

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09644

研究課題名(和文) Wntシグナル伝達経路を標的とした非小細胞肺癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Developing novel therapeutic strategies for non-small cell lung cancer with Wnt signaling alterations

研究代表者

砂長 則明 (Sunaga, Noriaki)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70400778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌(NSCLC)細胞においてWnt/カテニン経路活性化によりLGR6発現が誘導され、NSCLC細胞の増殖はLGR6阻害により抑制されることを見出した。また、LGR6発現はEGFR変異陰性、脈管浸潤陽性の肺腺癌において有意に高く、LGR6高発現が肺腺癌の予後不良因子であることが示された。さらに、マイクロアレイにより、CTNNB1変異陽性NSCLC細胞においてLGR6阻害により発現変動する遺伝子群を解析した結果、LGR6発現が炎症誘導や腫瘍微小環境に関わる経路や、癌幹細胞マーカー、サイトカイン、増殖因子などの遺伝子群の発現制御を介してNSCLCの悪性形質獲得に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は死亡率の高い癌であり、新規治療の開発が急務である。我々は、非小細胞肺癌においてWnt経路活性化により誘導されるLGR6過剰発現が、炎症誘導や腫瘍微小環境に関わるシグナル伝達経路や、癌幹細胞マーカー、サイトカイン、増殖因子などの分子を制御することで、悪性形質の獲得に寄与していることを明らかにした。また、EGFR変異陰性の肺腺癌においてLGR6高発現が予後不良と関連していることや、LGR6阻害が肺癌細胞の増殖を抑制することを見出した。本研究の結果から、LGR6が高悪性度の肺癌に対する新たな治療標的分子であり、予後予測バイオマーカーとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：LGR6 overexpression was induced by activation of the Wnt/  $\beta$ -catenin signaling pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, in which tumor growth was inhibited by LGR6 knockdown. In NSCLC surgical specimens, LGR6 was significantly higher in lung adenocarcinomas with wild-type EGFR and vascular invasion-positive, and elevated LGR6 expression was an independent poor prognostic marker. To elucidate molecular mechanisms underlying LGR6-induced malignant phenotypes, we conducted microarray expression profiling of NSCLC cells with or without LGR6 knockdown. Consequently, several LGR6-associated genes including cancer stem cell markers, cytokines, and growth factors were identified. Pathway analysis of microarray data also revealed that LGR6 could regulate pathways involved in inflammation and tumor microenvironment. These results suggest that LGR6 overexpression induced by activation of the Wnt pathway contributes to an aggressive phenotype and could be a therapeutic target in NSCLC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は進行期で発見されることが多く、日本において最も死亡率の高い癌である。肺癌は小細胞癌 (SCLC) と非小細胞肺癌 (NSCLC) に分類され、後者はさらに腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などに分けられる。NSCLCは肺癌全体の約85%を占め、そのうち腺癌が最も多く、次いで扁平上皮癌が多い。近年、NSCLCにおけるEGFR変異などのドライバー変異の発見、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬の開発により、進行肺癌の治療成績は改善傾向にある。一方、ほとんどの症例において、分子標的治療薬が一旦奏効しても薬剤耐性の獲得により再発を来す。また、免疫チェックポイント阻害薬は分子標的治療薬と比較して奏効割合が低く、特にドライバー変異陽性肺癌に対する効果が乏しいことが課題である(1, 2)。このように、肺癌の予後は依然として不良であり、治療成績を向上するための新たな治療法の開発が急務である。

Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達経路(以下Wnt経路とする)は種々の生物の初期発生や、運動・分化・増殖等の細胞機能制御を担っている。Wnt経路を構成する分子の異常は、肺癌を含む様々なヒト癌で認められ、癌の進展、癌幹細胞化、腫瘍微小環境などの制御に関わり、悪性形質の獲得や抗癌薬の耐性化に重要な役割を果たすと考えられる。Wnt経路の主要構成因子である $\beta$ -cateninをコードするCTNNB1遺伝子は、NSCLCの1~2%で変異しており、他の構成因子の異常に帰属するものも含め、約50%のNSCLCにおいてWnt経路の恒常的活性化が報告されている(3)。以上より、Wnt経路活性化に関わる分子異常は、NSCLCの悪性度と関連し、有力な治療標的と考えられる。

