

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461187

研究課題名(和文) ヒト肺癌発生におけるROR1受容体とRTKのクロストーク制御及び活性化機序の解明

研究課題名(英文) ROR1 sustains RTK-mediated survival signaling in lung adenocarcinoma

研究代表者

山口 知也 (YAMAGUCHI, TOMOYA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：70452191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢肺の発生に必須なTTF-1遺伝子の発現持続は、末梢肺由来の肺腺がん細胞の生存に必須であり、TTF-1により直接転写活性化される受容体型チロシンキナーゼROR1がその生存シグナルを担っている。

我々は、肺腺がん細胞株においてROR1の抑制は、様々なRTKの活性化の低下を引き起こし、他のRTKの活性化を介したバイパスウェイによってEGFR-TKIに対する抵抗性を獲得した肺腺がん細胞株においても、ROR1の抑制は細胞増殖を阻害することが分かった。さらに我々は、ROR1は様々なRTKが集積するカベオラの構成分子であるCAV1の蛋白質レベルの発現を制御していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) sustains pro-survival signaling directly downstream of the lineage-survival oncogene NKX2-1/TTF-1 in lung adenocarcinoma. We analyzed the effects of siROR1 treatment on the phosphorylation state using a human phospho-RTK array, which revealed a significant decrease in the phosphorylation of multiple RTKs in both NCI-H1975 and PC-9 lung adenocarcinoma cells. We found that ROR1 knockdown effectively overcame ligand-mediated EGFR-TKI resistance in PC-9 or NCI-H1975 cell. These results suggest that ROR1 repression inhibits lung adenocarcinoma cells with acquired EGFR-TKI resistance through bypass pathways. Finally, we also found that ROR1 knockdown significantly decreased the protein expression of CAV1, the essential structural component of caveolae, in lung adenocarcinoma cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：肺腺がん ROR1 カベオラ EGFR-TKI 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

末梢肺の発生に必須な TTF-1 遺伝子の発現持続は、末梢肺由来の肺腺癌細胞の生存に必須であるが、TTF-1 が伝える生存シグナルは、永らく不明のままであった。

我々は最近、TTF-1 によって転写活性化される受容体型チロシンキナーゼ ROR1 がその生存シグナルを担っていることを突き止めた。また興味深いことに、ROR1 は上皮成長因子受容体である EGFR と相互作用することにより EGFR シグナルの維持に関わっていることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、ROR1 と EGFR のような、ROR1 と他の受容体型チロシンキナーゼ (RTK) との新たなクロストーク制御機構を明らかにし、がんにおいて非常に注目を集めつつある ROR1 が制御する新たなシグナル伝達機構の解明を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1) バイパスパスウェイを介した EGFR-TKI 抵抗性を獲得した肺腺癌細胞における ROR1 抑制の効果

肺腺癌はゲフィチニブなどの上皮成長因子受容体である EGFR 阻害剤に対して当初は著効を示すが、ほぼ全てにおいて治療抵抗性 (耐性) を獲得することが臨床上的課題となっている。その耐性獲得機序の1つとして、EGFR 以外の他の RTK からのシグナル伝達におけるバイパスパスウェイが存在する。そこで肺腺癌細胞株 (PC-9、NCI-H1975) や外陰部上皮癌細胞株 (A431) を用いて MET や IGF-1R のリガンドである HGF や IGF-1 添加時における EGFR-TKI 耐性獲得細胞での ROR1 抑制の効果を MTT アッセイにより検討した。

(2) 肺腺癌細胞株での ROR1 抑制における様々な RTK 活性化への影響

肺腺癌細胞株 (PC-9、NCI-H1975) における ROR1 発現抑制に伴う様々な RTK 活性化への影響を調べるために、一度に 49 種類の RTK の活性化 (リン酸化) を検出することのできるヒトリン酸化 RTK アレイを用いて検討を行った。

(3) 肺腺癌細胞株での ROR1 抑制におけるカベオラ構成分子 (CAV1、CAV2) の発現への影響

肺腺癌細胞株 NCI-H1975 での配列の異なる 3 種類の siROR1 におけるカベオラ構成分子 (CAV1、CAV2) の蛋白質レベルの発現への影響について、ウエスタンブロッティング法に

