

平成 30 年 4 月 3 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08364

研究課題名(和文) 上皮間葉転換を起こした肺腺癌と上皮形質を保持した肺腺癌の統合的解析

研究課題名(英文) Integrative analyses of lung adenocarcinomas that have undergone epithelial to mesenchymal transition (EMT) and those that retain an epithelial phenotype

研究代表者

佐久間 裕司 (Sakuma, Yuji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1) EGFR-mutant肺腺癌細胞H1975には、tyrosine kinase inhibitor (TKI)存在下でも生存可能な亜株(WR7 cell)が含まれている。WR7細胞はEMTを起こし、EGFR非依存性かつ異性化酵素Pin1依存性に生存している。

2) Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)は、EGFR-mutant肺腺癌細胞HCC827由来のTKI耐性亜株に高発現する一方、親株(TKI感受性)には殆ど発現していない。我々はACE2に結合し、細胞に内在化される抗体を開発したが、この抗体は新規抗体医薬のベースとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：EGFR-mutant lung adenocarcinomas depend on the kinase for survival. We have identified a new molecular mechanism that contributes to TKI resistance, and a previously unrecognized membranous molecule TKI-resistant cancer cells selectively express. (1) The EGFR mutant lung adenocarcinoma cell line, H1975, has a subset of cells that exhibits an EMT phenotype and can thrive in the presence of EGFR TKIs. These cells depend on the isomerase Pin1 for survival in vitro, unlike their parental cells. (2) A mesenchymal EGFR-independent subline derived from the EGFR mutant lung adenocarcinoma cell line, HCC827, expressed ACE2 to a greater extent than its parental cells. We also developed an anti-ACE2 mouse monoclonal antibody (mAb), termed H8R64, that was internalized by ACE2-expressing cells. If an antibody-drug conjugate consisting of a humanized mAb based on H8R64 and a potent anticancer drug were produced, it could be effective for the treatment of EGFR-mutant lung adenocarcinomas.

研究分野：病理学

キーワード：肺腺癌 上皮間葉移行 EGFR 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) 遺伝子変異陽性 (以下 *EGFR*-mutant) 肺腺癌が当初は反応した第一、第二世代 *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs) に抵抗性を示す最大の機序は *EGFR* T790M 変異である。第三世代 *EGFR* TKI は T790M 変異をも抑制可能であるが、それに対しても *EGFR*-mutant 肺腺癌細胞はいずれ耐性を獲得することを確認していた。*EGFR*-mutant 肺腺癌には間葉系の表現型を呈し “*EGFR* 非依存性” に生存・増殖可能な subpopulation が含まれており、これが *EGFR* TKI 耐性の根本原因との仮説を得ていた。

2. 研究の目的

上記したような *EGFR* 非依存性の特異細胞に焦点を当て、その細胞の *EGFR* 阻害薬耐性の機構を解明することを目指した。また別のアプローチとして *EGFR* 非依存性の癌細胞の表面に特異的に発現する分子が同定されれば、その分子を標的とする治療法が可能となるため、そのような分子の探索も行った。

3. 研究の方法

「TKI 耐性細胞における異性化酵素 Pin1 の役割」

L858R + T790M 変異を有する *EGFR*-mutant 肺腺癌肺腺癌細胞株 H1975 細胞を使用した。この細胞に第三世代 *EGFR* TKI の一つである WZ4002 を長期投与し、耐性亜株 WZ4002-Resistant (WR) 7 細胞を得た (図 1)。親株と WR7 細胞を比較し、WR7 細胞の TKI 耐性に関する分子を同定した。

