

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15949

研究課題名（和文）LKB1が不活化した肺癌における腫瘍進展のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms of tumor progression in LKB1-inactivated lung cancer

研究代表者

田中 一大 (Tanaka, Ichidai)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40809810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍抑制遺伝子であるLKB1が不活化した非小細胞肺癌は、進行が早く極めて予後が悪い。同腫瘍の進展メカニズムを解明するため、肺癌細胞株及び肺癌組織のmRNA・タンパク質の発現レベルを網羅的に解析した。その結果、LKB1が不活化した肺癌では、分泌タンパク質であるSMOC1が高発現していることを発見した。SMOC1は、成長過程で骨や眼の形成を促進する因子である。SMOC1の機能解析を行い、癌細胞の移動能の促進及び腫瘍血管の新生に関わっていることを新たに突き止めた。さらに、SMOC1が高発現している肺癌患者は予後が極めて悪く、独立した予後予測因子になりうることも算出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍抑制遺伝子であるLKB1は非小細胞肺癌の約20%において不活化変異をきたしており、腫瘍の進展が早く極めて予後が悪い。本研究では、LKB1が不活化した肺癌の特徴を分子レベルで解明することを目指し、研究の成果としてSMOC1という分泌タンパクの高発現が、腫瘍の増殖・進展に寄与していることを発見した。今後は本研究を基盤に、予後の悪いLKB1が不活化した肺癌に対し、SMOC1を標的とした新たな治療戦略の構築を目指すことが可能である。

研究成果の概要（英文）：Liver kinase B1 (LKB1) is a tumor suppressor frequently inactivated in some human cancers, and non-small lung cancer (NSCLC) with LKB1 inactivation is one of the most aggressive neoplasms. To identify molecular features associated with LKB1 inactivation, bioinformatic analysis was initially conducted using lung cancer omics datasets such as mRNA and protein expression. Eventually, SPARC Related Modular Calcium Binding 1 (SMOC1), which plays essential roles in both eye and limb development, was identified as a markedly increased secreted protein in LKB1-inactivated NSCLC. SMOC1 knockdown reduced cancer cell migration and tumor angiogenesis in NSCLC with LKB1 inactivation. Furthermore, SMOC1 expression was significantly associated with poor overall survival, indicating that SMOC1 expression would be one of a prognostic biomarker in NSCLC. Our findings suggest that SMOC1 plays a crucial role in the development of NSCLC with LKB1 inactivation.

研究分野：分子腫瘍

キーワード：LKB1 SMOC1 細胞増殖 移動能 血管新生 予後予測因子 非小細胞肺がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Liver Kinase B1 (LKB1) は、消化管ポリポースを引き起こす常染色体優性遺伝疾患; Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子として知られ、細胞のエネルギー代謝・極性制御に関わる腫瘍抑制遺伝子である。大腸癌、悪性黒色腫など様々な腫瘍で、LKB1 の機能喪失変異が認められ、非小細胞肺癌においては約 20% で不活化変異をきたしている。LKB1 の不活化は、様々な腫瘍で報告があるが、未だ有効な治療法が確立されていない。非小細胞肺癌においては、p53・KRAS・EGFR に次いで 4 番目に頻度が高く、EGFR など治療標的となるドライバー遺伝子変異とは排他的な関係にある。進行が早く、治療の主体が殺細胞性の抗癌剤に依存しているため、ここ最近で予後の改善はほとんどない。さらに最近、LKB1 が不活化している症例は、血管新生阻害薬の効果が乏しいとの報告もされた (Clin Cancer Res. 2017 1;23:3316-3324)。そのため、LKB1 が不活化した肺癌の分子生物学的特徴を解析し、新規の治療標的を検索することは極めて重要と考えられる。

LKB1 は、細胞の代謝及び極性を制御する因子として解析が進められ、AMPK を含め複数のシグナル経路への関与が知られている。特に AMPK は、嫌気性代謝の亢進、メバロン酸の合成阻害、Mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を阻害する機能を持ち、近年は LKB1 が不活化した腫瘍における治療戦略として、AMPK の活性化を標的とした治療法が検討されてきた (Cancer Cell. 2013 11;23(2):143-58)。AMPK 活性化剤として metformin や、mTOR 阻害剤との組み合わせが検討されてきたが、未だ治療法の確立には至っておらず、その有効性の報告は in vitro/in vivo に留まる。

