

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08609

研究課題名（和文）CMTM遺伝子群による変異EGFR陽性肺癌の分子基盤と治療戦略への展開

研究課題名（英文）CMTMs regulate EGFR mutation positive NSCLC

研究代表者

前門戸 任（Maemondo, Makto）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40344676

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）：EGFR遺伝子変異は分子標的薬の開発があり、遺伝子変異がある肺癌治療においては最も重要な遺伝子変本研究では変異EGFRとCMTM分子との関係を研究した。EGFR遺伝子変異肺癌細胞株のCMTM3,4,6,7の発現をみるとCMTM6の発現が高いことが判明した。これはメッセージ、蛋白両者で確かめられた。次にHis-Tagとconditional k/o可能なレンチウイルスベクターを作成しEGFR遺伝子変異肺癌細胞株に導入し、CMTM6に関しては発現を確認し、また、ドキシサイクリンでのCMTM6発現を阻害することができた。CMTM7,CMTM4についても行っているが、十分な成果が得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究ではEGFR遺伝子変異とCMTMとの関係を解明するには至っていない。最近になり肺癌の予後予測因子としてCMTM6が報告された。CMTM6の発現が低下が短い生存期間と関連しているという報告である。CMTMは免疫チェックポイントPD-1発現の調節についても報告されている。これからも癌との関係で注目されていく分子と思われる。我々の結果もCMTM分子群の中でCMTM6がEGFR遺伝子変異肺癌との関係が強いことが窺える結果であった。解析途中ではあるが、こういった背景からその結果が解明されると注目されることと思われる。治療薬の開発につながる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：EGFR mutations are the most significant genetic variants in the treatment of lung cancer with genetic mutations due to the development of molecularly targeted drugs. In this study, the relationship between mutated EGFR and CMTM molecules was investigated. The expression of CMTM3, CMTM4, CMTM6, and CMTM7 in EGFR-mutated lung cancer cell lines revealed a high expression of CMTM6. This was confirmed at both the mRNA and protein levels. Subsequently, His-Tag and conditional knockout capable lentiviral vectors were generated and introduced into EGFR-mutant lung cancer cell lines. CMTM6 expression was confirmed, and its expression was inhibited by culturing with doxycycline. However, satisfactory results have not yet been obtained for other CMTM molecules.

研究分野：胸部悪性腫瘍の診断・治療

キーワード：CMTM EGFR遺伝子変異 非小細胞肺癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR - TKI) は非小細胞肺癌 (NSCLC) に対する優れた治療薬であるが、耐性の克服が急務である。T790M 変異 EGFR は細胞内に蓄積しており、局在変化が耐性に寄与している可能性が高い。一方、最近になって免疫チェックポイント分子である PD-1 の細胞内動態を制御する分子として CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing family 4 (CMTM4) および CMTM6 が報告された (1)。また、CMTM 遺伝子群は癌細胞株においても発現が増強しており、EGFR シグナルを調整していることが報告されている (2)。CMTM は 4 回膜貫通ドメインを有するケモカイン受容体類似の膜型分子であり CMTM は野生型 EGFR の輸送も制御するが、変異 EGFR との関連性は未解明である。CMTM の特徴的構造と各遺伝子の染色体における位置を図 1 に示す (3)。

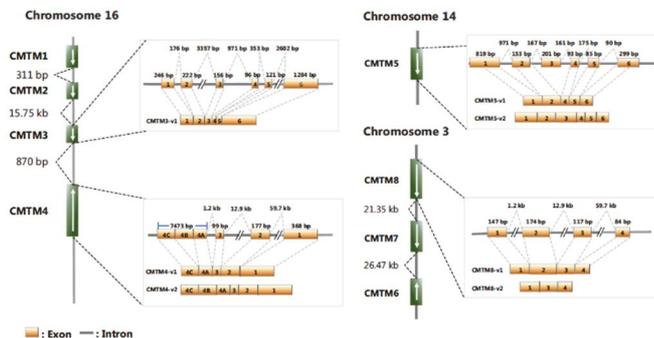


図 1 CMTM の染色体一とゲノム構造 (CMTM3-5,8 のスプライスフォーム)

### 2. 研究の目的

本研究では変異 EGFR の奇異な細胞内動態の責任分子として 8 種の CMTM 遺伝子群の役割を解析し、輸送異常機構との関連性を解明する。

### 3. 研究の方法

研究の方法はまず、EGFR エクソン 19 欠失変異、EGFR エクソン 21 L858R 点突然変異、および EGFR 野生型の肺癌腫瘍細胞株を準備し、それぞれの細胞株に対し各種 CMTM の発現をメッセージと蛋白について解析する。その後、発現の高い CMTM に絞り、CMTM を発現し、かつ His-tag をつけたレンチウイルスを作成する。このレンチウイルスにはドキシサイクリンにより conditional に CMTM の発現抑制可能な shCMTM を搭載している。それらにより CMTM が発現を制御し細胞増殖、細胞機能、EGFR 発現との関連を解析する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 肺癌細胞株における CMTM 遺伝子群の mRNA 発現プロファイル

