

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10781

研究課題名(和文) Arf6活性化による上皮間葉転換(EMT)を標的とした肺癌特異的な治療法の探索

研究課題名(英文) The elucidation of the novel therapy specific for lung cancer targeting Arf6-induced EMT

研究代表者

毛受 暁史(Menju, Toshi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30527081

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)：肺癌の浸潤転移機構を直接標的とした治療法は存在せず、未metな医療必要性を有する。今までにGEP100-Arf6経路という癌細胞の浸潤機構を報告されてきたが、さらに我々はこれらの経路やEMTの臨床的意義や重要性の解析を行ってきた。本研究では、さらにEGFR結合分子として知られているGrb2がGEP100及びEGFRと結合し、EGFRとの複合体を作ることによって、GEP100-Arf6経路を亢進し、予後を悪化させる機構を解明した。この機構解明により、浸潤転移能の抑制を目的とした新たな分子標的剤の開発がすすむものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、浸潤転移能を直接標的とした薬剤はみられず、臨床的観点から最も切望されている。我々と佐邊らのグループは、この臨床的問題点を認識し、GEP100-Arf6経路という癌細胞の浸潤メカニズムの解明を世界に先駆けて研究・報告しており、さらにEGFRとGrb2-GEP100複合体の結合様式の解明により、同結合部位を標的とする浸潤転移能抑制に有効な薬剤の開発につながる。また、当然この経路を阻害して、浸潤転移の抑制が可能となれば、腫瘍の遠隔転移制御を通じて、術後再発予防や、発見時遠隔転移症例に対する治療適応の拡大など様々な面で、既存治療法に加えて新たな癌治療戦略を採ることが可能となることを期待される。

研究成果の概要(英文)：There are no therapies that directly target the invasive metastatic mechanism of lung cancer, which has an unmet medical need. While the GEP100-Arf6 pathway, a mechanism of cancer cell invasion and metastasis, has been reported so far, we have further analyzed the clinical significance and importance of these pathways associated with EMT. In this study, we further elucidated the mechanisms by which Grb2, a known EGFR-binding molecule, can enhance the GEP100-Arf6 pathway and worsen patients' prognosis by binding to and forming a complex with GEP100 and EGFR. The elucidation of this mechanism will facilitate the development of new molecular targeting agents to inhibit invasion and metastasis.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 浸潤転移 上皮間葉転換、EMT EGFR GEP100 Arf6 Grb2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ErbB family に属する EGFR および Her2 は、その異常活性化により、様々な癌種において予後不良となることは臨床的によく知られている。

我々は、佐邊らと共に ErbB family 受容体からの刺激が、癌の浸潤転移能獲得の際に起こる上皮間葉転換 (Epithelio-Mesenchymal Transition、EMT) の中で、Arf6 活性化 GTP 交換因子 (GEF) である GEP100 や Arf6 活性化を介して、invadopodia 形成を促進し、その結果、乳癌や肺癌が浸潤転移能獲得へと向かうメカニズムが、浸潤転移抑制の新たな標的となる妥当性がこれまでに報告されてきた。さらに、ErbB family に属する EGFR および Her2 は、肺癌や乳癌を含む様々な癌種において、その異常活性化により、遠隔転移を促進し、予後不良となることは臨床的によく知られている。

その中で、Arf6 活性化 GTP 交換因子 (GEF) である GEP100 が EGFR や Her2 の細胞内ドメインの特定の自己リン酸化チロシンと結合することで、浸潤転移能獲得に特異的な Arf6 活性化を促進することを見出した。その後の研究で、GEP100 単独の発現量の多寡が、肺癌の予後予測因子としても重要であることを見出している。そして、この GEP100 から Arf6 活性化を介した腫瘍細胞浸潤能亢進のメカニズムは、他の癌種においても報告されており (Hu et al, PLoS One 2012) (Xie et al, PLoS One 2012)、腫瘍浸潤および転移のメカニズムとして重要かつ普遍的である可能性が高い。

しかし、GEP100 が EGFR の C 末端リン酸化チロシンとの結合能は、in vivo とは違い、in vitro の研究では、それほど高くないことが分かった。そこで、ErbB family の C 末端のリン酸化チロシンに結合する GEP100 を補強する分子の有無について検討を行った。

2. 研究の目的

EGFR の C 末端、リン酸化チロシンに結合するアダプター分子である Grb2 の Erb family-GEP100-Arf6 経路に与える意義について、解析を行った。また Grb2 や Arf6 経路の分子が、肺癌の浸潤転移能や再発や予後といった臨床的要素に与える影響、その意義についても検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) EGFR、Grb2、GEP100 複合体結合様式についての in vitro 解析

