

平成 30 年 4 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K09579

研究課題名(和文) 肺腺がんにおけるROR1によるカベオラ形成を標的としたEGFR-TKI耐性の克服

研究課題名(英文) ROR1 functions as a scaffold of cavin-1 and CAV1, sustaining caveolae and RTK-mediated survival signaling in lung cancer

研究代表者

山口 知也 (YAMAGUCHI, TOMOYA)

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：70452191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、細胞膜にカベオラ構造が形成される上で必須なCAV1とCAVIN1との結合を、ROR1がキナーゼ活性非依存的に両者に対するスキヤフォールド蛋白質として機能して、CAV1のライソソームへの移動と分解を防ぐ役割を持つことを見出した。さらに、ROR1がカベオラ構造の維持を通じて、カベオラに集積するEGFRやMET、IGF-IRなど様々なRTKからPI3K-AKTへのシグナリングを維持し、肺腺癌細胞の生存シグナルを担っていることを明らかにした。このことから、腫瘍特異性を有するROR1を分子標的とすることで、様々なRTKの活性化を一網打尽に抑制することが可能であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：ROR1 sustains prosurvival signaling directly downstream of the lineage-survival oncogene TTF-1 in lung adenocarcinoma. In this study, we report an unanticipated function of this receptor tyrosine kinase (RTK) as a scaffold of CAVIN1 and CAV1, two essential structural components of caveolae. This kinase-independent function of ROR1 facilitates the interactions of CAVIN1 and CAV1 at the plasma membrane, thereby preventing the lysosomal degradation of CAV1. Caveolae structures and prosurvival signaling towards AKT through multiple RTKs are consequently sustained. We also provide mechanistic insight into how ROR1 inhibition can overcome EGFR-tyrosine kinase inhibitor resistance due to bypass signaling via diverse RTKs such as MET and IGF-IR, which is currently a major clinical obstacle. Considering its onco-embryonic expression, inhibition of the scaffold function of ROR1 in patients with lung adenocarcinoma appears to be an attractive approach to better treating this devastating cancer.

研究分野：がん生物学

キーワード：肺腺がん ROR1 カベオラ EGFR-TKI 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

近年、我々は世界に先駆けて TTF-1 により特異的に転写活性化される遺伝子として受容体型チロシンキナーゼ (RTK) である ROR1 を同定した (Yamaguchi T, *et al*, *Cancer Cell*, 2012)。ROR1 が、肺腺癌において TTF-1 によるリネジ特異的生存シグナルを担うことを明らかとし、肺腺癌の生存に必須な分子であることを示した。

さらに重要なことに、EGFR-TKI に対する EGFR の二重変異の存在や、HGF や IGF-II の過剰発現あるいは MET 遺伝子増幅等の存在の有無等に関わらず、ROR1 の抑制は EGFR-TKI 耐性肺腺癌細胞にアポトーシスを誘導し、有意に増殖を阻害することを明らかとした。

しかしながら、EGFR 以外の様々な RTK によるバイパスパスウェイの活性化にどのようにして ROR1 が関わっているのかについては不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、肺腺癌の生存シグナル維持における ROR1 を介した他の様々な RTK の詳細な制御機構を明らかにすることであり、さらに他の RTK によるバイパス経路によって獲得した EGFR-TKI 耐性細胞株での、新たな ROR1 機能の抑制による耐性克服に基づいた、極めて独自性の高い革新的な分子標的薬としての臨床的有望性を示すことである。

3. 研究の方法

(1) ROR1 発現抑制による CAV1 発現低下に伴うカベオラ形成への影響に関する検討

これまでの我々の研究から肺腺癌細胞 NCI-H1975 において ROR1 の発現を抑制させるとカベオラ構成分子である CAV1 のタンパク質レベルの発現が有意に低下することを見出している。そこで、実際の肺腺癌細胞株 NCI-H1975 の細胞膜において、ROR1 の発現抑制によってカベオラの形成がどのような影響を受けるのかについて、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を用いた電子顕微鏡による観察を行った。また、細胞膜上のカベオラの形成数について、ランダムな細胞膜上の領域で定量的な測定を行った。

