

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19461

研究課題名(和文)肺サーファクタント蛋白質Dによる変異型EGFR制御機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR

研究代表者

長谷川 喜弘 (Hasegawa, Yoshihiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90643180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はSP-Dが野生型EGFRの糖鎖に結合し、リガンド結合を阻害することで、EGFシグナルを抑制することを報告した。また変異型EGFRの肺腺がん患者の解析では、血清SP-D高値群で全生存期間が延長していた。本課題では、SP-Dはリガンド非依存性の変異型EGFRのシグナルを抑制することがわかった。SP-Dは変異型EGFRのリガンド非依存性の二量体形成を阻害するだけでなく、二量体形成非依存性の活性も抑制した。SP-DとEGFR-TKIを併用すると相加的な細胞増殖抑制効果を認めた。SP-Dの変異型EGFR抑制作用は、血清SP-D高値の患者の良好な予後に繋がっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that SP-D suppressed wild-type EGFR signaling by blocking ligand binding to EGFR. Analysis of patients with lung adenocarcinoma to examine associations between serum SP-D levels and clinical outcome indicated that in TKI-treated patients with lung cancer harboring EGFR mutations, high serum SP-D levels correlated with prolonged overall survival. We herein demonstrate that SP-D downregulates ligand-independent signaling in cells harboring EGFR mutations. SP-D inhibits ligand-independent dimerization of EGFR mutants and dimerization-independent activation of EGFR mutants. SP-D augmented the viability-suppressing effects of EGFR-TKIs. It is possible that the suppressive effects of SP-D on EGF signaling might be implicated in improved clinical outcomes in patients with EGFR mutant lung cancer and high serum SP-D levels.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺サーファクタント蛋白質D 変異型EGFR 肺がん 糖鎖 レクチン

1. 研究開始当初の背景

上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) は EGFR のチロシンキナーゼドメインに遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に対する治療の中心となっているが、変異型 EGFR 肺癌に対する一次治療で細胞障害性抗がん剤と EGFR-TKI のどちらを選択すべきか明確な基準は確立されておらず、未だ議論の分かれるところである。また EGFR-TKI の奏効例もやがて例外なく耐性を獲得してしまうという問題があり、耐性化の克服も重要な課題となっている。

肺サーファクタントは肺胞Ⅱ型細胞で合成され、肺胞および気管支の表面を覆うリポ蛋白質で、肺胞虚脱を防ぐとともに、下気道の生体防御を担っている。生体防御レクチンである肺サーファクタント蛋白質 D (SP-D) は SP-A と共に自然免疫において中心的な役割を果たしている。申請者は SP-D が野生型 EGFR の自己リン酸化と下流シグナルを抑制し、肺腺がん細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制することを報告した。SP-D は糖鎖認識領域を介して EGFR の細胞外ドメインに存在するオリゴマンノース型糖鎖に結合することで、EGF と EGFR の結合を阻害するという作用機序を明らかにした。

当学呼吸器・アレルギー内科で加療を受けた肺腺がん患者 121 人の解析で、EGFR-TKI を投与した変異型 EGFR の患者群において、治療前の血清 SP-D 高値群 (50 ng/ml) は低値群 (< 50 ng/ml) と比較し、全生存期間と無増悪生存期間が有意に延長していることがわかった。SP-D の EGF シグナル抑制作用は変異型 EGFR に対してより重要な意義を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、EGFR-TKI 感受性および耐性の様々な変異型 EGFR に対する SP-D の抑制作用を明らかにした上で、作用機序を解

明し、臨床応用につながる知見を得ることを目指した。具体的には以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) SP-D の変異型 EGFR シグナルへの影響を明らかにする

EGFR-TKI 感受性のエクソン 19 の欠失変異 (Del 19)、コドン 858 の点変異 (L858R)、EGFR-TKI 耐性のコドン 790 の点変異 (T790M) といった変異型 EGFR の自己リン酸化と下流シグナルへの影響を明らかにする。また細胞増殖・遊走・浸潤に与える影響を評価する。

(2) SP-D の変異型 EGFR のリガンド依存性・非依存性の二量対形成に対する作用を明らかにする

変異型 EGFR はリガンドや二量体形成への依存度が変異の種類によって異なるとされている。SP-D は EGFR のリガンド依存性および非依存性の二量体形成を阻害するのか、様々な変異型 EGFR で検討する。

(3) 変異型 EGFR の二量対形成非依存性の活性に対する SP-D の作用を明らかにする

二量対形成に依存せずに活性化するとされている変異型 EGFR の報告もある。それらの変異体を作成し、単量体で活性化している変異型 EGFR に SP-D は影響を及ぼすのか検討する。

(4) SP-D と EGFR-TKI の併用効果を明らかにする

EGFR-TKI 感受性および耐性の肺癌細胞株に対して、SP-D と EGFR-TKI には併用効果がないかを検討する。

(5) 肺内における EGFR と SP-D の局在を明らかにする

正常肺では基底膜側に局在する EGFR と血

中や間質に存在する SP-D との相互作用が恒常性の維持に寄与していると考えられる。一方、肺がんでは病態の進展に伴う肺構造の破壊により、肺胞腔内の大量の SP-D とがんに過剰発現した EGFR との間に相互作用が生じる可能性を想定している。患者由来の肺がん組織を免疫染色することで両者の相互作用の場を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) リコンビナントヒト SP-D の精製と変異型 EGFR 安定発現 CHOK1 細胞の確立

リコンビナントヒト SP-D は CHOK1 細胞を用いたグルタミン合成酵素増幅系で発現させ、培養液中に分泌された SP-D をマンノースセファロースカラムで分離精製した。Del19、L858R、T790M といった変異型 EGFR は QuickChange 部位特異的突然変異導入キットを用いて作成した。また二量体形成を阻害する細胞内キナーゼドメインの点変異 (L704R、I941R) を同様の方法で追加導入した。Flp-IN システムを用いた発現系によりこれらの変異型 EGFR 安定発現 CHOK1 細胞を樹立した。

(2) SP-D の変異型 EGFR シグナルへの影響の検討

SP-D の EGFR シグナルへの影響について、EGFR-TKI 感受性の Del19、L858R、および耐性の Del19/T790M、L858R/T790M の各変異型 EGFR を安定発現させた CHOK1 細胞を用い、Western Blot 法で検討した。同様に EGFR-TKI 感受性のヒト肺腺がん細胞株 HCC827 細胞、HCC4006 細胞 (ともに Del19) と H3255 細胞 (L858R)、EGFR-TKI 耐性の H1975 細胞 (L858R/T790M) でも同様に Western Blot 法で検討した。また HCC827 細胞、HCC4006 細胞、H3225 細胞、H1975 細胞に対して、WST-1 を用いた細胞増殖アッセイ、Transwell double chamber を用いた細胞遊走、

浸潤アッセイを行った。

(3) 変異型 EGFR の糖鎖および SP-D との相互作用の解析

これまでに SP-D は野生型 EGFR の細胞外ドメインに存在するオリゴマンノース型糖鎖に直接結合することを報告した。変異型 EGFR でも同様であるのか、Lectin Blot 法および Ligand Blot 法で確認した。

(4) SP-D の変異型 EGFR の二量体形成に与える影響の解析

HCC827 細胞、H3255 細胞、H1975 細胞に対して、リガンド存在/非存在下で BS³ を用いた Cross linking assay を行い、SP-D の二量体形成に与える影響を評価した。

(5) SP-D の変異型 EGFR の二量体非依存性の活性に与える影響の検討

これまでの報告通り、二量体形成が阻害される細胞内キナーゼドメインの点変異 (L704R や I941R) を導入しても、Del19 と T790M では活性が維持されるのか Western Blot 法で確認した。さらに SP-D がそれらの 2 量対形成非依存性の活性にも影響を与えるかを Western Blot 法で解析した。

(6) SP-D と EGFR-TKI の併用効果の検討

SP-D を gefitinib と共に HCC827 細胞、HCC4006 細胞、H3255 細胞へ投与し、WST-1 assay によって併用効果があるか解析した。また gefitinib 耐性の H1975 細胞に対しては SP-D と第 3 世代 EGFR-TKI を共に投与し、併用効果があるか検討した。

(7) 肺がん組織における SP-D と EGFR の局在に関する検討

変異型 EGFR の肺がん組織を抗 EGFR 抗体、抗 SP-D 抗体で免疫染色を行うことで、EGFR と SP-D の肺内における局在を解析した。

4. 研究成果

(1) SP-Dの変異型EGFRシグナル抑制作用の検討

SP-DはEGFR-TKI感受性および耐性の各変異型EGFRを安定発現させたCHOK1細胞のEGFRリン酸化と下流シグナルを抑制した。またHCC827細胞、HCC4006細胞、H3225細胞、H1975細胞でも同様の結果であった。さらにHCC827細胞、HCC4006細胞、H3225細胞、H1975細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制した。

(2) 変異型EGFRの糖鎖およびSP-Dとの相互作用の解析

Ligand blot法では、メンブレン上に転写された変異型EGFRにSP-Dが直接結合した。Lectin blot法では、Concanavalin A、DSAいずれのレクチンでもbandが検出され、変異型EGFRもオリゴマンノース型の糖鎖が存在することを確認した。

(3) SP-Dの変異型EGFRの二量体形成に与える影響の解析

HCC827、H3255細胞、H1975細胞において、リガンド存在下および非存在下でのEGFRの二量体形成をSP-Dが阻害した。

(4) SP-Dの変異型EGFRの二量体非依存性の活性に与える影響の検討

野生型及びL858Rを発現させたCHOK1細胞では、I709QまたはV948Rの追加導入により自己リン酸化が抑制された。しかしDel19、Del19/T790M、L858R/T790MにI709QまたはV948Rを追加導入しても自己リン酸化は抑制されなかった。さらにSP-Dはこれらの二量体形成に依存しない変異型EGFRのリン酸化をも抑制することがわかった。

(5) SP-DとEGFR-TKIの併用効果の検討

HCC827細胞、HCC4006細胞、H3255細胞においてSP-Dとgefitinibを併用すると細胞増殖がより抑制された。またgefitinib耐性のH1975細胞に対してはSP-Dと第3世代EGFR-TKIを併用すると細胞増殖がより抑制された。

(6) 肺がん組織におけるSP-DとEGFRの局在に関する検討

肺がん患者の手術検体の免疫染色では、SP-Dは肺胞腔側、EGFRは基底膜側に多く発現していたが、間質にもSP-Dが発現している症例が存在し、両者が生体内で相互作用する可能性が示唆された。

(7) 今後の展望

SP-DはEGFRの糖鎖に結合し、リガンド結合の阻害、2量体形成の阻害、自己リン酸化の阻害といった様々な機序により、野生型EGFRだけでなく、リガンド非依存性に活性化する変異型EGFRも制御することが明らかになった。EGFR遺伝子変異陽性の肺がん患者において、血清SP-D高値群でEGFR-TKI治療による無増悪生存期間が延長していることは、SP-DがEGFR-TKIへの耐性化を抑制する作用を持つ可能性を示唆する。これまでの研究でSP-DがEGFR-TKI耐性の二次変異T790Mを有するEGFRを制御することが明らかになったが、EGFR-TKIの耐性化の機序として、EGFシグナル以外の受容体シグナルが活性化するキナーゼ乗り換えも重要である。膜受容体として機能する蛋白質の大半が糖鎖を持つことから、SP-Dが制御するシグナル伝達機構が他にも同定される可能性があると考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計12件)

- (1) Hasegawa Y, Takahashi M, Arika S, Saito A, Uehara Y, Takamiya R, Kuronuma K, Chiba H, Sakuma Y, Takahashi H, Kuroki Y. Surfactant protein A downregulates epidermal growth factor receptor by mechanisms different from those of surfactant protein D. *J. Biol. Chem.*, 292: 18565-18576 (2017) (査読有). DOI: 10.1074/jbc.M117.800771.
- (2) Umeda Y, Hasegawa Y, Otsuka M, Arika S, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Saijo H, Kuronuma K, Chiba H, Ohnishi H, Sakuma Y, Takahashi H, Kuroki Y, Takahashi M. Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients. *Oncogene*, 36: 6432-6455 (2017) (査読有) DOI: 10.1038/onc.2017.253.
- (3) Ikeda K, Shiratori M, Chiba H, Nishikiori H, Yokoo K, Saito A, Hasegawa Y, Kuronuma K, Otsuka M, Yamada G, Takahashi H. Serum surfactant protein D predicts the outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis treated with pirfenidone. *Respir. Med.*, 131: 184-191 (2017) (査読有) DOI: 10.1016/j.rmed.2017.08.021.
- (4) Takamiya R, Uchida K, Shibata T, Maeno T, Kato M, Yamaguchi Y, Arika S, Hasegawa Y, Saito A, Miwa S, Takahashi H, Akaike T, Kuroki Y, Takahashi M. Disruption of the structural and functional features of surfactant protein A by acrolein in cigarette smoke. *Sci. Rep.*, 7: 8304 (2017) (査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-08588-5.
- (5) Hashimoto J, Takahashi M, Saito A, Murata M, Kurimura Y, Nishitani C, Takamiya R, Uehara Y, Hasegawa Y, Hiyama Y, Sawada N, Takahashi S, Masumori N, Kuroki Y, Arika S. Surfactant Protein A Inhibits Growth and Adherence of Uropathogenic *Escherichia coli* to Protect the Bladder from Infection. *J Immunol.*, 198: 2898-2905 (2017) (査読有) DOI: 10.4049/jimmunol.1502626.
- (6) Uehara Y, Takahashi M, Murata M, Saito A, Takamiya R, Hasegawa Y, Kuronuma K, Chiba H, Hashimoto J, Sawada N, Takahashi H, Kuroki Y, Arika S. Surfactant protein A (SP-A) and SP-A-derived peptide attenuate chemotaxis of mast cells induced by human β -defensin 3. *Biochem Biophys Res Commun.*, 485:107-112 (2017) (査読有) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.028.
- (7) Takahashi M, Hasegawa Y, Gao C, Kuroki Y, Taniguchi N. N-glycans of growth factor receptors: their role in receptor function and disease implications. *Clinical Science*, 130: 1781-92 (2016) (査読有) DOI: 10.1042/CS20160273.
- (8) 長谷川喜弘, 梅田泰淳, 大塚満雄, 有木茂, 高宮里奈, 齋藤充史, 黒沼幸治, 千葉弘文, 高橋弘毅, 黒木由夫, 高橋素子. SP-Dによる変異型EGFR肺がんの制御機構. *分子呼吸器病* .21: P.80-83 (2017) (査読無)
- (9) 長谷川喜弘, 高橋素子, 高橋弘毅. SP-DによるEGFR制御機構. *別冊BIO Clinica*, 6: 130-134 (2017) (査読無)
- (10) 長谷川喜弘, 高橋素子, 高橋弘毅. 肺サーファクタント蛋白質 SP-Dの肺がんに対する新たな役割. *Medical Science Digest*, 42: 398-402 (2016) (査読無)
- (11) Takahashi M, Hasegawa Y, Takamiya R, Arika S, Takahashi H, Kuroki Y. Novel physiological function of pulmonary surfactant protein D. *Proceeding of Airway Secretion Research*, vol. XVII (2016) (査読無)

- (12) 有木茂, 上原康昭, 村田雅樹, 高宮里奈, 長谷川喜弘, 齋藤充史, 千葉弘文, 黒沼幸治, 高橋素子, 高橋弘毅, 黒木由夫. SP-A 及び SP-A 由来ペプチドはヒト β -デイツフェンシン 3 による肥満細胞の遊走を抑制する. 分子呼吸器病, 20: P.120-123 (2016) (査読無)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 長谷川喜弘, 梅田泰淳, 大塚満雄, 有木茂, 高宮里奈, 齋藤充史, 高橋弘毅, 黒木由夫, 高橋素子. 肺サーファクタントタンパク質 D は変異型 EGFR の活性化を阻害し、肺腺がんの進展を抑制する. 第 90 回日本生化学会大会, 2017 年 12 月 6 日 ~ 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸)
- (2) 長谷川喜弘, 梅田泰淳, 高橋素子, 大塚満雄, 有木茂, 高宮里奈, 齋藤充史, 高橋弘毅, 黒木由夫. SP-D による変異型 EGFR 肺がんの制御機構. 第 15 回肺サーファクタント分子病態研究会, 2016 年 6 月 4 日, 札幌医科大学記念ホール (札幌)
- (3) 長谷川喜弘, 高橋素子, 有木茂, 高宮里奈, 齋藤充史, 高橋弘毅. 肺サーファクタント蛋白質 D による EGFR 遺伝子変異陽性肺がんの制御機構. 第 114 回北海道癌談話会例会, 2016 年 9 月 3 日, 札幌医科大学記念ホール (札幌)
- (4) 長谷川喜弘, 佐久間裕司, 高橋素子. 肺サーファクタント蛋白質 D による変異型 EGFR の制御機構. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日 ~ 8 日, パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

長谷川 喜弘

(HASEGAWA YOSHIHIRO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：90643180

- (2) 研究分担者

()

研究者番号：

- (3) 連携研究者

高橋 素子 (TAKAHASHI MOTOKO)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：00303941

高橋 弘毅 (TAKAHASHI HIROKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：60231396

佐久間 裕司 (SAKUMA YUJI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10364514