

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08169

研究課題名(和文) 循環腫瘍細胞を用いたEGFR遺伝子変異陽性肺癌におけるLINC0046の研究

研究課題名(英文) Study of LINC0046 in EGFR mutation-positive lung cancer using circulating tumor cells

研究代表者

磯部 和順 (Isobe, Kazutoshi)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70385607

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)：Long non-coding RNA のLINC00460は肺癌において腫瘍の上皮間葉移行、運動能の促進との関連性が報告されており、我々はEGFR遺伝子変異陽性肺癌患者から得られた54サンプル(30例の腫瘍組織から抽出したRNAと24例の血漿遊離RNA)におけるLINC00460発現を評価した。腫瘍組織が抽出した30例や血漿細胞遊離 RNA から抽出した24例を検討したところ、LINC00460の発現は臨床ステージと有意に相関していなく、LINC00460の高発現群は低発現群と比較してオシメルチニブの治療効果が低く予後も短い傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者のLINC00460の発現亢進は、オシメルチニブで治療された患者の予後不良因子であることが確認された。これらの研究は血液検体や腫瘍組織を用いた確実なサンプリングに基づいた個別化治療のシステム構築に寄与し、LINC00460の有無を層別化因子とした原発性肺癌の個別化治療法の確立に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNA LINC00460 has been reported to be associated with epithelial-mesenchymal transition and promotion of tumor motility in lung cancer, and we evaluated LINC00460 expression in 54 samples (RNA extracted from tumor tissues in 30 cases and plasma-free RNA in 24 cases) obtained from lung cancer patients with EGFR mutation. In examining 30 cases from which tumor tissues were extracted and 24 cases from which plasma cell-free RNA was extracted, we found that LINC00460 expression was not significantly correlated with clinical stage, and that patients with high LINC00460 expression tended to have a lower therapeutic effect of osimertinib and a shorter prognosis compared to those with low LINC00460 expression.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：原発性肺癌 EGFR遺伝子変異 long non-coding RNA LINC00460

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年、従来転写のノイズとして考えられていた、タンパク質をコードしない長い RNA (long non-coding RNA: lncRNA) が、腫瘍の進行および転移に関与する重要な調節因子として注目されるようになった。一般に、長さが 200 塩基を超えるものが lncRNA として分類される^{1,2}。しかしながら、microRNA や siRNA のような small non-coding RNA は基礎から臨床応用に至るまで幅広く研究が進められているのに対して、lncRNA に関する研究は未だ途に就いたばかりであり、特に、非小細胞肺癌における lncRNA の役割は現在においてもほとんど解明されていない。
- (2) EGFR がもたらす異常なシグナルは、細胞の増殖、転移、血管新生、アポトーシスの抑制などを引き起こし、癌の悪性化と密接に関与することが知られている。しかしながら、このような変異を有する EGFR がもたらす下流のシグナルへの影響は未だ不明な点が多く残されている。LINC00460 は肺癌において腫瘍の上皮間葉移行、運動能の促進との関連性が報告されている³。
- (3) 米国国立がん研究所 (NCI) による大型がんゲノムプロジェクトである The Cancer Genome Atlas (TCGA) により公開されている非小細胞肺癌のトランスクリプトーム情報 (n=500) によると lncRNA00460 が高発現した肺癌は低発現のものに比較して全生存期間が有意に不良であった (p=0.029)。さらに、この lncRNA00460 は腺癌で有意に発現上昇を認め、EGFR 遺伝子変異陽性例で有意に発現上昇が認められた。さらに、肺癌細胞株 (A549, H1299, PC-9, H4006, H1975) に、qRT-PCR を用いて lncRNA の発現量を定量した。結果、細胞株肺癌細胞株 (A549, H1299, PC-9, H4006, H1975) は野生型の肺癌細胞株と比較して lncRNA の発現は有意に亢進していた (p < 0.001)。EGF による lncRNA00460 の発現量の変化を調べたところ、EGFR が活性化された場合にも発現誘導されることがわかった。また、lncRNA00460 をノックアウトした細胞株では、野生型の細胞株に比べて gefitinib の感受性が増大することがわかった⁴。
- (4) また、LINC00460 が miR-539 や miR-769-5p などの competing endogenous RNA として機能し、PI3K/AKT シグナル伝達経路を阻害することで EGFR-TKI の耐性を誘導することが報告されている^{5,6}。この PI3K/AKT シグナル伝達経路の異常は、オシメルチニブの初回治療における耐性機序の約 7%、2 次治療における耐性機序の約 4-11% を占めることが報告されている⁵。

