

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07724

研究課題名（和文）EGFR肺がん特異的翻訳産物の機能解析と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic and diagnostic methods for EGFR-mutated lung cancers

研究代表者

築茂 由則（Tsukumo, Yoshinori）

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：40469630

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）：上皮成長因子受容体（EGFR）変異は、東アジアにおける肺がん患者で最も多く見られる変異である。我々は、細胞内のタンパク質産生の変化を網羅的に測定する技術リボソームプロファイリングを用いて、EGFR変異細胞で特異的に発現が上昇するタンパク質群を特定した。重要なことに、発現上昇したタンパク質の一つである分泌型糖タンパク質Xが、EGFR変異陽性肺がん細胞の増殖に関わる因子であることを見出した。今後、タンパクXの特性や機能の詳細を明らかにしていくことで、EGFR変異陽性肺がんを検出するためのバイオマーカーや治療薬開発につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR変異陽性肺がんは、日本人における肺腺がん全体の約半数を占める。現在、進行性肺がんを対象に、複数のEGFR阻害薬が肺がん治療薬として承認されているものの、それら薬剤への耐性化が問題となっている。本研究で見出したタンパクXは、EGFR変異陽性のがん細胞から豊富に分泌される特徴を有し、かつ、タンパクXの阻害はEGFR阻害薬耐性がん細胞の増殖を抑制することができた。そのため、タンパクXは、EGFR肺がんをより早い段階で発見するためのバイオマーカーや既存薬への耐性を克服するための新たな治療標的となる可能性を秘めている。本研究のさらなる発展により、肺がん患者を救う手立てとなることを期待したい。

研究成果の概要（英文）：In East Asia, epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung adenocarcinoma is particularly predominant and leading cause of lung cancer death. We identified several proteins specifically upregulated in EGFR-mutated cells using ribosome profiling, which is a technology to measure genome-wide changes in protein production in cell. Of note, a secretory glycoprotein X, which is one of the upregulated proteins, contributed to the cell growth and proliferation of EGFR-mutated cancers but not EGFR-wildtype cells. Importantly, inhibition of the protein X using siRNA, CRISPR, and a specific blocking antibody decreases survival of cells resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs). This study suggests the potential therapeutic advantages of targeting the protein X against EGFR-TKI resistant cells.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：EGFR 肺がん エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

肺がんは、我が国で最も死亡者数が多いがん疾患である。肺がんの典型として知られる肺腺がんにおいては、その半数近くで EGFR (上皮成長因子受容体) キナーゼの恒常的活性化変異が生じており、常に増殖シグナル経路を活性化することで、細胞の癌化やがん細胞の増殖・生存に寄与している (図1)。

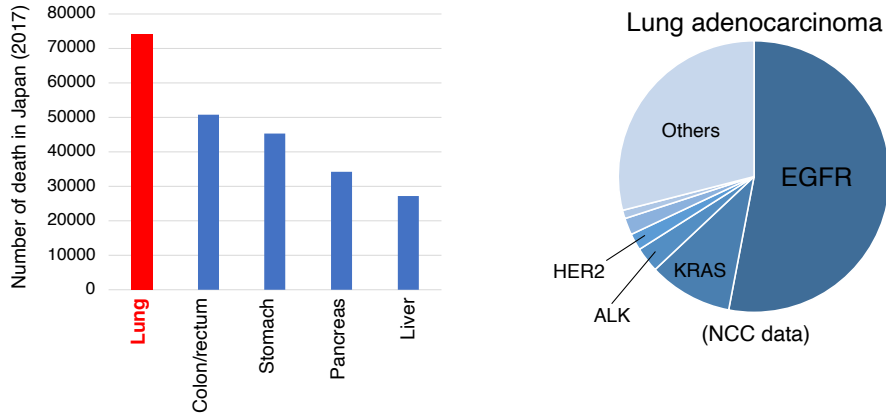


図1 日本における肺がん死亡率とドライバーオンコジーンの関係

最近の研究から、がん遺伝子変異に伴う増殖シグナル経路の活性化は、特定の mRNA の翻訳量を変化 (すなわち特定のタンパク質の発現変化) させることが明らかとなり、がん特異的な翻訳産物はバイオマーカーや分子標的として新たな治療法開発に繋がると考えられた。

申請者は、これまでに外来刺激に伴い特定の mRNA が翻訳される分子機構を明らかにし、こうした翻訳調節機構が分子標的薬感受性に関わることを示すとともに、細胞内 mRNA の翻訳量および翻訳領域を網羅的に解析する技術“リボソームプロファイリング”と“ヒトがんデータベースをはじめとする情報解析”を駆使し、EGFR 変異と発現が非常に強く相関するエクソソーム関連遺伝子群を同定した (図2)。

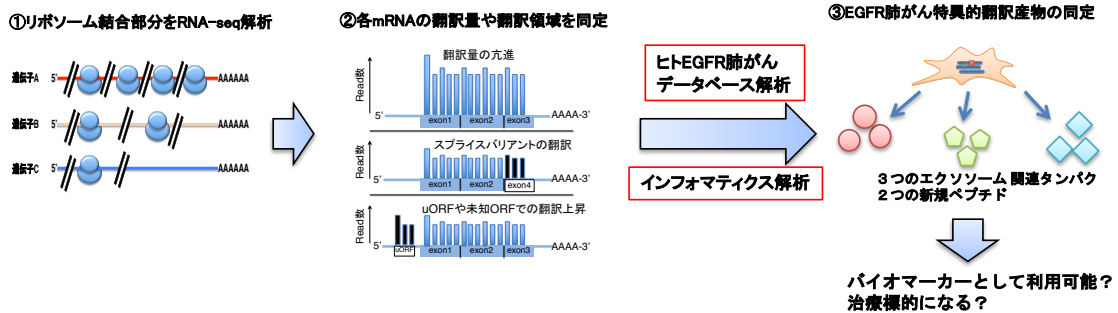


図2 リボソームプロファイリングによる EGFR 変異肺がん特異的翻訳産物同定の流れ

2. 研究の目的

本研究では、申請者がリボソームプロファイリングにより同定したエクソソーム関連遺伝子群について、EGFR 変異陽性肺がん細胞における機能や特性について解析を進め、肺がんの診断や治療への利用可能性を探る。