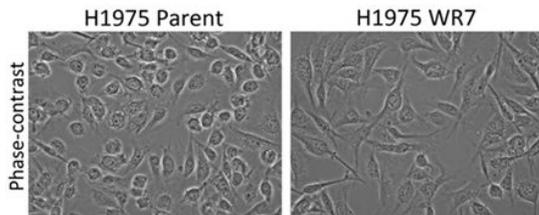


図 1. 本研究を使用した H1975 細胞の親株と WR7 細胞の位相差顕微鏡写真

「TKI 耐性細胞に発現する ACE2 に対する抗体開発」

EGFR-mutant 肺腺癌肺腺癌細胞株 HCC827 (exon 19 deletion) の親株 (TKI 高感受性) とそれ由来の TKI 耐性亜株 GR2 細胞を解析し、GR2 細胞のみで発現する膜表面分子を探索した。

4. 研究成果

「TKI 耐性細胞における異性化酵素 Pin1 の役割」

(1) 親株と比較すると WR7 細胞は長い突起を有しており、epithelial to mesenchymal transition (EMT) を生じていることを示唆していたため、上皮マーカー、間葉マーカーの発現を western blot 法で確認すると、WR7 cell

は実際に上皮間葉移行 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) を起こしていた。同時に WR7 細胞では autophagy が活発に生じていることも確認された (図 2)。この autophagy の活性化は以前に詳細に解析した別の *EGFR* mutant 肺腺癌細胞株である HCC827 や HCC4006 から樹立された *EGFR* TKI 耐性細胞 (GR 細胞) と同様と考えられた (Sakuma et al. *Lab Invest* 2013; 93: 1137-46.)。今回樹立した H1975 WR7 細胞も autophagy 依存性に生存していることも確認した。

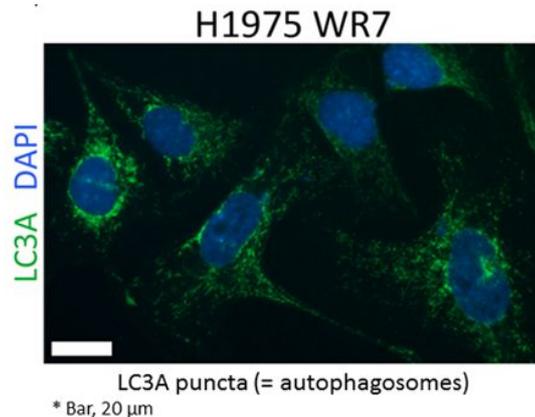


図 2. Autophagosome を胞体内に有する WR7 細胞の蛍光顕微鏡写真

(2) H1975 WR7 細胞はその親株と異なり、もう一つの第三世代 *EGFR* TKI である CO-1686 存在下でも増殖可能であり、かつ興味深いことに薬剤で治療していない状態でも *EGFR* の自己リン酸化 (活性化) は確認できなかった (図 3)。以上の実験結果は H1975 WR7 細胞では *EGFR* への依存性が低く、代償的に autophagy 依存性が高い細胞であることを示唆していた。

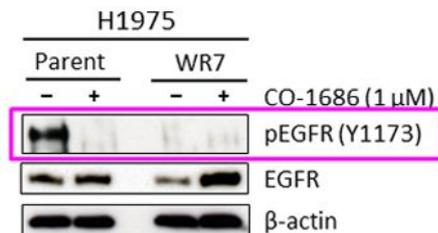


図 3. WR7 細胞は TKI がいない状態でも、リン酸化 EGFR 陰性である (western blot)

(3) 本研究で着目した Pin1 は異性化酵素でありリン酸化された serine/threonine kinase の立体構造を *cis* 体あるいは *trans* 体に変換する。蛋白の立体構造はその機能と直接的に関連することから、Pin1 は細胞内に数多く存在する serine/threonine kinase の機能を調節していると考えられる。先行する研究では iPS 細胞を含む (正常) 幹細胞やいわゆる癌幹細胞の生存を促進すると報告されている。今回、我々が検索したところ Pin1 は mRNA、蛋白ともに親株よりも WR7 細胞に多く発現していた (図 4)。