2. 研究の目的

- (1) 本研究は、lncRNA00460 の診断方法や治療方法が臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。非小細胞肺癌の手術検体を用いて、腫瘍組織および正常組織での lncRNA00460 発現量と臨床情報 (組織型や臨床病期、EGFR 遺伝子変異の有無) および EGFR-TKI の客観的奏効率や無増悪生存期間 (PFS) との相関性を検討する
- (2) EGFR 感受性変異および EGFR-TKI 耐性遺伝子 (T790M、C797S) を持つ肺癌組織における lncRNA00460 の発現量を比較検討する。

(3) *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の血液検体における循環腫瘍細胞 (CTC) や血漿遊離 DNA (cfDNA) 中の lncRNA00460 の発現量を検討する。

(4) *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における CTC や cfDNA 中の lncRNA00460 と予後予測因子を検討する。

3. 研究の方法

(1) *EGFR* 遺伝子変異陽性および陰性の原発性肺癌の手術検体からそれぞれ 50 例を選択し、腫瘍を含む部分と含まない部分のブロックを作成する。腫瘍を含む部分と含まない部分のブロックを RNA 用検体 (10 μ m、3~4 片/1 tube) の lncRNA00460 のプライマーを用いて、RNA 用検体を PCR 法で lncRNA00460 を同定し、半定量化する。

(2) 全血 10ml より血球成分のみを抽出し、CTC 濃縮器 (ClearCell[®] FX system) をラベルフリーの CTC を採取する。また CTC 数のカウントを行う。QIAamp DNA Micro Kit にて DNA を、RNeasy Micro Kit にて lncRNA00460 を抽出する。

(3) 血球成分を除去した全血 10 mL 中から QIAamp circulating nucleic acid kit を用いて mRNA 及び cfDNA を抽出する。

(4) 抽出した mRNA から lncRNA00460, BIM, PD-L1, HER2, MET, VEGFRA, PUMA, EGFR, BIM-EL, L, S を Real-time PCR 法を用いて発現を検証する相対定量を実施する。KCL22 細胞株、HCC827 細胞株を calibrator として相対定量値を算出する。

(5) 抽出した DNA からは *EGFR* 感受性変異、*T790M* は Cobas EGFR mutation test ver.2 で、*C797S* は Direct Sequence 法で検出する。

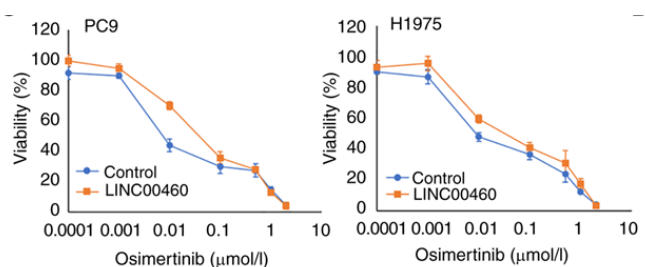
(6) 以上より得られた結果を総括後、統計学的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 我々は、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の細胞株 (PC9 細胞株) に対し、オシメルチニブを長期間暴露することでオシメルチニブ耐性株を樹立した。オシメルチニブ耐性の獲得により、NSCLC 細胞株における LINC00460 の発現が増加した。対照的に、低分子干渉 RNA (siRNA) をトランスフェクションによる LINC00460 のノックダウンはオシメルチニブに対する感受性を増加させた