3. 研究の方法

本研究では、EGFR 変異陽性細胞株や他の肺がん関連遺伝子変異細胞株、EGFR 阻害薬耐性細胞株を用い、同定したエクソソーム関連遺伝子の生理機能や特性について解析し、EGFR 変異陽性肺がんを検出するための新たなバイオマーカーや治療標的化に向けた基盤情報を取得する。

#### 4. 研究成果

本研究では、申請者が発見した複数の候補タンパク（3つのエクソソーム関連遺伝子）に関して、診断マーカーとしての有用性や治療標的としての可能性について検討を進めた。

複数の EGFR 活性化変異陽性、陰性細胞株の比較実験を行い、プロファイリングで得られた候補タンパク群が EGFR 活性化変異陽性細胞株で発現上昇していることが確認できた。これらの発現は、EGFR 阻害薬で細胞を処理すると低下したことから、EGFR シグナル経路を介して発現が制御されていることが示唆された。

また、EGFR 変異陽性と変異陰性細胞の比較により、これらのタンパクは変異陽性細胞において細胞外に豊富に分泌され、細胞外小胞の表面に豊富に存在することや糖鎖修飾に違いがあることが分かった。こうした特性（豊富な分泌量や糖鎖修飾）から、これらのタンパクは EGFR 変異陽性肺がんを検出するための血中バイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

さらに候補タンパクの1つ（遺伝子 X）を siRNA によりノックダウンしたところ、EGFR 変異陽性細胞で顕著な細胞増殖抑制効果が見られた。また、EGFR 阻害薬に耐性を示す細胞株を用いて CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子 X のノックアウト細胞を構築したところ、親株に比べて増殖速度の低下が見られた。さらに、遺伝子 X 特異的なブロッキング抗体で EGFR 阻害薬耐性細胞を処理したところ、増殖抑制効果があることが分かった。一方で、こうした増殖阻害効果は遺伝子 X ノックアウト細胞では見られなかった。このことから、遺伝子 X は EGFR 変異陽性肺がんの新たな分子標的となる可能性が示唆された。

以上、本研究は培養細胞を用いた結果であるため、今後、ヒト血漿検体を用いたバイオマーカーとしての性能評価や動物モデルを用いた治療標的としての評価を進めることで、EGFR 変異陽性肺がんの新たな診断薬や治療薬の開発へと繋がることを期待したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohoka N, Suzuki M, Uchida T, Tsuji G, Tsukumo Y, Yoshida M, Inoue T, Demizu Y, Ohki H, Naito M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Gilteritinib-Based Chimeric Small Molecules that Potently Induce Degradation of FLT3-ITD Protein.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Med Chem Lett	6. 最初と最後の頁 1885-1891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.2c00402.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohoka N, Suzuki M, Uchida T, Tsukumo Y, Yoshida M, Inoue T, Ohki H, Naito M.	4. 巻 113
2. 論文標題 Development of a potent small-molecule degrader against oncogenic BRAFV600E protein that evades paradoxical MAPK activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2828-2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15401.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsukumo Y, Tsuji G, Yokoo H, Shibata N, Ohoka N, Demizu Y, Naito M.	4. 巻 2365
2. 論文標題 Protocols for Synthesis of SNIPERs and the Methods to Evaluate the Anticancer Effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 331-347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1665-9_18.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsukumo Y, Naito M, Suzuki T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Influence of EGFR-activating mutations on sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in a KRAS mutant non-small cell lung cancer cell line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229712.	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 -

1. 著者名 Suzuki T, Tsukumo Y, Furihata C, Naito M, Kohara A.	4. 巻 42
2. 論文標題 Preparation of the standard cell lines for reference mutations in cancer gene-panels by genome editing in HEK 293T/17 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Environ	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-0147-2.	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 -

1. 著者名 Naito M, Ohoka N, Shibata N, Tsukumo Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Targeted Protein Degradation by Chimeric Small Molecules, PROTACs and SNIPERs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Chem	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fchem.2019.00849.	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 -

1. 著者名 Muller D, Shin S, Goullet de Rugy T, Samain R, Baer R, Strehaiano M, Masvidal-Sanz L, Guillermet-Guibert J, Jean C, Tsukumo Y, Sonenberg N, Marion F, Guilbaud N, Hoffmann JS, Larsson O, Bousquet C, Pyronnet S, Martineau Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 eIF4A inhibition circumvents uncontrolled DNA replication mediated by 4E-BP1 loss in pancreatic cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 築茂由則, 大岡伸通, 内藤幹彦, 鈴木孝昌
2. 発表標題 Identification of protein X as a potential therapeutic target against EGFR-mutated cancers
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 築茂由則
2. 発表標題 コンパニオン診断薬の開発状況と規制
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 築茂由則，大岡伸通，内藤幹彦，鈴木孝昌
2. 発表標題 A novel theranostic target for EGFR-mutated lung cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築茂由則、鈴木孝昌、内藤幹彦
2. 発表標題 Translational profiling of EGFR-mutated cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 1. 築茂由則，井上貴雄	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 16
3. 書名 次世代医薬とバイオ医療 第8章 個別化医療に向けた診断用医薬品 コンパニオン診断薬	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------