より解析を行った。

さらに肺腺癌細胞株 NCI-H1975 での siEGFR、siERBB2、siMET におけるカベオラ構成分子 (CAV1、CAV2) の蛋白質レベルの発現への影響について、ウエスタンブロッティング法により解析を行った。

また同様に肺腺癌細胞株である NCI-H1975 細胞における siROR1 によるカベオラ構成分子 (CAV1、CAV2) の mRNA レベルの発現への影響について、qRT-PCR 法により解析を行った。

さらに同様に肺腺癌細胞株である NCI-H1975 細胞における siROR1 によるカベオラ構成分子 (CAV1、CAV2) の細胞内局在・発現への影響について、細胞染色法により解析を行った。

(4) 肺腺癌細胞株での CAV1 抑制における様々な RTK 活性化への影響と細胞増殖への効果

肺腺癌細胞株 (PC-9、NCI-H1975) における CAV1 発現抑制に伴う様々な RTK 活性化への影響を調べるために、RTK の活性化 (リン酸化) を検出することのできるヒトリン酸化 RTK アレイを用いて検討を行った。

また、肺腺癌細胞株 (PC-9、NCI-H1975) を用いて MET や IGF-1R のリガンドである HGF や IGF-1 添加時における EGFR-TKI 耐性獲得細胞での CAV1 抑制の効果を MTT アッセイにより検討した。

## 4. 研究成果

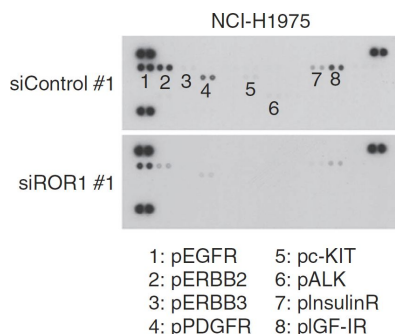
(1) バイパスパスウェイを介した EGFR-TKI 抵抗性を獲得した肺腺癌細胞における ROR1 抑制の効果

肺腺癌細胞株 PC-9 は、活性化型 EGFR 変異を有していることから、ゲフィチニブに感受性を示すが、HGF 添加時には MET が活性化することでゲフィチニブに抵抗性を示すようになる。このような条件下におかれた PC-9 細胞株において ROR1 の発現を siRNA により抑制を行うと、有意な細胞増殖の低下が認められ、ゲフィチニブ耐性を克服することが分かった。同様に肺腺癌細胞株 NCI-H1975 は、活性化型 EGFR 変異に加え、T790M 二重変異を有していることから、ゲフィチニブに抵抗性を示すが、次世代型の EGFR 阻害剤である CL-387,785 に対しては感受性を示す。しかしながら HGF 添加時には MET が活性化することで CL-387,785 に抵抗性を示すようになる。このような条件下におかれた NCI-H1975 細胞株において ROR1 の発現を siRNA により抑制を行うと、有意な細胞増殖の低下が認められ CL-387,785 耐性を克服することが分かった。さらに、外陰部上皮癌細胞株 A431 は、活性化型 EGFR 変異を有していることから、ゲフィチニブに感受性を示すが、IGF-1 添加時に

は IGF-1R が活性化することでゲフィチニブに抵抗性を示すようになる。このような条件下におかれた A431 細胞株において ROR1 の発現を siRNA により抑制を行うと、有意な細胞増殖の低下が認められ、ゲフィチニブ耐性を克服することが分かった。

### (2) 肺腺癌細胞株での ROR1 抑制における様々な RTK 活性化への影響

肺腺癌細胞株 NCI-H1975 において、siROR1 によって ROR1 の発現を抑制させた細胞抽出液を用いて、49 種類の RTK のリン酸化を検出することのできるヒトリン酸化 RTK アレイに作用させた結果、siControl 処理と比較して有意に様々な RTK のリン酸化の低下が認められた。特に ERBB2 や ERBB3、PDGFR、InsulinR、IGF-1R の顕著なリン酸化の低下を引き起こすことが判明した(下図)。