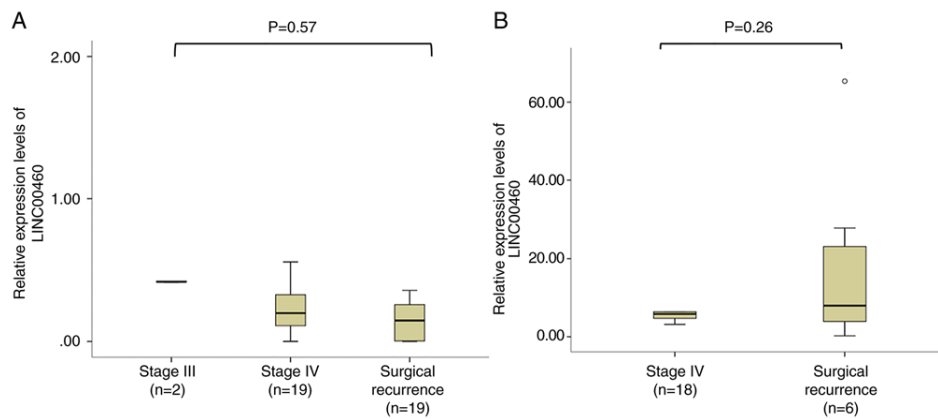
が、In Vitro 転写合成 (IVT) した LINC00460 をトランスフェクションで導入すると NSCLC 細胞株 (PC9, H1975) はオシメルチニブに対する感受性が低下した (図 1)。

図 1



(2) さらに、我々は *EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌患者から得られた 54 サンプル (30 例の腫瘍組織から抽出した RNA と 24 例の血漿 free-RNA) における LINC00460 発現を評価した。腫瘍組織が抽出した 30 例の stage III、IV、および術後再発の LINC00460 発現レベルを比較したところ、有意差は認めなかった (図 2A)。同様に、血漿細胞遊離 RNA から抽出した 24 例では、LINC00460 発現レベルは stage IV と術後再発症例の間に有意差は認めなかった (図 2B)。この結果は、オシメルチニブで治療された *EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌患者のサンプルでは、LINC00460 発現が臨床ステージと有意に相関していないことが示唆された。

図 2

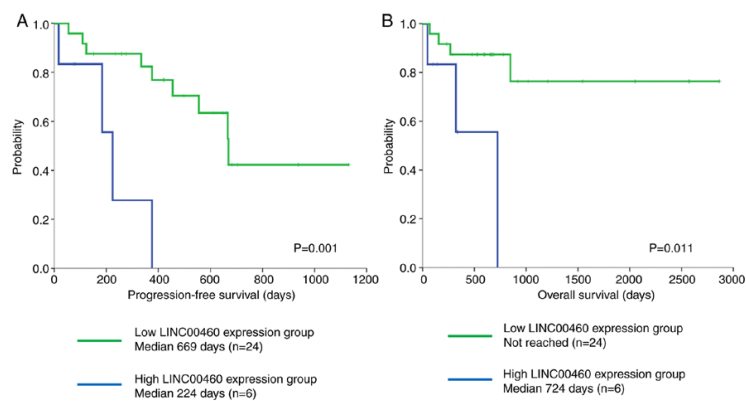


(3) 本研究では、原発巣における LINC00460 の低発現群 (n=24) と比較して、高発現群 (n=6) のオシメルチニブに対する奏効率が有意に低く (16.6% vs. 60.0%; P=0.044)、無増悪生存期間 (PFS) 中央値 (224 日 vs. 669 日; P=0.001) が有意に短く、全生存期間中央値も有意に短かった (724 日 vs. 未到達; P=0.011) (図 3)。

図 3

Clinical response	High LINC00460 expression (n=6)	Low LINC00460 expression (n=24)	P-value
ORR, %	16.6	60	0.044
DCR, %	83.3	91.6	0.54