LKB1 が不活化した非小細胞肺癌の分子生物学的な特徴を解析するため、研究代表者はこれまでの研究で留学先であった米国の MD Anderson Cancer Center において、肺癌細胞株を主体に mRNA やタンパク質といったオミクスデータの網羅的な統合解析を行った。その結果、LKB1 が不活化した非小細胞肺癌においては、アンモニア解毒と塩基合成に関わるカルバモイルリン酸合成酵素 (CPS1) が過剰発現し、腫瘍増殖のキーファクターになっていることを世界に先駆けて報告した (J Natl Cancer Inst. 2017 ;109:1-9.)。一方で、LKB1 が不活化した非小細胞肺癌は浸潤・転移能も極めて高いが、そのメカニズムは解明されておらず、腫瘍進展の全貌を明らかにするには更なる解析が必要である。特に日本国内における分子生物学的な解析は進んでおらず、LKB1 が不活化した肺癌を標的に本研究を行う着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、LKB1 が不活化した肺癌の特徴を分子レベルで明らかにし、新たな治療戦略の構築を目指すことである。

研究代表者は肺癌細胞株のオミクスデータを統合解析し、LKB1 が不活化した細胞株のみが特徴的に高発現する分泌タンパク質 SPARC Related Modular Calcium Binding 1 (SMOC1) に着眼した。SMOC1 は、正常組織では主に精巣に発現が限局しており、成長過程では骨や眼の形成を促進する因子である。複数のタンパク質に結合することが知られ、近年では、低酸素状態になると血管上皮細胞から分泌されることが報告された (Cardiovasc Res. 2015 1;106(2):284-94)。Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) の受容体における構成因子の 1 つ Endoglin に作用し、血管上皮細胞の増殖と活性化に関わる。しかし、腫瘍における機能解析は極めて限定的で、神経膠芽腫など報告が一部の癌腫に限られる。肺癌においては、これまでに全く報告がなく、腫瘍進展や微小環境の形成に着眼した詳細な検討は行われていない。本研究では、癌細胞が分泌する SMOC1 が腫瘍増殖と血管新生を促進するという仮説に基づき、LKB1 が不活化した肺癌における腫瘍進展のメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

非小細胞肺癌の細胞株 (33 株) を LKB1 の機能喪失変異がある細胞株と正常発現している細胞株に分類し、mRNA、タンパク質 (細胞膜・分泌・核・総タンパク質)、マイクロ RNA、メチル化 DNA、遺伝子コピー数といったオミクスデータを網羅的に解析した。この結果、LKB1 が不活化した肺癌細胞株において、分泌タンパク質 SPARC Related Modular Calcium Binding 1 (SMOC1) が特徴的に高発現していることを発見した。

本研究における実施計画は以下の通りである。

#### (1) 肺癌における SMOC1 発現の制御機構の解明

In vitro の予備実験において、siRNA で LKB1 をノックダウンし、リアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法で標的分子である SMOC1 の発現レベルを確認する。細胞培養上清液は、遠心式フィルターユニットを用いて濃縮する。また、LKB1 の強制発現による検証のため、合成プラセミドからレンチウイルスベクターに TOP0 クローニングを行い、LKB1 発現ベクターを作成する。LKB1 の下流には、AMPK ファミリーや SIK など複数のシグナル経路があるため、LKB1 を強制発現した細胞株を用い、下流の AMPK・SIK1 をノックダウンすることで、SMOC1 の発現制御機構を解明する。