肺癌細胞株として A549 : EGFR wild, Kras 変異, H1975: L858R/T790M 遺伝子変異, H1650: exon19 deletion、コントロール細胞として 293 細胞と MT-2 細胞を用いた。それぞれの細胞株を培養した後 mRNA の発現をみた。それぞれの mRNA レベルを MT-2 細胞 (HTLV-I – transformed T cell line)cDNA と比較し相対

定量を行った(図 1)。結果は CMTM3 ではほとんど発現がなく、CMTM4 では発現レベルは低くいずれの肺癌細胞株でも 0.3 未満であった。CMTM7 も全体にコントロールより発現量は低いが H1975 は比較的発現量が高かった。CMTM6 については発現量がコントロールより十分高かった。CMTM6 が肺癌との関連が高い遺伝子と考えられた。

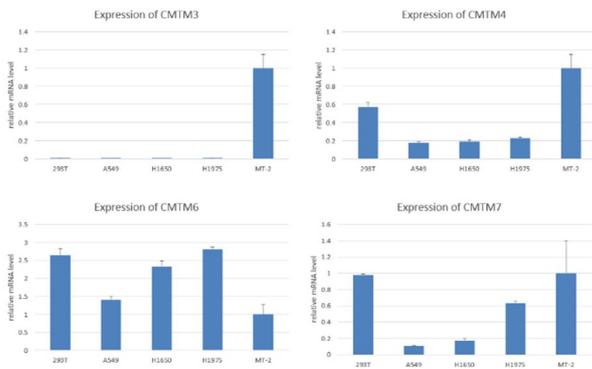
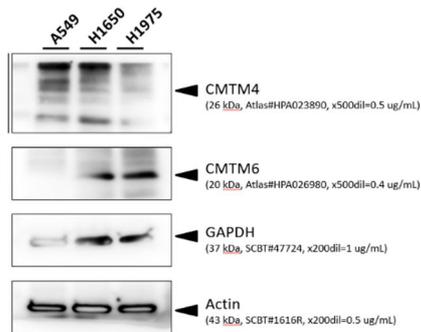


図 2 肺癌細胞株における CMTM 遺伝子群の発現プロファイル

##### 2) CMTM の蛋白発現プロファイル



次に蛋白自体の発現をみるため A549、H1650、H1975 のウエスタンブロットを行った(図 3)。三種の細胞株の CMTM4 蛋白発現は RNA と同様に低く、CMTM6 の蛋白発現は、EGFR 遺伝子変異肺癌で認められた。

図 3 肺癌細胞株における CMTM 蛋白質の発現プロファイル

##### 3) CMTM プラスミドのヒト肺癌細胞株への導入

図 4 に示す His-Tag を付加した CMTM6 及び CMTM7 を安定的に発現するレンチウイルスベクターを導入した細胞株の作成をおこなった(図 5 A)。ベクターは His-Tag をつけているため導入後の検出が容易となるだけでなく、intrinsic な CMTM の細胞由来の発現と extrinsic なベクター由来の発現を区別することも容易となる。また shCMTM を搭載しており、ドキシサイクリンにより conditional に発現させ CMTM をブロックすることも可能となる。実際に CMTM6

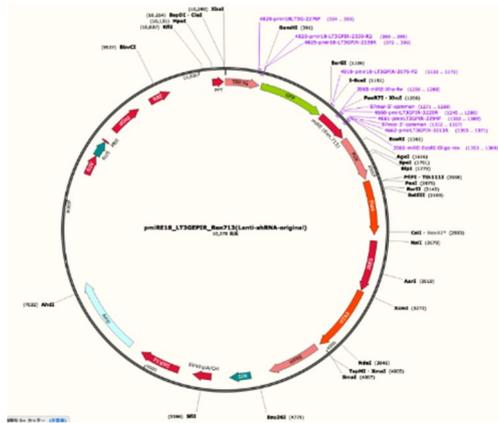
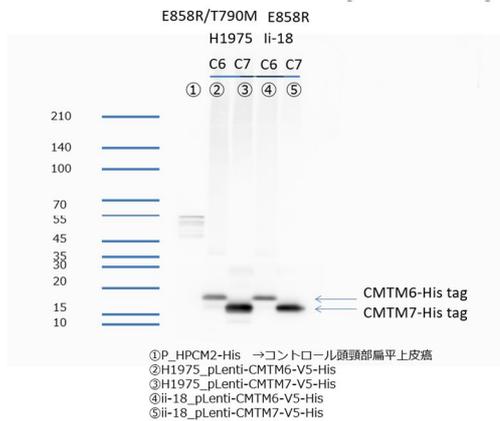


図 5 A CMTM6/ CMTM7 の誘導型コンストラクト

と CMTM7 を安定的に発現する肺癌細胞株をとることができた(図 5 B)。インターナルコントロールは各細胞株に揃って発現していることを確認している。ここでこのプラスミドを導入した細胞で EGFR の発現をみる。(図 4 D) もともと EGFR 発現が多いとされる頭頸部癌と発現量より乏しいが、CMTM6、CMTM7 導入した。ここでは H1975 細胞と li-18 細胞 (EGFR 変異 L858R) における EGFR の発現を示す。

