PC9・H1650 細胞では、HCC827・11-18 細胞や *EGFR* 野生型非小細胞肺癌細胞株と比べ、CD44v は強発現していた。*EGFR* 野生型非小細胞肺癌細胞株では CD44v 発現と定常 ROS 濃度に関連は見られなかったが、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株では、CD44v の発現は定常 ROS 濃度と逆相関していた ($r = -0.983$)。これらの所見から、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株において、CD44v 発現が ROS 濃度を制御している可能性が示唆された。

CD44v はシスチン-グルタミン酸トランスポートター-xc(-)のサブユニットである xCT 蛋白質を安定化させ、シスチンの細胞内への取

り込みを促進することで、細胞内のアンチオキシダントである GSH の合成を促進し、ROS に対する防御能を高めている [23] [25] [26]。そこで、我々は *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株の GSH 濃度を調べた。CD44v 低発現(CD44v^{low})の HCC827・11-18 細胞と比べ、CD44v 高発現(CD44v^{high}) の PC9・H1650 細胞では、GSH は有意に高濃度であった。次に、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株で、CD44v をノックダウンした場合に、細胞内 GSH 濃度・ROS 濃度が変化するかを調べた。フローサイトメトリー解析、及びイムノプロット解析で、CD44 siRNA 導入により CD44v 発現が抑制されることを確認した。CD44v 発現を抑制すると、CD44v^{high} の PC9・H1650 細胞で、細胞内 GSH 濃度は有意に減少し、ROS 濃度は有意に上昇した。CD44v 発現を抑制すると、xCT の発現も低下したことから、GSH 濃度と ROS 濃度の変化に xCT が関連していると考えられた。それに対し、CD44v^{low} の 11-18 細胞では、CD44v 発現を抑制しても、GSH 濃度・ROS 濃度の有意な変化はみられなかった。これらの結果から CD44v^{high} *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株において、CD44v は GSH 合成を促進することで、ROS に対する防御能を高めていることが示唆された。一方で、CD44v^{low} *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株では、CD44v は GSH 合成促進やそれに伴う ROS 上昇に関連していないと考えられた。

CD44v^{high} *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株において、CD44v-GSH 機構を標的にすると、シスプラチンの感受性が高くなる

CD44v^{high}・CD44v^{low} *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株において、GSH がレドックスバランス制御に関連するか調べるために、我々は、GSH 抑制に伴うレドックスバランスの変化を評価した。PC9、H1650、11-18 細胞に強力な GSH 合成阻害剤である BSO を投与した。BSO 投与後、CD44v^{high} 細胞(PC9・H1650)、CD44v^{low} 細胞(11-18) の双方で、細胞内 GSH 濃度が 80% 低下した。しかしながら、CD44v^{low} 細胞では ROS 濃度の上昇はわずかであり、CD44v^{high} 細胞でのみ、高度の ROS 濃度上昇が見られた。BSO 投与後の CD44v^{high} 細胞で ROS が著明に上昇したことから、CD44v^{high} 細胞におけるレドックスバランス制御は、GSH 依存性であると考えられた。癌細胞は、ROS を低く維持することで、抗がん剤への抵抗性を高めている。これまでに、様々な癌種で、GSH 抑制により ROS 産生を誘導することで、シスプラチン(CDDP)に対する感受性が上昇することが示されてきた。上記の通り、CD44v^{high} 細胞と CD44v^{low} 細胞で、BSO 投与後の ROS 変化の程度に差がみられたことから、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で、CD44v 発現強度が CDDP の感受性に影響するかどうかを調べた。CD44v^{high} 細胞(PC9・H1650)と CD44v^{low}

細胞(11-18)に、BSO を投与後、臨床で使用可能な範囲で、様々な濃度の CDDP を投与した。細胞生存を評価する実験では、BSO による有意な CDDP の感受性上昇は、CD44v^{low} 細胞では認められず、CD44v^{high} 細胞でのみ認められた (Figure2)。更に、PC9・H1650 細胞で、BSO による CDDP の殺細胞効果の上昇は、アンチオキシダントである NAC によって相殺された (Figure2) が、この所見は重要であり、CDDP と BSO の相乗効果はレドックスバランスの変化に起因するものであると考えられる。次に、CD44v がレドックスバランス制御を介して、CDDP の感受性に関連しているかを調べるため、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株で、RNA 干渉により CD44v 発現を抑制した。CD44v^{high} 細胞(PC9、H1650)で CD44v 発現を抑制すると、CDDP の殺細胞効果は有意に上昇したが、CD44v^{low} 細胞(11-18)では、CD44v 発現を抑制しても、CDDP の殺細胞効果に有意な上昇は見られなかった。これらの結果から、CD44v-GSH 機構の抑制によって誘導される ROS 集積が CDDP の感受性を増強させる現象は、CD44v 高発現の *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株で特異的に見られることが示唆された。

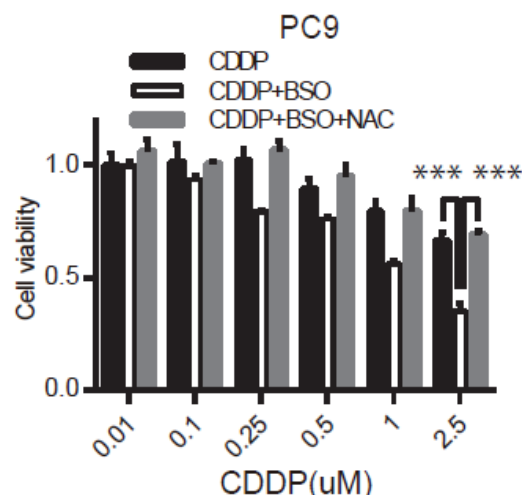


Figure2. CD44v^{high} *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株で GSH を抑制すると CDDP の感受性が増強する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Kawano Y., Iwama E., Tsuchihara K., Shibahara D., Harada T., Tanaka K., Nagano O., Saya H., Nakanishi Y. & Okamoto I.

CD44 variant-dependent regulation of redox balance in *EGFR*-mutation-positive non-small cell lung cancer: a target for treatment

Lung Cancer 113(7) 72-78(2017)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

①河野 裕子、岡本 勇、原田 大志、岡本龍郎、土橋 賢司、永野 修、佐谷 秀行、中西 洋一、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における CD44 variants の発現解析、平成 27 年 10 月 8 日～10 日、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋

②河野 裕子、岡本 勇、大坪 孝平、中西洋一、佐谷 秀行、進行非小細胞肺癌における癌幹細胞を標的とした治療開発 平成 28 年 5 月 30～6 月 1 日、第 20 回 日本がん分子標的治療学会学術集会、大分

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:掲載なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 勇 (OKAMOTO ISAMU)

九州大学病院呼吸器科・講師

研究者番号: 10411597

(2) 研究分担者

中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)

九州大学病院呼吸器科・教授

研究者番号: 20172356

原田 大志 (HARADA TAISHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 10380619

(平成 29 年度より研究協力者)

田中 謙太郎 (TANAKA KENTARO)

九州大学病院呼吸器科・助教

研究者番号: 00536849

岩間 映二 (IWAMA EIJI)

九州大学病院呼吸器科・助教

研究者番号: 40567343

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし