

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08783

研究課題名（和文）EGFR結合蛋白LRIG1に着目した、EGFR変異陽性肺癌に対する新規治療戦略

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy focused on EGFR-binding protein LRIG1 for EGFR-mutant lung cancer

研究代表者

山本 寛斉（Yamamoto, Hiromasa）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40467733

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はEGFRに結合し抑制性に働く膜貫通蛋白であるLRIG1に着目し、EGFR変異陽性肺癌における同蛋白の抗腫瘍効果を検討し、当該疾患に対する新規治療法の確立を目指すものであった。EGFR変異陽性および陰性の肺癌細胞株を用いてLRIG1安定発現細胞株を樹立し、EGFRの発現や細胞増殖について検討したところ、EGFR変異陽性肺癌細胞株においてはLRIG1により変異EGFRタンパクおよびリン酸化の発現が抑制し細胞増殖も抑制されたが、EGFR変異陰性肺癌細胞株においてはEGFR蛋白発現の変化に乏しく細胞増殖も抑制されなかったことをin vitro, in vivoで証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR変異陽性肺癌に対して、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤は劇的な治療効果を示すが、奏効した症例も大部分が約1年で耐性を獲得し再発する。獲得耐性因子としてはEGFRのT790M二次的遺伝子変異やMET 遺伝子増幅などが国内外から報告されており、その耐性の克服や、異なる機序で抗腫瘍効果を発揮する新規薬剤の開発が期待されている。EGFR変異陽性肺癌に対するLRIG1の抗腫瘍効果が実験的に証明されたため、LRIG1は治療薬剤となり得ることが示された。肺癌は日本において最も死亡者数の多い癌であり、肺癌の治療成績の向上は社会的にも意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was to establish the novel therapeutic strategy focused on EGFR-binding protein LRIG1, by evaluating the anti-tumor effect of LRIG1 to EGFR-mutant lung cancer. We established EGFR-mutant and EGFR-wild type lung cancer cell lines that stably expressed LRIG1. Using these cell lines, we evaluated EGFR expression status and cell growth in vitro and in vivo. LRIG1 inhibited the expression of mutant EGFR and its phosphorylation, and cell growth in EGFR-mutant lung cancer cell lines. On the other hand, LRIG1 did not affect EGFR expression or cell growth in EGFR-wild type lung cancer cell lines.

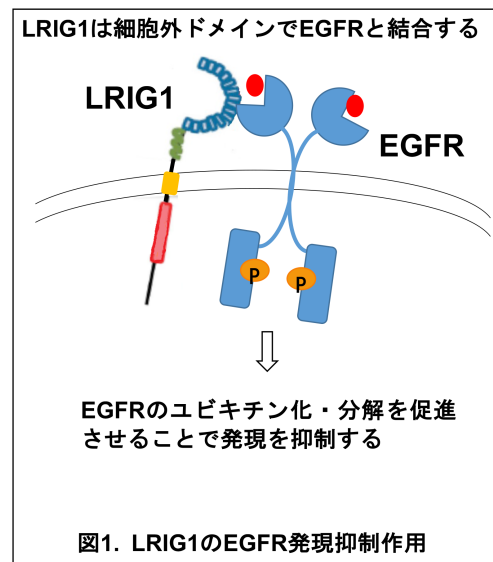
研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 EGFR LRIG1

1. 研究開始当初の背景

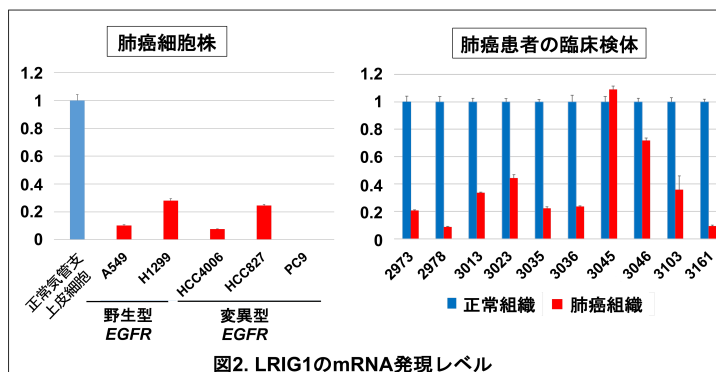
肺癌は癌死の原因の第1位となる疾患であり、その克服のために種々の薬剤が開発されている。2004年には上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 遺伝子変異が発見され、日本人の肺腺癌の30-50%でその変異が認められることが分かった (Lynch et al. N Engl J Med 2004 他)。*EGFR* 遺伝子変異を有する肺癌に対して、*EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤 (*EGFR*-TKI、ゲフィチニブやエルロチニブ) は劇的な治療効果を示すことが判明し、肺癌治療を大きく変化させた。しかし、奏効した症例も大部分が約1年で耐性を獲得し再発する。研究開始当初に臨床的に意味があることが確認されていた獲得耐性因子としては *EGFR* の T790M 二次的遺伝子変異、*MET* 遺伝子増幅、上皮間葉転換 (EMT)、癌幹細胞様の形質獲得等が報告されており (Kobayashi et al. N Engl J Med 2005, Engelman et al. Science 2007, Sequist et al. Sci Transl Med 2011, Shien et al. Cancer Res 2013)、その耐性の克服や、異なる機序で抗腫瘍効果を発揮する新規薬剤の開発が期待されている。

2000年代から、Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) という膜貫通タンパク質に癌抑制効果があることが分かってきた (Laederich et al. J Biol Chem 2004)。LRIG1 は、正常細胞において細胞の増殖に関与している ErbB 受容体ファミリー (*EGFR*、*HER2*、*HER3*、*HER4*) と結合し、それらのユビキチン化・分解を促進させ発現を抑制することで上皮の恒常性を保つ働きをしている (図1) が、その ErbB 受容体の発現抑制を介した癌抑制効果に注目が集まっていた。脳腫瘍や頭頸部癌の分野で *LRIG1* 遺伝子の導入が *EGFR* の発現抑制・腫瘍の増殖抑制を示したことが報告され



ており、脳腫瘍に関する研究ではLRIG1は野生型EGFRに対してよりも変異型EGFR (*EGFR vIII*) に対して、より強力な抗腫瘍効果を示している (Stutz et al. Oncogene 2008)。しかし、*EGFR* 変異が高頻度に認められる肺癌では、変異型EGFRに対するLRIG1の有用性に関する報告は研究開始当初の時期では発表されていなかった。

予備実験として肺癌細胞株と肺癌患者の臨床検体を用いて *LRIG1* の mRNA 発現レベルを調べたところ、肺癌細胞では *LRIG1* の発現が有意に低下していた (図2)。



2. 研究の目的

本研究の目的は、LRIG1が野生型EGFRよりも変異型EGFRに対して、より強力な抗腫瘍効果を示すことに着目し、*EGFR* 変異陽性肺癌に対する新規治療法の開発を行い、癌死の原因の第1位である

肺癌に対する治療成績の改善を目指すことであった。LRIG1にはEGFRなどのErbB受容体を抑制する以外にも、MET受容体の発現抑制(Shattuck et al. Mol Cell Biol 2007)、EMT抑制効果(Yokdang et al. Oncogene 2016)があると報告されている。METの発現亢進やEMTの出現は肺癌におけるEGFR-TKI投与後の薬剤耐性機序であり、我々はLRIG1の投与により薬剤耐性が克服される可能性を期待した。LRIG1がEGFR-TKIによる薬剤耐性機序も克服する可能性を有する事に着目し、EGFR変異陽性肺癌に対する新規治療薬として確立することが学術的独自性と創造性であった。

3. 研究の方法

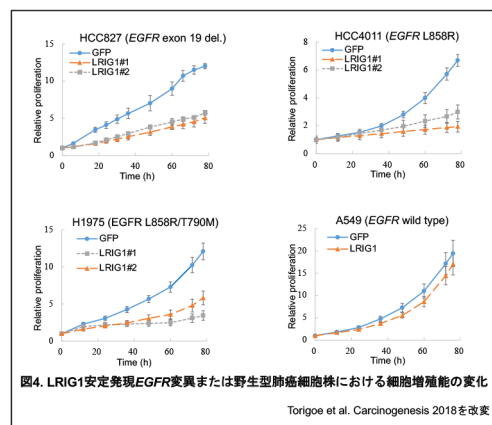
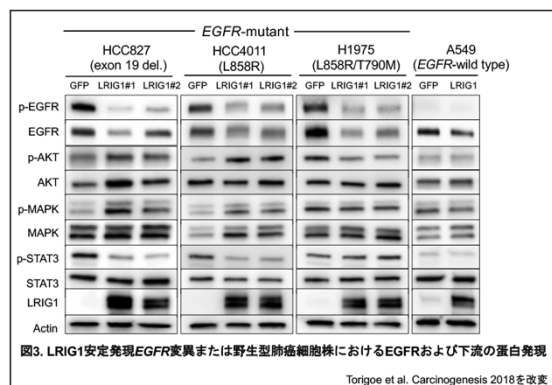
#1. EGFR-TKI耐性肺癌細胞株を含む、EGFR変異を有する肺癌細胞株を用いたLRIG1安定発現細胞株の樹立

EGFR変異を有する肺癌細胞株のうち、HCC827 (EGFR exon 19欠失)、HCC4011 (EGFR L858R)、H1975 (EGFR T790MおよびL858R)と、我々が樹立したEGFR-TKI耐性株 (HCC827-GR, HCC4011-GR)にLRIG1を導入し、安定発現細胞株の作成を試みた。対照としてEGFR野生型の肺癌細胞株 (A549, H1299)にもLRIG1を導入し作成した。安定発現細胞株を樹立後は*in vitro*, *in vivo*でLRIG1の抗腫瘍効果を検討した。