#### (2) 腫瘍進展における SMOC1 の機能解析 (腫瘍増殖・形質転換への関与・血管新生に対する働き)

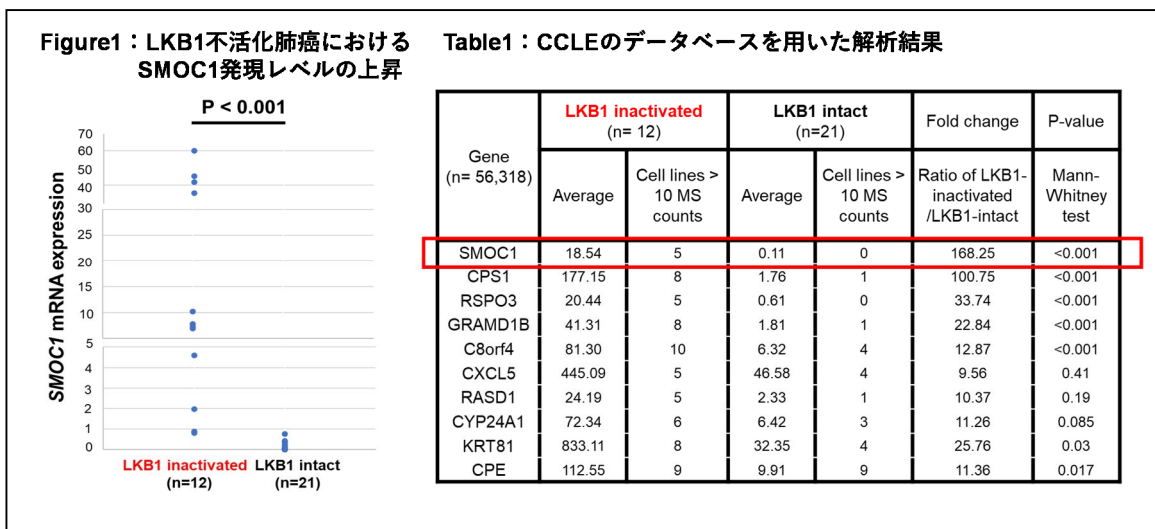
SMOC1の肺癌細胞自身に対する影響を検証する。具体的には、WST アッセイを用いた細胞増殖、及びスクラッチアッセイ・マトリゲルを用いた移動/浸潤能に対する評価を行う。SMOC1のパラクラインによる機能解析について、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた tube formation assay で検証する。さらに、オミクスデータの解析から、SMOC1と結合することで腫瘍進展を促進する細胞膜タンパク質・分泌タンパク質の特定を行い、その相互作用についても検証する。SMOC1が結合する分子の種類から、腫瘍増殖・TGF-betaシグナル経路への関与、形質転換、血管新生に及ぼす影響を見定め、結合する受容体及びそのシグナル経路に至る詳細なメカニズムを解析する。

### (3) SMOC1の発現レベルが予後に及ぼす影響の解析

パブリックデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) を用いて、SMOC1の mRNA 発現レベルと全生存期間の関連を非小細胞肺癌のデータセットにおいて解析する。基本的な臨床情報と LKB1の発現レベル・遺伝子情報を加えた多変量解析を行い、SMOC1の発現が独立した予後予測因子になるかどうかを検討する。

## 4. 研究成果

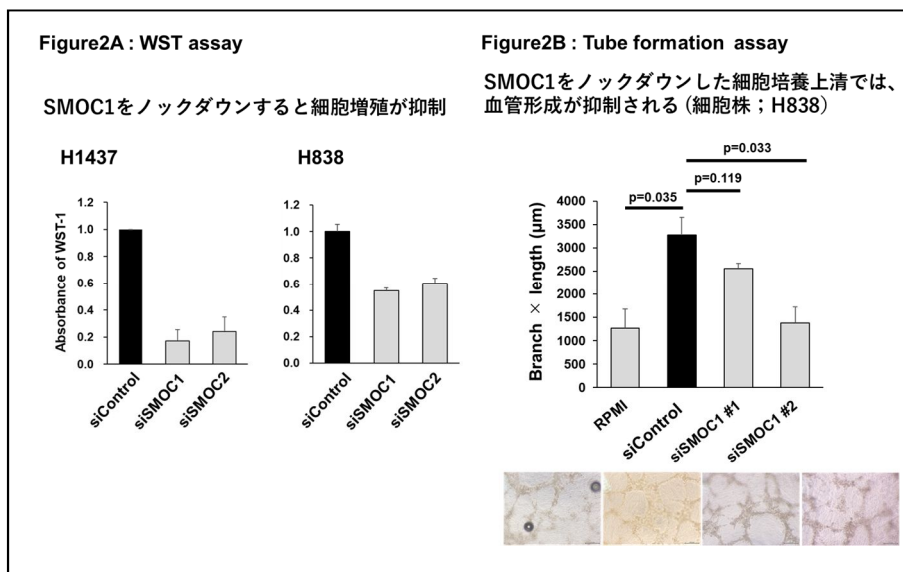
細胞株のパブリックデータベースである Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) を用いて、名古屋大学呼吸器内科で保持する非小細胞肺癌の細胞株 (33株) を LKB1の機能喪失変異がある細胞株と正常発現している細胞株に分類し、全遺伝子 (N=56318) の mRNA の発現レベルの比較検討を行った。その結果、LKB1が不活化した肺癌細胞株において、分泌タンパク質 SPARC Related Modular Calcium Binding 1 (SMOC1) が特徴的に高発現していることを発見した (Figure1・Table1)。