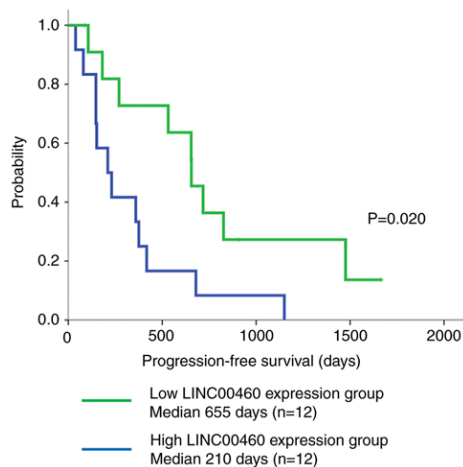
ORR, best overall response rate; DCR, disease-control rate.



(4) 血漿 free-RNA で LINC00460 高発現の患者 (n=12) の PFS は、低発現の患者 (n=12) よ

りも有意に短かった (PFS 中央値: 655 日 vs. 210 日; $P=0.020$)。以上より、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者の LINC00460 の発現亢進は、オシメルチニブで治療された患者の予後不良因子であることが確認された (図 4)。

図 4



<引用文献>

- ① Yu P, He X, Lu F, Li L, Song H and Bian X: Research progress regarding long-chain non-coding RNA in lung cancer: a narrative review. *J Thorac Dis* 14: 3016-3029, 2022. doi: 10.21037/jtd-22-897.
- ② Chen X, Song J, Wang X, Sun D, Liu Y and Jiang Y: LncRNA LINC00460: Function and mechanism in human cancer. *Thorac Cancer* 13: 3-14, 2022. doi: 10.1111/1759-7714.14238.
- ③ Ma G, Zhu J, Liu F and Yang Y: Long Noncoding RNA LINC00460 Promotes the Gefitinib Resistance of Nonsmall Cell Lung Cancer Through Epidermal Growth Factor Receptor by Sponging miR-769-5p. *DNA Cell Biol* 38: 176-183, 2019. doi: 10.1089/dna.2018.4462.
- ④ Nakano Y, Isobe K, Kobayashi H, et al.: Clinical importance of long non-coding RNA LINC00460 expression in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Int J Oncol* 56: 243-257, 2020. doi: 10.3892/ijo.2019.4919.
- ⑤ Wang HX, Kang LJ, Qin X, Xu J and Fei JW: LINC00460 promotes proliferation and inhibits apoptosis of non-small cell lung cancer cells through targeted regulation of miR-539. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24: 6752-6758, 2020. doi: 10.26355/eurrev_202006_21663.
- ⑥ Zhao H, Wang Y and Ren X: Nicotine promotes the development of non-small cell lung cancer through activating LINC00460 and PI3K/Akt signaling. *Biosci Rep* 39, 2019. doi: 10.1042/BSR20182443.

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 YUTA NAKANO, KAZUTOSHI ISOBE, TAKAHIRO YOSHIZAWA, NAOHISA URABE, SAKAE HOMMA, KAZUMA KISHI	4. 巻 26
2. 論文標題 Upregulation of long non-coding RNA LINC00460 in EGFR-mutant lung cancer indicates a poor prognosis in patients treated with osimertinib	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letter	6. 最初と最後の頁 380-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.13966.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazutoshi Isobe, Takahiro Yoshizawa, Susumu Sakamoto, Yujiro Takai, Naobumi Tochigi, Akira Iyoda, Sakae Homma, Kazuma Kishi
2. 発表標題 Clinical Importance of LINC00460 Expression in EGFR Mutation-Positive Lung Cancer Treated with Osimertinib
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯部和順、吉澤孝浩、卜部尚久、坂本 晋、高井雄二郎、栃木直文、岸 一馬
2. 発表標題 オンメルチニブを投与したEGFR遺伝子変異陽性肺癌におけるLINC00460発現の検討
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 EGFR遺伝子変異陽性飛翔細胞肺癌の検出方法	発明者 磯部和順、中野雄大	権利者 磯部和順
産業財産権の種類、番号 特許、7244913	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------