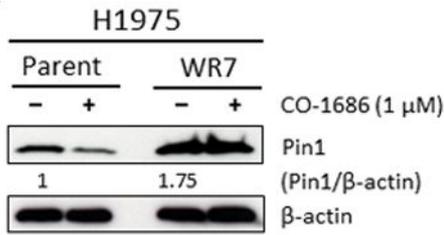


図4.WR7細胞は親株と比較してPin1の発現量が多い(western blot)

(4) 親株、WR7細胞で発現するPin1をsiRNA導入により抑制すると、親株には顕著な変化を認めないものの、WR7細胞では増殖が顕著に抑制され(図5)、かつapoptosisが生じていた(図6)。Pin1 knockdownがWR7細胞にapoptosisをもたらす詳細な機序は不明ながら、WR7細胞のみでAKTのリン酸化が抑制されていることから(図6)、これが原因の一つと考えられた。

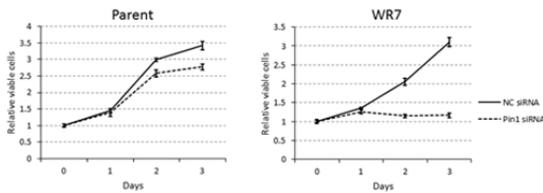


図5.親株はPin knockdownの影響を殆ど受けないが、WR7細胞は殆ど増殖できない

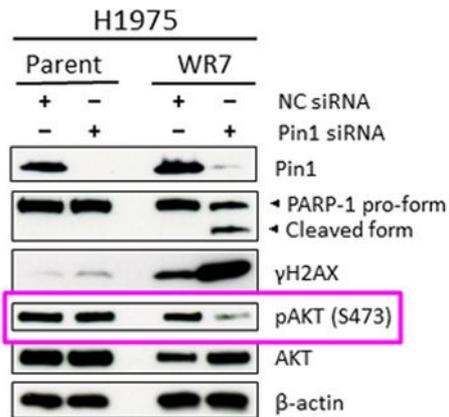


図6.Pin knockdownを受けたWR7細胞は明らかにapoptosisし、AKTのリン酸化は減弱している

(5) 本学附属病院で治療されたEGFR mutant肺腺癌のお一人の患者さんのTKI治療前と治療後(耐性獲得後)の癌組織を解析したところ、高分化乳頭状腺癌である治療前の組織ではPin1は陰性だが、耐性獲得後のEMTを生じた胸膜播種巣ではPin1が核に発現していることを確認した(図7)。以上の培養細胞を使用したin vitroの実験とそれを裏付けるような臨床検体でのPin1発現状態から、Pin1はEGFR TKI耐性に関与していることが示唆された。

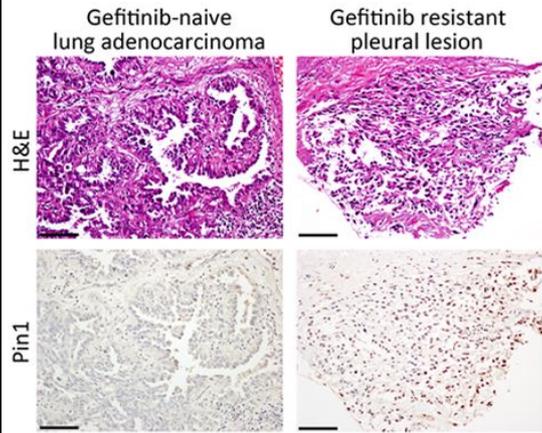


図7.治療前の組織(原発性肺腺癌)ではPin1は陰性であるが、TKI耐性獲得後の胸膜播種巣ではPin1陽性である(scale bar, 100 μm)

「TKI耐性細胞に発現するACE2に対する抗体開発」

(1) 本研究ではangiotensin converting enzyme 2 (ACE2)がEGFR-mutant肺腺癌細胞HCC827由来のTKI耐性亜株GR2 cellに高発現する一方、親株(TKI感受性)には殆ど発現していないことを世界で初めて報告した(図8)。