我々は、予備実験において、small interfering RNA (siRNA) によるCTNNB1ノックダウンがCTNNB1変異陽性NSCLC細胞株HCC15の細胞増殖を抑制することを見出した。また、マイクロアレイ解析により、HCC15においてCTNNB1ノックダウンにより発現低下する遺伝子として、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体6 (LGR6) を同定した。LGR6は肺胞上皮細胞の幹細胞マーカーであり(4)、進行期肺腺癌におけるLGR6高発現が報告されている(5)。また、LGR6と高い相同性を有するLGR5は、Wnt標的遺伝子かつ大腸癌幹細胞マーカーとして知られている(6)。以上のことから、LGR6が肺癌の悪性形質の獲得に重要な役割を果たし、治療標的分子や予後予測バイオマーカーである可能性が考えられた。そこで、前述のマイクロアレイ解析により同定されたLGR6を含むCTNNB1変異関連遺伝子群の解析をすすめるとともに、Wnt経路活性化によるLGR6過剰発現と肺癌の悪性形質との関連性や、LGR6の治療標的や予後予測バイオマーカーとしての意義を探索することを目的として本研究を行った。

### 2. 研究の目的

(1) 肺癌細胞株におけるLGR6を含むCTNNB1変異関連遺伝子群の発現を解析するとともに、肺癌のドライバー遺伝子変異との関連性や、LGR6阻害が腫瘍増殖に与える効果を調べ、Wnt経路活性化を有する肺癌の分子生物学的特徴やCTNNB1変異関連遺伝子の治療標的としての意義を探索する。

(2) 肺癌手術検体を用いて免疫組織染色法によるLGR6タンパク発現解析を行い、LGR6発現の臨床病理学的意義や予後予測バイオマーカーとしての意義を探索する。

(3) CTNNB1変異陽性NSCLC細胞株におけるLGR6ノックダウンによる遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析することにより、LGR6過剰発現による肺癌の悪性形質獲得の分子制御機構を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞株: NSCLC細胞株 41株 (H23, H157, H358, H441, H460, H661, H820, H838, H1264, H1299, H1373, H1395, H1437, H1648, H1650, H1666, H1755, H1792, H1819, H1975, H2009, H2030, H2087, H2122, H2126, H2347, H3255, HCC15, HCC44, HCC78, HCC95, HCC193, HCC515, HCC827, HCC2279, HCC2935, HCC4006, HCC4011, HCC4017, PC9, A427)、SCLC細胞株 23株 (H187, H209, H345, H378, H524, H526, H740, H865, H889, H1045, H1092, H1184, H1238, H1339, H1607, H1618, H1672, H1963, H2107, H2141, H2171, H2227, HCC33) と、非癌ヒト気道上皮細胞株 HBEC4 を実験に用いた。肺癌細胞株は 5% 牛血清添加 RPMI1640 培地で培養し、HBEC4 は牛下垂体抽出物 50  $\mu$ g/ml と EGF 5 ng/ml 添加 K-SFM 培地により培養した。細胞株は培養後、80~90%コンフルエントの状態を回収し、genomic DNA の精製と、total RNA の抽出を行い、cDNA を合成した。

(2) 遺伝子発現解析: Applied Biosystems 社より購入した設計済み Primer 及び Taqman probe により定量リアルタイム PT-PCR を行い、各遺伝子の mRNA 発現解析を行った。LGR6 抗体 (Santa Cruz 社)、 $\beta$ -catenin 抗体 (BD Transduction Laboratories 社)、Actin 抗体 (Sigma 社) を用いて、Western Blot 法による蛋白発現解析を行った。