Grb2 の活性化 EGFR への結合が GEP100-Arf6 経路へと与える影響を解析するため、Grb2 がほぼ発現していない肺癌細胞株を用いて、野生型と変異型 (R68K) Grb2 を強制発現させて様々な解析を行った。

(2) Grb2-GEP100 高発現細胞株による浸潤転移能の検討

細胞株に野生型 Grb2 を高発現させた際に、Phenotype の変化や Matrigel invasion assay における浸潤能について解析を行った。

(3) GEP100 と Hsp90 や ABCF1 との結合様式や GEP100-Arf6 経路に与える影響の検討

GEP100 と結合する候補分子として、Grb2 のほかに Hsp90 や ABCF1 が挙げられ、これらの分子と GEP100 の interaction について、内因性分子もしくは外因性強制発現モデルによる解析を行った。

(4) EGFR 以外のドライバー遺伝子肺癌や CD133 陽性肺癌における GEP100-Arf6 経路活性化の検討

EGFR や Kras といったドライバー遺伝子変化の有無と GEP100-Arf6 経路分子の活性化について、切除臨床検体を用いて臨床的意義を検討した。

4. 研究成果

ErbB family からの刺激による GEP100-Arf6 経路活性化および EMT 活性化についての詳細なメカニズムや臨床的意義を解明する上で、以下のような成果を得た。

その後の検討で GEP100 と Hsp90 と ABCF1 との直接結合に関わる免疫沈降による実験結果がこれら分子との結合に否定的であったため、Grb2 との結合に絞って、様々な解析検討を行った。

Grb2 と GEP100 の直接的な結合に関しては、各分子内のドメインごとの結合を解析し、GST タグを結合した各分子内ドメインにおいて免疫沈降実験を行い、結果 Grb2 の N 末 SH3 ドメインおよび SH2 ドメインが GEP100 内の PH ドメインとの結合に関わっていることがわかった。

次に活性化 EGFR と Grb2 が結合することや GEP100 も同部位に結合することがすでに報告されていることから、この3者の関係についても詳細な解析を行った。

EGF 刺激により活性化した EGFR と GEP100 が結合することが判明している A549 肺癌細胞株を用いて、野生型の Grb2 過剰発現させた系で免疫沈降を行い、活性化したリン酸化 EGFR(p-EGFR)と GEP100 との結合能が亢進し、in vitro での Matrigel invasion assay で浸潤能が約 2 倍に亢進した。

これらの基礎的研究結果をもとにして、臨床的意義についても検討した。当院で切除した肺腺癌臨床検体 256 切除例において、EMT 活性化と臨床病理学的な特徴および EGFR や p53 を含む主要な遺伝子異常との相関を検討出来、以下の成果を得て、論文化することができた。

我々は、上皮型及び間葉型の主なマーカーである E-cadherin と Vimentin の発現量を免疫染色によって、確認することで、各腫瘍における EMT 活性化レベルを解析した。結果、この EMT メカニズムが活性化するにつれて、主腫瘍原発巣におけるリンパ管や脈管浸潤が亢進し、リンパ節転移発生ハザード比が約 8 倍と高くなり、結果的に無病再発リスクや死亡リスク比も約 3 倍亢進し、予後不良となることを統計学的に示した。

さらに組織亜分類と EMT 活性化との相関も示し、一般的に低分化で予後不良と考えられる群においては EMT が活性化していることを報告した。

また、256 例における EGFR や Kras、ALK、p53 などの遺伝子異常を解析することで、遺伝子異常と EMT 活性化との相関について検討した。その結果、EGFR 遺伝子変異は、EMT 活性化との間に、負の相関がみられたが、同変異により、リンパ節転移や死亡リスクは亢進することを示した。このことは、EGFR 遺伝子変異を有する腺癌において EMT 活性化が起こった際には、よりリンパ節転移や予後悪化に影響を受けやすいことを示しており、臨床的に観察される症例とよく合致していることが報告できた。

これらの結果、EGFR 遺伝子変異肺腺癌において、GEP100-Arf6 経路の活性化及び EMT 活性化が起こっているかどうかを検討する必要性が示唆されたため、さらに Arf6 経路の分子についても検討を行った。評価可能であった肺腺癌臨床検体 239 切除例において、Arf6 経路として示された 5 分子 Grb2、GEP100、Arf6、AMAP1、EPB41L5 それぞれの発現強度と、EMT 活性化レベルや臨床病理学的な特徴および EGFR や p53 を含む主要な遺伝子異常を要素とした生存時間分