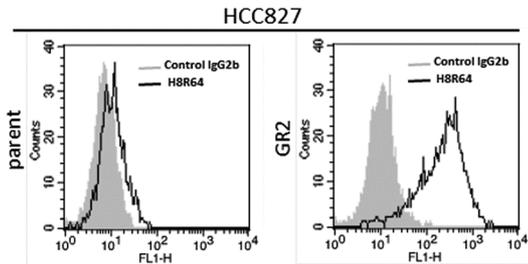
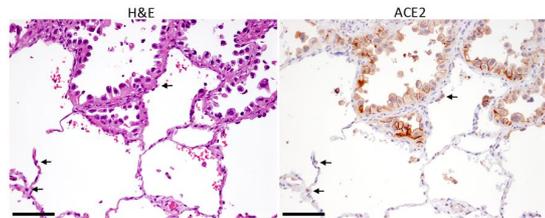


図8.GR2細胞は親株と比較してACE2を膜に発現している(flow cytometer)

(2) 原発性EGFR-mutant肺腺癌の少なくとも一部の癌細胞はACE2を背景の正常肺よりも



強く発現していることも確認した(図9)。

図9.ACE2を細胞膜に発現する原発性EGFR-mutant肺腺癌(scale bar, 100 μm)

(3) 我々はさらにACE2に結合し、細胞に内在化されるmouse monoclonal antibody (H8R64)を開発したので(図10)この抗体をベースとするヒト化抗体と抗癌剤からなる抗体医薬はEGFR-mutant肺腺癌治療に使用しうると期待される。

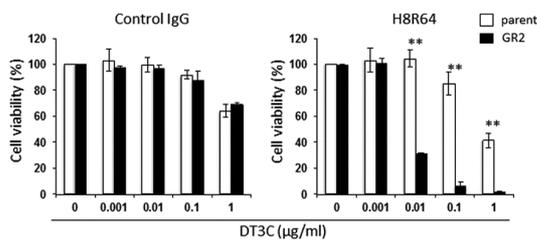


図 10 . H8R64 と毒素 (DT3C) を結合させると GR2 有意に細胞死を誘導する

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 4 件)

(1) Sakuma Y. Epithelial-to-mesenchymal transition and its role in *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma and idiopathic pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 2017; 67: 379-388. [doi: 10.1111/pin.12553.] (査読有り)

(2) Yamaguchi M, Hirai S, Sumi T, Tanaka Y, Tada M, Nishii Y, Hasegawa T, Uchida H, Yamada G, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Angiotensin-converting enzyme 2 is a potential therapeutic target for *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 487: 613-8. [doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.102.] (査読有り)

(3) Yamaguchi M, Hirai S, Tanaka Y, Sumi T, Miyajima M, Mishina T, Yamada G, Otsuka M, Hasegawa T, Kojima T, Niki T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Fibroblastic foci, covered with alveolar epithelia exhibiting epithelial-mesenchymal transition, destroy alveolar septa by disrupting blood flow in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lab Invest* 2017; 97: 232-42. [doi: 10.1038/labinvest.2016.135.] (査読有り)

(4) Sakuma Y, Nishikiori H, Hirai S, Yamaguchi M, Yamada G, Watanabe A, Hasegawa T, Kojima T, Niki T, Takahashi H. Prolyl isomerase Pin1 promotes survival in *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma cells with an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Lab Invest* 2016; 96: 391-8. [doi: 10.1038/labinvest.2015.155.] (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

(1) 佐久間 裕司：肺・線維芽細胞の由来と病的意義 (第 63 回 日本病理学会秋期特別総会 companion meeting 2. 2017 年 11 月 3 日. 東京・東京教育会館)

(2) 佐久間 裕司：*EGFR* 変異陽性肺腺癌と特発性肺線維症の分子細胞病理学 (第 62 回日本病理学会秋期特別総会、演題番号 A-2、2016 年 11 月 10 日 金沢・金沢市文化ホール)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/molm/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間 裕司 (SAKUMA, Yuji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364514

(2) 研究分担者

山口 美樹 (Yamaguchi, Miki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10530454