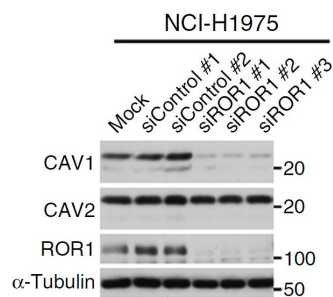
さらに肺腺癌細胞株 PC-9 において、siROR1 によって ROR1 の発現を抑制させた細胞抽出液を用いて、ヒトリン酸化 RTK アレイに作用させた結果、siControl 処理と比較して有意に様々な RTK のリン酸化の低下が認められた。特に ERBB2 や ERBB3、MET、IGF-1R の顕著なリン酸化の低下を引き起こすことが判明した。また、これまでの研究結果と同様に肺腺癌細胞株 NCI-H1975 および PC-9 どちらの細胞株においても、siROR1 によって EGFR のリン酸化には影響が認められなかった。

これらの結果は、肺腺癌細胞株において ROR1 が様々な RTK の活性化の維持に関与していることを示す結果である。

### (3) 肺腺癌細胞株での ROR1 抑制におけるカベオラ構成分子 (CAV1、CAV2) の発現への影響

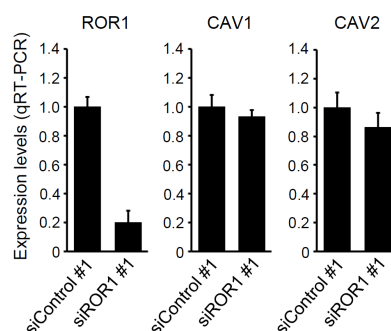
これまでの結果から、ROR1 抑制により様々な RTK の活性化の低下が引き起こされ、また ROR1 抑制によって、MET や IGF-1R の活性化が阻害されることによって、MET や IGF-1R を介したバイパススウェイによるゲフィチニブ耐性を克服できることが判明した。そこで様々な RTK が集積しプラットフォームとしての働きがあり、RTK からの生存シグナルに深く関与する細胞膜に存在するカベオラ構造に着目した。まず、肺腺癌細胞株である NCI-H1975 での ROR1 抑制によるカベオラ構成

分子である CAV1 や CAV2 の蛋白質レベルでの発現について検討したところ、配列の異なる 3 種類の siROR1 によって、有意な CAV1 の発現低下を認めた。対照的に CAV2 の蛋白質レベルでの発現には影響が見られなかった(下図)。



また肺腺癌細胞株である NCI-H1975 での siEGFR、siERBB2、siMET によるカベオラ構成分子である CAV1 や CAV2 の蛋白質レベルでの発現について検討した。その結果、siROR1 のときと比較して CAV1 や CAV2 の蛋白質レベルでの発現には影響が見られなかった。

次に肺腺癌細胞株である NCI-H1975 での ROR1 抑制によるカベオラ構成分子である CAV1 や CAV2 の mRNA レベルでの発現について検討を行った。その結果、ROR1 の mRNA の発現が有意に低下している条件下において、CAV1 や CAV2 の mRNA の発現には影響が見られなかった(下図)。



さらに肺腺癌細胞株である NCI-H1975 での ROR1 抑制によるカベオラ構成分子である CAV1 や CAV2 の細胞内局在・発現を調べたところ、蛋白質レベルでの発現変化と同様に、ROR1 抑制において CAV1 の蛍光強度は顕著に低下を示した。これに対して、CAV2 の細胞内局在は、ROR1 抑制の影響を受けず、細胞質・細胞膜での局在が観察され、細胞膜にカベオラが集積することで観察される蛍光強度の高い濃縮領域も観察された。