B



C

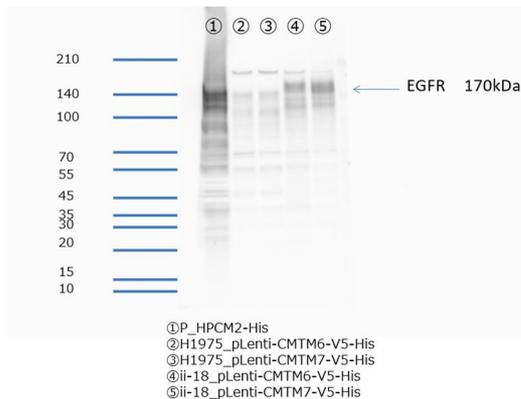


図 5 BC B : 肺癌細胞株に導入した CMTM-His tag をウエスタンブロットで確認  
C : EGFR 蛋白の発現

#### 4) ヒト肺癌細胞株 H1975・H1650 の誘導系 shCMTM6 によるノックダウン

H1975 細胞と H1650 細胞にそれぞれ上記のレンチウイルスベクターをトランスフェクされた細胞にドキシサイクリン 1ug/ml を加え 120 時間培養した。sh1 4 のすべての細胞株で良好に CMTM6 を阻害することが出来た。CMTM6 蛋白の阻害作用とみたウエスタンブロットティングを図 1 に示す。(図 6 A ; H1975、図 6 B : H1650)

shCMTM7 については、ウエスタンブロットティング実験において有効な抗マウス CMTM7 抗体を入手できず、その後の研究の推進が難しい状況となったその後は CMTM4 に方向転換し動揺の研究を進めるも、CMTM4 に関しては、ノックアウト細胞の作製を H1975 および H1650 に

対してそれぞれ3回試みたが、ノックアウトされたクローンは採取できずに終わり、CMTM4に関しては、ノックダウン細胞の作製は困難であると判断した。

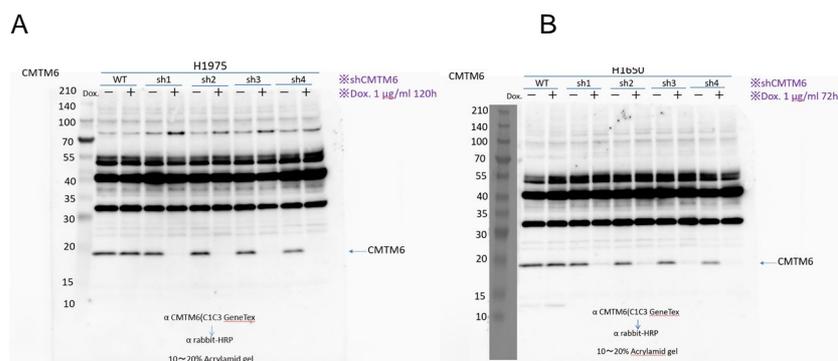


図 6 AB A: ヒト肺癌細胞株 H1975 の誘導系 shCMTM6 によるノックダウン  
B: ヒト肺癌細胞株 H1650 の誘導系 shCMTM6 によるノックダウン

## まとめ

EGFR と CMTM との関係性を解き明かすには、至っていない。最近になり、肺癌の予後予測因子として CMTM6 の発現との関係性が報告されるなど(4)、CMTM と肺癌との関係は注目に値するところである。本研究においても肺癌細胞株が CMTM6 の発現が高く、既報との関連が期待される。メカニズムについては、レンチウイルスベクターで CMTM の検出を容易にしかつコンディショナルに CMTM6 を阻害できるプラスミドを導入した肺癌細胞株を作成するにとどまっている。今後、更なる研究を推進していく予定である。

## 参考文献

- 1) Mezzadra R, Sun C, Jae LT, Gomez-Eerland R, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature*. 2017 Sep 7;549(7670):106-110. doi: 10.1038/nature23669. Epub 2017 Aug 16.
- 2) Li H, Li J, Su Y, et al.. A novel 3p22.3 gene CMTM7 represses oncogenic EGFR signaling and inhibits cancer cell growth. *Oncogene*. 2014 Jun 12;33(24):3109-18. doi: 10.1038/onc.2013.282. Epub 2013 Jul 29.
- 3) Wu J, Li L, Wu S, Xu B. CMTM family proteins 1-8: roles in cancer biological processes and potential clinical value. *Cancer Biol Med*. 2020 Aug 15;17(3):528-542. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0032.
- 4) Dai F, Duan YL, Feng Q, et al. CMTM6: A Critical Prognostic Indicator in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Cancer*. 2024 Mar 4;15(8):2373-2379. doi: 10.7150/jca.93733. eCollection 2024.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Takashi Ito
2. 発表標題 Analyses of association between characteristics of patients with EGFR mutations and effect of ICIs after EGFR-TKIs.
3. 学会等名 JSMO2021（第18回日本臨床腫瘍学会学術集会）
4. 発表年 2021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	田中 伸幸  (Tanaka Nobuyuki)  (60280872)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長     (81303)	

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