(3) RNA 干渉法: CTNNB1 変異を標的とした siRNA は過去の研究(7)で設計された配列を基に作成し、その他の siRNA は設計済みのものを Dharmacon 社より購入した。siRNA は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社) を用いて細胞内へ導入し、遺伝子ノックダウン実験を行った。

(4) 細胞増殖能の評価: 細胞増殖能はコロニー形成アッセイにより評価した。また、抗 PARP 抗体 (Cell Signaling 社) を用いた Western Blot 法による Cleaved PARP フラグメントの検出によりアポトーシスを評価した。

(5)免疫組織染色:抗 LGR6 抗体(Abcam 社)を用いた免疫染色法により、腺癌 112 検体と扁平上皮癌 98 検体より成る 210 の NSCLC 手術検体と、SCLC 20 検体と大細胞神経内分泌癌(LCNEC)16 検体より成る肺神経内分泌腫瘍手術検体を用いて、LGR6 タンパク発現解析を行った。LGR6 タンパク発現レベルは、過去の研究の評価方法(8)を元に 0 から 4 までの 5 段階に分類し、0 から 2 までを低発現、3 と 4 を高発現と定義した。

(6)The Cancer Genome Atlas(TCGA)データベース解析:TCGA データベースを用いて、肺腺癌における LGR6 および TESC の発現解析を行った。

(7)マイクロアレイ解析:アジレント社製マイクロアレイを用いて、CTNNB1 変異陽性 NSCLC 細胞株 HCC15 における CTNNB1 ノックダウンや LGR6 ノックダウンによる遺伝子発現変動を解析した。

#### 4. 研究成果

(1)肺癌細胞株における LGR6 発現と CTNNB1 変異による LGR6 発現制御:

NSCLC 細胞株 41 株、SCLC 細胞 23 株を用いて、定量 RT-PCR 法により LGR6 遺伝子の mRNA 発現量を解析し、非癌ヒト気道上皮細胞株 HBEC4 と比較した。CTNNB1 変異細胞株や APC 変異細胞株を含む NSCLC 細胞株の約 30%と、SCLC 細胞株の約 70%において、LGR6 の過剰発現が認められた。また、SCLC 細胞株群における LGR6 発現レベルは、NSCLC 細胞株群と比較して有意に高かった。KRAS 変異、BRAF 変異、EGFR 変異などのドライバー変異と、LGR6 発現との関連性について調べたところ、LGR6 高発現は KRAS 変異や BRAF 変異を有する NSCLC 細胞株において高頻度に認められた。以上より、CTNNB1 変異や APC 変異により Wnt 経路活性化を伴う NSCLC、KRAS 変異や BRAF 変異のドライバー変異を有する NSCLC、SCLC において LGR6 が過剰発現している可能性が考えられた。

CTNNB1 変異陽性 NSCLC 細胞において siRNA による CTNNB1 ノックダウンを行ったところ、Tcf 転写活性の低下とともに、LGR6 mRNA および LGR6 タンパク発現が著明に低下することが確認された。また、CTNNB1 変異陽性 NSCLC 細胞において、siRNA による LGR6 ノックダウンにより細胞増殖の抑制とアポトーシス誘導が認められた。以上より、LGR6 阻害が NSCLC に対して抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

CTNNB1 変異陽性 NSCLC 細胞株 A427 は接着系細胞成分と浮遊系細胞成分の二相性の細胞形態をとりながら増殖する性質を有することから、これらの細胞成分における LGR6 mRNA 発現レベルを比較解析した。その結果、A427 の浮遊系細胞成分における LGR6 発現レベルは、接着系細胞成分と比較して約 7 倍高いことが示された。以上より、LGR6 が癌幹細胞の特性であるスフェロイド形成能の獲得に寄与している可能性が考えられた。

(2)肺癌手術検体における LGR6 発現と臨床病理学的因子及び予後との関連:

免疫組織染色法により、NSCLC 手術検体(腺癌 112 検体、扁平上皮癌 98 検体)、肺神経内分泌腫瘍手術検体(SCLC 20 検体、LCNEC 16 検体)における LGR6 タンパク発現解析を行った。その結果、肺腺癌の 30%、肺扁平上皮癌の 5%、SCLC の 50%、LCNEC の 75%で LGR6 高発現が認められた。さらに、TCGA データベースを用いて肺腺癌と正常肺組織のペア 57 検体における LGR6 mRNA 発現解析を行ったところ、肺腺癌の LGR6 発現が正常肺組織と比較して有意に高いことが確認された。以上より、NSCLC では肺扁平上皮癌よりも肺腺癌で LGR6 高発現の割合が高いことや、肺神経内分泌腫瘍において LGR6 高発現の割合が高いことが明らかとなった。

肺腺癌における LGR6 発現と、性別、年齢、喫煙歴、病期、ドライバー遺伝子変異(EGFR 変異、KRAS 変異)、リンパ管浸潤、脈管浸潤、胸膜浸潤との関連を調べた。その結果、EGFR 変異陰性群や脈管浸潤陽性群において LGR6 高発現の割合が有意に高く、リンパ管浸潤陽性群、男性、喫煙者において LGR6 高発現の割合が高い傾向にあることが示された。また、肺腺癌を LGR6 低発現群と LGR6 高発現群に分けて術後の生存期間を比較したところ、LGR6 高発現群の生存期間が有意に短かった。さらに、肺腺癌を、EGFR 変異陽性群と EGFR 変異陰性群に分けて、LGR6 低発現群と LGR6 高発現群の生存期間を比較したところ、EGFR 変異陽性群では生存期間の有意差は認められなかったが、EGFR 変異陰性群では LGR6 高発現群の生存期間が有意に短かった。次に、単変量解析と多変量解析により、肺腺癌において LGR6 発現が予後因子となり得るかどうか検証した。その結果、単変量解析では男性、進行病期、LGR6 高発現が有意な予後不良因子であったが、多変量解析では進行病期と LGR6 高発現が独立した予後不良因子であった。以上より、LGR6 高発現は EGFR 変異陰性の肺腺癌において予後不良に関連しており、LGR6 高発現が肺腺癌の予後不良を予測するバイオマーカーであることが示唆された。

(3)LGR6 過剰発現による肺癌の悪性形質獲得の分子制御機構:

LGR6 過剰発現による肺癌の悪性形質獲得の分子制御機構を解明するため、マイクロアレイにより、CTNNB1 変異陽性 NSCLC 細胞株 HCC15 において siRNA による LGR6 ノックダウンにより発現変動する遺伝子群を同定した。これらの LGR6 関連遺伝子群には、癌幹細胞マーカー CD44 リガンドとして知られるオステオポンチンや、腫瘍微小環境の制御に関わるサイトカイン(CCL5, IL1A, CXCL8, IL32)、増殖因子(IGF1)、細胞リプロミングに関わる遺伝子(EPHA7)などが含まれていた。また、パスウェイ解析の結果、MAPK-NFκB 経路、オステオポンチン経路、Toll 様受容体経路などの炎

症誘導や腫瘍微小環境の制御に関わる経路が LGR6 により制御されていることが明らかとなった。以上より、Wnt 経路活性化による LGR6 発現誘導が、これらの関連遺伝子の制御を介して、肺癌の悪性形質の獲得に寄与していることが示唆された。

(4)肺癌における LGR6 以外の *CTNNB1* 変異関連遺伝子群の発現解析:

マイクロアレイ解析により、*CTNNB1* 変異陽性 NSCLC 細胞株 HCC15 において *CTNNB1* ノックダウンにより発現が最も低下する遺伝子として、テスカルシン (*TESC*) を同定した。*CTNNB1* ノックダウンによる *TESC* 発現の低下は、標的部位の異なる複数の *CTNNB1* siRNAs により確認された。NSCLC 細胞株 41 株、SCLC 細胞 23 株を用いた定量 RT-PCR 法による *TESC* 発現解析を行ったところ、非癌ヒト気道上皮細胞株の発現レベルと比較して、*CTNNB1* 変異陽性細胞株を含む NSCLC 細胞株の約 70%、SCLC 細胞株の約 90%において *TESC* 過剰発現が認められた。また、SCLC 群の *TESC* 発現レベルは NSCLC 群と比較して有意に高かった。次に、TCGA データセットを用いて、肺腺癌における *TESC* 発現解析を行った。その結果、*CTNNB1* 変異陽性肺腺癌の *TESC* 発現は、*CTNNB1* 野生型肺腺癌と比較して有意に高いことが確認された。以上より、*TESC* 発現は、*CTNNB1* 変異による Wnt 経路の恒常的活性化を介して正制御されている可能性が考えられた。また、*TESC* の過剰発現が、*CTNNB1* 変異陽性 NSCLC や SCLC の悪性形質の獲得に寄与していることが示唆された。

<引用文献>

- ① Miura Y, Sunaga N. Role of Immunotherapy for Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*. 10: 245, 2018.
- ② Miura Y, Kasahara N, Sunaga N. Immune checkpoint inhibitors and driver oncogenes in non-small cell lung cancer. *Transl Cancer Res*. 8: S628-S632, 2019.
- ③ Yang J, Chen J, He J, Li J, Shi J, Cho WC, Liu X. Wnt Signaling as Potential Therapeutic Target in Lung Cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 20: 999-1015, 2016.
- ④ Oeztuerk-Winder F, Guinot A, Ochalek A, Ventura JJ. Regulation of Human Lung Alveolar Multipotent Cells by a Novel p38 $\alpha$  MAPK/miR-17-92 Axis. *EMBOJ*. 31: 3431-41, 2012.
- ⑤ Guinot A, Oeztuerk-Winder F, Ventura JJ. miR-17-92/p38 $\alpha$  Dysregulation Enhances Wnt Signaling and Selects Lgr6+ Cancer Stem-like Cells During Lung Adenocarcinoma Progression. *Cancer Res*. 76: 4012-4022, 2016.
- ⑥ Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. *Nature*. 449: 1003-1007, 2007.
- ⑦ Verma UN, Surabhi RM, Shmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small Interfering RNAs Directed Against Beta-Catenin Inhibit the in Vitro and in Vivo Growth of Colon Cancer Cells. *Clin Cancer Res*. 9: 1291-1300, 2003.
- ⑧ Sunaga N, Kaira K, Imai H, Shimizu K, Nakano T, Shames DS, Girard L, Soh J, Sato M, Iwasaki Y, Ishizuka T, Gazdar AF, Minna JD, Mori M. Oncogenic KRAS-induced epiregulin overexpression contributes to aggressive phenotype and is a promising therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 32: 4034-42, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yosuke Miura, Norimitsu Kasahara, Noriaki Sunaga.	4. 巻 8
2. 論文標題 Immune checkpoint inhibitors and driver oncogenes in non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Cancer Res	6. 最初と最後の頁 S628-S632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tcr.2019.10.08	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

1. 著者名 Yosuke Miura, Noriaki Sunaga.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Immunotherapy for Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers10080245	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Noriaki Sunaga, Yosuke Miura, Kyoichi Kaira, Yusuke Tsukagoshi, Reiko Sakurai, Takeshi Hisada
2. 発表標題 LGR6 overexpression induced by constitutive activation of the Wnt signaling pathway in NSCLC cells
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 砂長則明、三浦陽介、伊藤優志、増田友美、笠原礼光、櫻井麗子、久田剛志
2. 発表標題 肺癌におけるWnt/ $\beta$ -catenin経路の恒常的な活性化によるTescalcinの過剰発現
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	三浦 陽介  (Miura Yosuke)		