(2) ROR1 の CAV1、および CAVIN1 の結合領域が与える CAV1 発現への影響に関する検討

これまでの検討において、肺腺癌細胞株において、ROR1 の発現を抑制すると、有

意にタンパク質レベルの CAV1 の発現が低下することが分かっている。また様々な肺腺癌細胞株を用いた検討から、ROR1 は CAV1 や CAVIN1 と直接結合することを見出した。このことから、CAV1、あるいは CAVIN1 各々の ROR1 結合部位を欠損させた ROR1 欠損変異体を作製し、肺腺癌細胞株 PC-9 に発現させたときの CAV1 の発現への影響について解析を行った。各々の ROR1 結合部位欠損変異体には siROR1 に対する silent mutation を加え、siROR1 に対して抵抗性を持たせた。それぞれの ROR1 欠損変異体を PC-9 細胞に発現させ、siROR1 処理を行い、内因性の ROR1 の影響を排除することで、ROR1 欠損変異体の直接的な効果を評価した。CAV1 の発現への影響については、ウエスタンブロッティング法により解析を行った。PC-9 細胞株には、VC (ベクターコントロール)、ROR1-WT (野生型 ROR1)、ROR1-WTm (silent mutation を加えた野生型 ROR1)、ROR1-TK Δ 2+TK Δ 3m (silent mutation を加えた CAVIN1 が結合できない ROR1)、ROR1- Δ S/T2m (silent mutation を加えた CAV1 が結合できない ROR1) を発現させ、CAV1 のタンパク質レベルの発現について比較・検討を行った。

(3) 肺腺癌細胞での ROR1 発現抑制による CAV1 と CAVIN1 の相互作用への影響に関する検討

肺腺癌細胞 NCI-H1975 において ROR1 の発現を抑制させると、CAV1 の発現は低下するが、siROR1 を処理してから 24 時間後では CAV1 のタンパク質レベルの発現に影響は認められないことを確認している。CAV1 と CAVIN1 の相互作用はカベオラの形成に必須であることから、CAV1 と CAVIN1 の結合に ROR1 が影響を与えるかどうかについて免疫沈降法により検討を行った。

(4) 肺腺癌細胞での ROR1 発現抑制による CAV1 の細胞内局在への影響に関する検討

同様に、肺腺癌細胞 NCI-H1975 において ROR1 発現抑制の後、CAV1 の発現が安定している 24 時間後において CAV1 の細胞内局在を詳細に観察した。

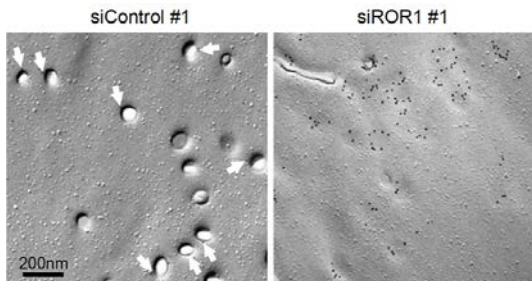
4. 研究成果

(1) ROR1 発現抑制による CAV1 発現低下に伴うカベオラ形成への影響に関する検討

通常の電子顕微鏡解析では、定量性を有した形態学的機能解析が難しいが、連携研究者である藤本豊士博士 (名古屋大学) は電子顕微鏡解析の専門家であり、カベオラ

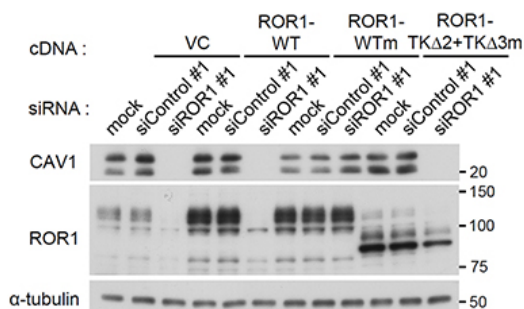
研究のエキスパートである。そこで連携研究者の支援下、動的な細胞膜を2次元の平面として広く観察でき、空間統計学的方法で評価・比較することが可能となる急速凍結・凍結割断レプリカ標識法を用いた電子顕微鏡による観察を行った。その結果、肺腺癌細胞株 NCI-H1975 において ROR1 の発現を抑制すると、細胞膜でのカベオラの特徴的な窪みが消失或いは、ごく浅い窪みを呈し、カベオラ構造物の数の有意な低下をきたすことが判明した(下図)。カベオラの標識は ROR1 によって影響を受けない CAV2 で行い、ROR1 の発現抑制によって、金コロイド標識した CAV2 がカベオラの痕跡らしき構造物(窪みが浅い構造物)に集積していた。