析を行った。以下の成果を得て、研究会で発表することができた。

これらの Arf6 経路に含まれる5分子の発現陽性率は、全症例では Grb2:13.8%、GEP100: 27.3%、Arf6: 56.3%、AMAP1:58.4%、EPB41L5:63.4%であった。また EGFR 変異型による陽性率に有意差はみられなかった。これら5分子の発現は、特に EGFR 遺伝子変異陽性肺癌において、有意に再発のリスク因子となっていた。

EGFR 変異型肺腺癌であった場合の野生型に対するハザード比は、Grb2:3.528、GEP100: 2.484、Arf6;1.927、AMAP1;2.825、EPB41L5:2.087。

これら5分子による多変量解析では、全生存期間に対して Grb2 と AMAP1 が、無再発生存期間に対して Grb2 がそれぞれ独立した有意な因子であった。Grb2 と AMAP1 の陽性症例は、有意に予後不良であった。

これらの結果、特に EGFR 遺伝子変異肺腺癌において、Arf6 経路の活性化が再発に有意に関連することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Toshi Menju, Terumasa Sowa, Makoto Sonobe, Ryo Miyata, Koji Takahashi, Shigeto Nishikawa, Takao Nakanishi, Shinya Neri1, Hiroyuki Cho1, Masatsugu Hamaji, Kyoko Hijiya, Hideki Motoyama, Akihiro Aoyama, Toyofumi F. Chen-Yoshikawa, Toshihiko Sato, Akihiko Yoshizawa, Hironori Haga, Hiroshi Date	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinicopathologic significance of epithelio-mesenchymal transition in human lung adenocarcinomas: an integrative analysis, inclusive of genetic alterations, on 256 surgically resected cases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Treatment and Research Communications	6. 最初と最後の頁 62-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Nishikawa S, Menju T, Takahashi K, Miyata R, Sonobe M, Yoshizawa A, Date H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Prognostic Significance of Phosphorylated Fyn in Patients with Lung Adenocarcinoma after Lung Resection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Thoracic Cardiovasc Surgery	6. 最初と最後の頁 246-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5761/atcs.oa.19-00078.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muranishi, Y., T. Sato, S. Ito, J. Satoh, A. Yoshizawa, S. Tamari, Y. Ueda, Y. Yutaka, T. Menju, T. Nakamura and H. Date	4. 巻 9
2. 論文標題 The Ratios of monounsaturated to saturated phosphatidylcholines in lung adenocarcinoma microenvironment analyzed by Liquid Chromatography-Mass spectrometry and imaging Mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45506-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima, N., A. Yoshizawa, K. Moriyoshi, M. Sonobe, T. Menju, S. Sumiyoshi, H. Date and H. Haga	4. 巻 5
2. 論文標題 P40 expression in small cell lung cancer: The presence of p40-positive cells does not always indicate squamous differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1188-1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa, S., T. Menju, K. Takahashi, R. Miyata, T. F. Chen-Yoshikawa, M. Sonobe, A. Yoshizawa, H. Sabe, T. Sato and H. Date	4. 巻 11
2. 論文標題 Statins may have double-edged effects in patients with lung adenocarcinoma after lung resection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Management and Research	6. 最初と最後の頁 3419-3432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CMAR.S200819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Neri, S., T. Menju, T. Sowa, Y. Yutaka, D. Nakajima, M. Hamaji, A. Ohsumi, T. F. Chen-Yoshikawa, T. Sato, M. Sonobe, A. Yoshizawa, H. Haga and H. Date	4. 巻 128
2. 論文標題 Prognostic impact of microscopic vessel invasion and visceral pleural invasion and their correlations with epithelial-mesenchymal transition, cancer stemness, and treatment failure in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 13-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi T, Menju T, Nishikawa S, Takahashi K, Miyata R, Shikuma K, Sowa T, Imamura N, Hamaji M, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Sato T, Chen-Yoshikawa TF, Sonobe M, Date H.	4. 巻 2