これらの結果は、肺腺癌細胞株において ROR1 が蛋白質レベルで CAV1 の発現を特異的に制御していることを示す結果である。

### (4) 肺腺癌細胞株での CAV1 抑制における様々な RTK 活性化への影響と細胞増殖への効果

肺腺癌細胞株 NCI-H1975 および PC-9 において、siROR1 のときと同様に siCAV1 によ

て CAV1 の発現を抑制させた細胞抽出液を用いて、ヒトリン酸化 RTK アレイに作用させた。その結果、siControl 処理と比較して有意に様々な RTK のリン酸化の低下が認められ、siROR1 のときに見られたリン酸化の低下を示す RTK と同じ傾向であった。

また siROR1 のときと同様に、肺腺癌細胞株である PC-9 における HGF を介した MET 活性化に伴うゲフィチニブ抵抗性の条件下において、CAV1 の発現を siCAV1 により抑制すると、siROR1 と同様に有意な細胞増殖の低下が認められ、ゲフィチニブ耐性を克服することが分かった。さらに肺腺癌細胞株である NCI-H1975 における HGF を介した MET 活性化に伴う CL-387,785 抵抗性の条件下において、CAV1 の発現を siCAV1 により抑制すると、siROR1 と同様に有意な細胞増殖の低下が認められ、CL-387,785 耐性を克服することが分かった。加えて、外陰部上皮癌細胞株である A431 における IGF-1 を介した IGF-1R 活性化に伴うゲフィチニブ抵抗性の条件下において、CAV1 の発現を siCAV1 により抑制すると、siROR1 と同様に有意な細胞増殖の低下が認められ、ゲフィチニブ耐性を克服することが分かった。

以上の結果から、ROR1 による CAV1 の発現制御が存在し、EGFR-TKI 耐性機序の 1 つであるバイパスパスウェイに寄与する、様々な RTK の活性化維持に関与していることが判明した。

#### 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 1 件)

Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T and Takahashi T

ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1

Nat Commun 7; 10060 (2016) 査読有  
[DOI: 10.1038/ncomms10060]

[学会発表](計 3 件)

Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T and Takahashi T

ROR1 functions as a scaffold of cavin-1 and CAV1, sustaining caveolae and RTK-mediated survival signaling in lung cancer  
AACR-IASLC Joint Lung Cancer Conference

サンディエゴ、アメリカ (2016 年 1 月 4 日 ~ 1 月 7 日)

山口知也、柳澤聖、Can Lu、井田梨沙、磯村久徳、鈴木元、藤本豊土、高橋隆 ROR1 によるカベオラ形成を通じた RTK 活性化維持を標的とした EGFR-TKI 耐性の克服

第 74 回日本癌学会学術総会

コアシンポジウム

名古屋国際会議場、愛知県名古屋市 (2015 年 10 月 8 日 ~ 10 月 10 日)

Yamaguchi T and Takahashi T

TTF-1/NKX2-1-induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma

3<sup>rd</sup> GDRI French Japanese Cancer Meeting  
トゥールーズ、フランス (2013 年 11 月 20 日 ~ 11 月 23 日)

[図書](計 3 件)

山口知也、高橋隆

- 肺がんの個別化医療 - 肺腺がんにおける TTF-1/NKX2-1 の相反する 2 つの機能

最新医学社 (2015 年) 総ページ数: 150 (27 ~ 32)

山口知也、高橋隆

- 基礎と臨床の最新研究動向 - 肺腺癌の分子病態における TTF-1 の二面性

日本臨牀社 (2013 年) 総ページ数: 755 (122 ~ 125)

山口知也、高橋隆

肺腺癌の生存シグナルを支える ROR1 キナーゼ

先端医学社 (2013 年) 総ページ数: 158 (64 ~ 66)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 癌細胞のカベオラの形成を特異的に抑制する化合物のスクリーニング方法、スクリーニングキット、該キットに用いるベクター及び形質転換体、並びに分子標的薬の適応患者の選択方法

発明者: 高橋隆、山口知也

権利者: 国立大学法人 名古屋大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/075127

出願年月日: 2014 年 10 月 24 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/molcar/jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 知也 (YAMAGUCHI, Tomoya)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：70452191

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

柳澤 聖 (YANAGISAWA, Kiyoshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：20372112