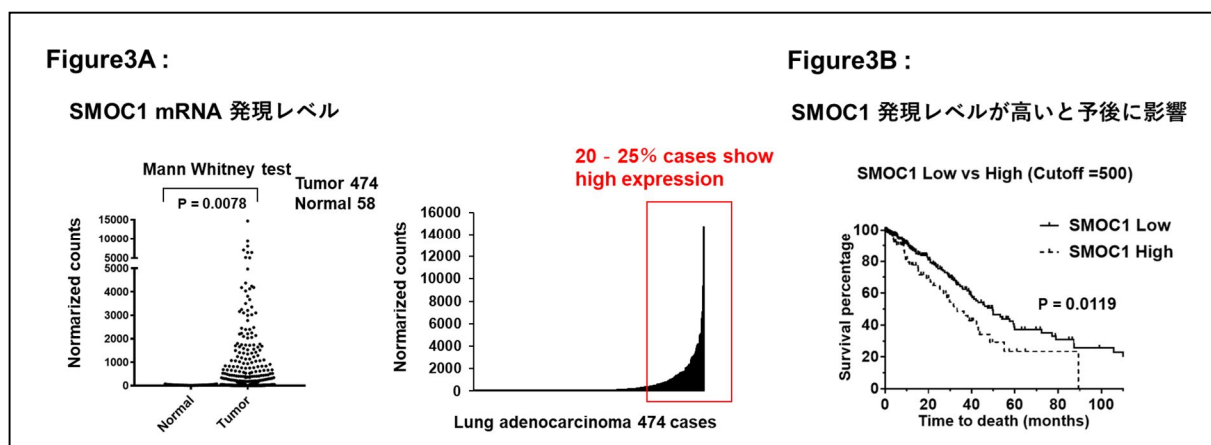
(1) SMOC1の発現調整機構の解析においては、LKB1をノックダウンすると mRNA レベルで SMOC1の発現が数倍に増強することが判明し、LKB1が不活化した肺癌において SMOC1が高発現している原因の一端を突き止めた。しかし一方で、LKB1をノックダウンしても SMOC1の発現レベルが全く変化しない細胞株も認められた。また、SMOC1の発現増強に関して、過去に報告されている TGF- $\beta$ ・Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) の添加や、低酸素での培養条件下で検証を行ったが、SMOC1の発現上昇には細胞株毎で一致しない結果であった。これらの検討結果から、LKB1を強制発現するためのレンチウイルスを作成し、さらなる追加検証を行っている。SMOC1の発現レベルの調整には、複数の因子が関与している可能性が高く、複合的な解析が必要と考えられる結果であった。

(2) SMOC1の機能解析：LKB1の機能喪失変異がある複数の細胞株において、SMOC1をノックダウンすると癌細胞の増殖が抑制されることを見出した (Figure2A)。また、スクラッチアッセイ及びトランスウェルを持ちいた解析で、SMOC1が、LKB1不活化肺癌の移動・浸潤能を促進していることも発見した。SMOC1が、TGF- $\beta$ 受容体の構成因子の一つである Endoglin に結合する報告があることから、SMOC1ノックダウン後に上皮間葉転換への関与についても検討を行ったが、Vimentin (VIM)・Cadherin-1 (CDH1) の発現レベルに有意な変化は認められなかった。

一方で、HUVECを用いた tube formation assay において、SMOC1 をノックダウンした癌細胞の培養上清中では、有意に血管新生が抑制されるという結果も得た (Figure2B)。腫瘍細胞から分泌される SMOC1 が、腫瘍血管の形成を促進する働きがあることが推測される結果であった。以上から、LKB1 不活化肺癌における SMOC1 の分泌は、オートクライン及びパラクラインに作用して、腫瘍の進展を促進していると考えられる。



(3)TCGA のデータベースを用いて、肺腺癌 (474 例) と正常肺 (58 例) の SMOC1 の発現レベルを解析した。正常肺と比較し、肺腺癌の 20-25% で SMOC1 は著しく高発現しており、細胞株の解析と同様に SMOC1 の発現は LKB1 と有意に逆相関している結果であった。また、SMOC1 の高発現は、全生存期間における予後不良と有意に相関していた (Figure3A-B)。さらに基本的な臨床情報と LKB1 を含む多変量解析において、SMOC1 の高発現が独立した予後予測因子となることも突き止めた。



以上の解析結果は、LKB1 が不活化した肺癌において、SMOC1 が細胞増殖・移動浸潤能の促進に寄与していると同時にパラクラインとしても機能を持ち、腫瘍微小環境における血管新生にも関与していると考えられる。予後解析では、LKB1 を加えた多変量解析において、SMOC1 が独立した予後予測因子として算出された。したがって本研究では、LKB1 が不活化した肺癌において、SMOC1 が腫瘍進展のキーファクターになっている可能性を突き止めた。一方で、SMOC1 の発現制御には複数の因子が関与しており、さらなる追加解析が必要と考えられる。今後は、本研究結果を基盤に、in vivo による解析を加えて、SMOC1 を標的とした新たな治療戦略の構築を目指すことが可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----