これらの結果から、肺腺癌細胞において ROR1 の発現が正常なカベオラの形成に必要不可欠であることが判明した。



(2) ROR1 の CAV1、および CAVIN1 の結合領域が与える CAV1 発現への影響に関する検討

肺腺癌細胞において CAVIN1 は ROR1 のキナーゼドメイン内の C 末から 2/3 の領域と結合する。また CAV1 は ROR1 の C 末側のセリン・スレオニンリッチドメインと結合する。そこで各々の結合する部位を欠損させた ROR1 欠損変異体を肺腺癌細胞 PC-9 に発現させ、CAV1 の発現への影響について検討を行った結果、VC や ROR1-WT を発現させた細胞では、siROR1 によって CAV1 の発現低下が顕著に認められ、ROR1-WTm を発現させると CAV1 の発現がレスキューされることを確認した。しかしながら、CAVIN1 が結合できない ROR1 を発現させた場合 (ROR1-TKΔ2+TKΔ3m)、ROR1-WTm とは対照的に CAV1 の発現の回復が見られなかった(下図)。



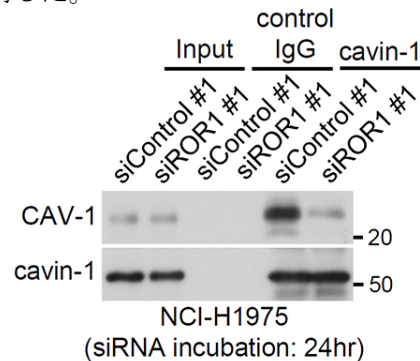
また同様に、CAV1 が結合できない ROR1 を発現させた場合 (ROR1-ΔS/T2m) においても CAV1 の発現が回復されないことが分かった。

これらの結果から、CAVIN1、あるいは CAV1 が結合する ROR1 の結合部位は、CAV1 のタンパク質レベルの発現の安定化に必須であることが判明した。

(3) 肺腺癌細胞での ROR1 発現抑制による CAV1 と CAVIN1 の相互作用への影響に関する検討

カベオラ構成分子である CAVIN1 と CAV1 は互いに相互作用することで CAV1 の発現の安定化、つまりはカベオラ形成に重要であることが理解されている。そこで ROR1 が CAVIN1 と CAV1 の相互作用に影響を与えるかどうかについて検討を行った。CAV1 のタンパク質レベルの発現が維持している siROR1 処理後 24 時間後において、CAVIN1 と CAV1 の結合について免疫沈降法を用いて解析を行ったところ、siControl 処理群と比較して、両者の結合が有意に阻害されることが判明した(下図)。

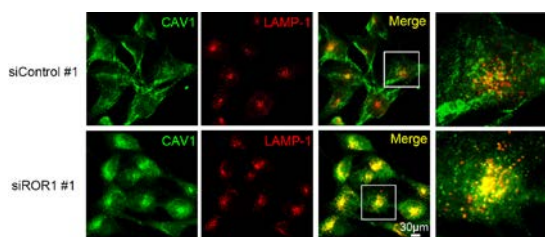
これらの結果から、肺腺癌細胞において ROR1 は CAVIN1 と CAV1 の相互作用を安定化させることで、CAV1 の発現の維持、カベオラ形成の維持に関与していることが判明した。