2. 論文標題 The synergistic role of ATP-dependent drug efflux pump and focal adhesion signaling pathways in vinorelbine resistance in lung cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 408-419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1282.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Neri S, Miyashita T, Hashimoto H, Suda Y, Ishibashi M, Kii H, Watanabe H, Kuwata T, Tsuboi M, Goto K, Menju T, Sonobe M, Date H, Ochiai A, Ishii G	4. 巻 395
2. 論文標題 Fibroblast-led cancer cell invasion is activated by epithelial-mesenchymal transition through platelet-derived growth factor BB secretion of lung adenocarcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Letter	6. 最初と最後の頁 20-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2017.02.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 毛受暁史
2. 発表標題 EGFR-Grb2結合は、GEP100-Arf6経路を介した肺癌浸潤転移能を亢進する
3. 学会等名 第76回日本癌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 毛受暁史、西川滋人、曾和晃正 2、千葉直久、宮本英明、玉里滋幸、野口未紗、石川浩之、宮田亮、伊達洋至
2. 発表標題 上皮間葉転換を標的とした肺癌新規治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛受暁史、西川滋人、曾和晃正、玉里滋幸、野口未紗、石川浩之、宮田亮、田中里奈、山田義人、豊洋次郎、中島大輔、大角明宏、濱路政嗣、佐藤寿彦、陳豊史、伊達洋至
2. 発表標題 上皮間葉転換を標的とした肺癌新規治療法の開発
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会、
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛受暁史、今村直人、野口未紗、石川浩之、宮田亮、高橋耕治、西川滋人、豊洋二郎、中島大輔、大角明宏、濱路政嗣、陳豊史、佐藤寿彦、園部誠、伊達洋至
2. 発表標題 Arf6関連経路は、特にEGFR変異肺腺癌で予後を悪化させる
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshi Menju, Hiroyuki Ishikawa, Ryo Miyata, Koji Takahashi, Shigeto Nishikawa, Daisuke Nakajima, Masatsugu Hamaji, Hideki Motoyama, Akihiro Aoyama, Fengshi Chen-Yoshikawa, Toshihiko Sato, Makoto Sonobe, *Hisataka Sabe, Hiroshi Date,
2. 発表標題 EGFR-Grb2 interaction facilitates Arf6-induced cancer invasive potential via GEP100 complex in lung cancer cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshi Menju, Misa Noguchi, Shigeyuki Tamari, Hiroyuki Ishikawa, Ryo Miyata, Koji Takahashi, Shigeto Nishikawa, Satona Tanaka, Yoshito Yamada, Yojiro Yutaka, Daisuke Nakajima, Fengshi-Toyofumi Chen-Yoshikawa, Toshihiko Sato, Hiroshi Date
2. 発表標題 Arf6-related Invasive Pathway Deteriorated Patients' Prognosis in Mutant EGFR Lung Adenocarcinoma
3. 学会等名 WCLC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshi Menju, Terumasa Sowa, Naoto Imamura, Shigeto Nishikawa, Koji Takahashi, Ryo Miyata, Hiroyuki Ishikawa, Misa Noguchi, Masatsugu Hamaji, Daisuke Nakajima, Akihiro Ohsumi, Toshihiko Sato, Toyofumi Fengshi Chen-Yoshikawa, Makoto Sonobe, Hiroshi Date
2. 発表標題 The correlations between molecular markers and local invasiveness in resected human lung adenocarcinoma
3. 学会等名 19thWCLC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshi Menju, Hiroyuki Ishikawa, Ryo Miyata, Shigeto Nishikawa, Koji Takahashi, Masatsugu Hamaji, Hideki Motoyama, Akihiro Aoyama, Fengshi Chen-Yoshikawa, Toshihiko Sato, Makoto Sonobe, Akihiko Yoshizawa, Hironori Haga, Stephan M Feller, Hisataka Sabe, Hiroshi Date,
2. 発表標題 EGFR-Grb2-GEP100 complex promoted its invasive and metastatic potential via Arf6 pathway in lung adenocarcinoma
3. 学会等名 18thWCLC2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshi Menju, Misa Noguchi, Hiroyuki Ishikawa, Ryo Miyata, Koji Takahashi, Shigeto Nishikawa, Yojiro Yutaka, Daisuke Nakajima, Fengshi Toyofumi-Chen Yoshikawa, Toshihiko Sato, Makoto Sonobe, Hiroshi Date
2. 発表標題 Arf6-related Invasive Pathway Deteriorated Patients' Prognosis in Mutant EGFR Lung Adenocarcinoma
3. 学会等名 6th JCA-AACR lung cancer conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学呼吸器外科 https://www.thoracic-kyoto-u.gr.jp/
--

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	園部 誠 (Sonobe Makoto) (00432378)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	