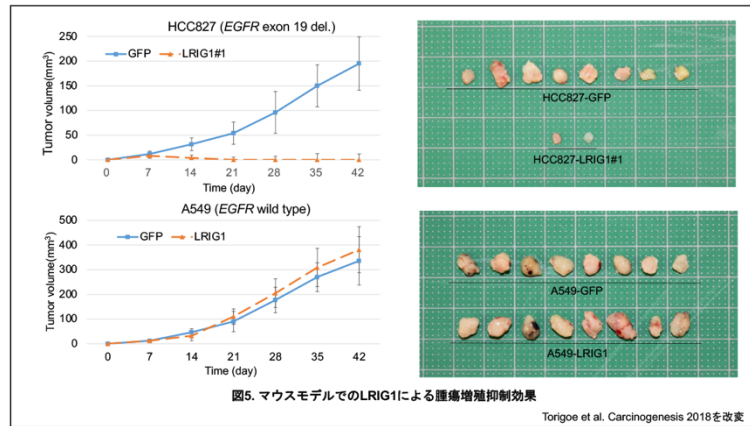
#2. バイオインフォマティクス解析を用いたLRIG1の標的シグナル伝達経路・耐性因子の同定
上記の様にLRIG1にはErbB受容体とMET受容体の発現を抑制する働きがあることが報告されている。作成したLRIG1の安定発現細胞株を用いてマイクロアレイ解析やリン酸化キナーゼアレイを中心に行い、既に報告されているもの以外の新たなシグナル伝達経路を探索した。

4. 研究成果

EGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞株を用いて、LRIG1安定発現細胞株を樹立した。具体的にはHCC827 (EGFR exon 19欠失)、HCC4011 (EGFR L858R) と、H1975 (EGFR L858RおよびT790M) の細胞株を用いて、LRIG1安定発現細胞株を作成した。また、EGFR遺伝子変異を有しない肺癌細胞株 (A549) も用いて、LRIG1安定発現細胞株を作成し、これらの細胞株を用いてEGFRの発現や細胞増殖について検討を行った。EGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞株においては、LRIG1により変異EGFRタンパクおよびリン酸化の発現が抑制し、細胞増殖も抑制されたが、EGFR遺伝子変異を有しない肺癌細胞株においてはEGFR蛋白発現の変化に乏しく、細胞増殖も抑制されなかった (図3, 4)。HCC827については、浸潤能・遊走能におけるLRIG1の影響も評価したところ、LRIG1安定発現株では浸潤能・遊走能が抑制されていた。マウスモデルで*in vivo*でのLRIG1の効果を検討



したところ、EGFR遺伝子変異を有するHCC827では腫瘍増殖が抑制されたが、EGFR野生型のA549ではEGFR蛋白発現の変化に乏しく、LRIG1による腫瘍増殖抑制効果は認められなかった(図5)。また、HCC827を用いて、LRIG1のEGFR以外のレセプターチロ



シンキナーゼに対する影響を検討したところ、LRIG1安定発現細胞株では、LRIG1によりHER2, HER3, MET, IGF-1Rのリン酸化も抑制されていた。

この成果をまとめて論文を作成し、Carcinogenesis誌に掲載された(Torigoe et al. Carcinogenesis 2018)。

<引用文献>

- Lynch et al. N Engl J Med 2004
- Kobayashi et al. N Engl J Med 2005
- Engelman et al. Science 2007
- Sequist et al. Sci Transl Med 2011
- Shien et al. Cancer Res 2013
- Laederich et al. J Biol Chem 2004
- Stutz et al. Oncogene 2008
- Shattuck et al. Mol Cell Biol 2007
- Yokdang et al. Oncogene 2016
- Torigoe et al. Carcinogenesis 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hidejiro Torigoe, Hiromasa Yamamoto, Masakiyo Sakaguchi, Chen Youyi, Kei Namba, Hiroki Sato, Kazuhiko Shien, Junichi Soh, Ken Suzawa, Shuta Tomida, Kazunori Tsukuda, Shinichiro Miyoshi, Shinichi Toyooka	4. 巻 39
2. 論文標題 Tumor-suppressive effect of LRIG1, a negative regulator of ErbB, in non-small cell lung cancer harboring mutant EGFR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 719 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgy044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥越 英次郎、山本 寛斉、阪口 政清、難波 圭、佐藤 博紀、枝 園 和彦、諏澤 憲、宗 淳一、富田 秀太、佃 和憲、三好 新一郎、豊岡 伸一
2. 発表標題 EGFR 変異陽性肺癌における LRIG1 の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富田 秀太 (Tomida Shuta) (10372111)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	豊岡 伸一 (Toyooka Shinichi) (30397880)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	枝園 和彦 (Shien Kazuhiko) (30708079)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	削除：2019年4月11日
研究分担者	宗 淳一 (Soh Junichi) (90559890)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	変更：2019年4月1日 岡山大学から近畿大学へ
研究分担者	諏澤 憲 (Suzawa Ken) (90839713)	岡山大学・大学病院・医員 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関