(4) 肺腺癌細胞での ROR1 発現抑制による CAV1 の細胞内局在への影響に関する検討

同様に肺腺癌細胞 NCI-H1975 において ROR1 発現抑制の 24 時間後の CAV1 の細胞内局在に関して共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、siROR1 処理した細胞では、CAV1 の局在が細胞質のある一部分に集積した局在が観察され、この集積部分は、ライソソームのマーカーである LAMP1 と一部共局在することが分かった(下図)。

これらの結果から、肺腺癌細胞において ROR1 は、CAV1 タンパク質がライソソームによって分解されないように安定化に働いていることが判明した。



以上の研究結果から、肺腺癌細胞において ROR1 は、細胞膜にカベオラ構造が形成される上で必須な CAV1 と CAVIN との結合を両者に対するスキヤフォールドタンパク質として機能することで、CAV1 のライソソームへの移動と分解を防ぐ役割を持つことが分かった。さらに、これまでの研究も踏まえると、ROR1 がカベオラ構造の維持を通じて、カベオラに集積する EGFR や MET、IGF-IR など様々な RTK から PI3K-AKT へのシグナリングを維持し、肺腺癌細胞の生存シグナルを担っていることが明らかとなった。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Tomoya Yamaguchi, Can Lu, Lisa Ida, Kiyoshi Yanagisawa, Jinglei Cheng, Hisanori Isomura, Motoshi Suzuki, Toyoshi Fujimoto, Takashi Takahashi
ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1
第 69 回日本細胞生物学会大会
仙台国際センター、日本
(2017 年 6 月 13 日～2017 年 6 月 15 日)
- (2) 山口知也、高橋隆
ROR1, a transcriptional target of TTF-1/NKX2-1 oncogene, sustains lineage-survival signaling in lung adenocarcinoma
第 75 回日本癌学会学術総会
パシフィコ横浜、日本
(2016 年 10 月 6 日～2016 年 10 月 8 日)
- (3) Tomoya Yamaguchi, Can Lu, Lisa Ida, Kiyoshi Yanagisawa, Jiro Usukura, Yukako Shimada, Hisanori Isomura, Motoshi Suzuki, Toyoshi Fujimoto, Takashi Takahashi
ROR1 functions as a scaffold of cavin-1 and CAV1, sustaining caveolae and RTK-mediated survival signaling in lung cancer

第 41 回 内藤コンファレンス
シャトレゼガトーキングダム札幌、
日本
(2016 年 7 月 5 日～2016 年 7 月 8 日)

- (4) 山口知也、高橋隆
ROR1 による肺腺癌のリネジ生存シグナル伝達とカベオラ形成を標的とした EGFR-TKI 耐性の克服
第 31 回日本肺癌学会ワークショップ
(招待講演)
ホルトホール大分、日本
(2016 年 7 月 2 日)
- (5) Tomoya Yamaguchi, Can Lu, Lisa Ida, Kiyoshi Yanagisawa, Jiro Usukura, Jinglei Cheng, Naoe Hotta, Yukako Shimada, Hisanori Isomura, Motoshi Suzuki, Toyoshi Fujimoto, Takashi Takahashi
ROR1 sustains caveolae and RTK-mediated survival signaling as a scaffold of cavin-1 and CAV1 in lung cancer
AACR ANNUAL MEETING 2016
(国際学会)
ニューオリンズ、アメリカ
(2016 年 4 月 16 日～2016 年 4 月 20 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：癌細胞の生存シグナルを特異的に抑制する化合物のスクリーニング方法及びスクリーニングキット、形質転換体、組み換えベクター、並びに、分子標的薬の適応患者の選択方法
発明者：高橋隆、山口知也
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2017-010775
出願年月日：2017 年 1 月 24 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

- 名古屋大学
(研究代表者; ~2016 年 10 月)
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/molcar/jp/index.html>
- 名古屋大学
(連携研究者)
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index-j.html>
- 熊本大学
(研究代表者; 2016 年 11 月～)
<http://kumamoto-cancerbiology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 知也 (YAMAGUCHI, Tomoya)
熊本大学・大学院先導機構・准教授
研究者番号：70452191

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤本 豊士 (FUJIMOTO, Toyoshi)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50115929

(4) 研究協力者

なし