

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18203

研究課題名(和文) 肺癌における直鎖状ユビキチン関連シグナルとEGFRシグナルのクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between linear ubiquitin and EGFR signaling pathways in lung cancer

研究代表者

中澤 世識 (Nakazawa, Seshiru)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60791978

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)：本研究で直鎖状ユビキチン(M1-Ub)とその合成酵素LUBACに着目し、肺腺癌との関連をin vivo/in vitroで見出した。特にEGFR変異陽性の肺腺癌細胞株において、M1-Ub/LUBACがEGFR経路にお及ぼす影響を解析した。LUBAC発現は肺腺癌の予後と相関し、肺腺癌細胞株ではLUBAC発現が有意に高かった。LUBAC発現を抑制するとEGFR経路が抑制され、増殖や浸潤能も低下した。LUBAC阻害剤もEGFR経路に対して抑制的に作用し、総合して肺腺癌の治療標的としてLUBACの有用性が示された。また、悪性腫瘍発症に関与しうるLUBAC新規遺伝子変異を見出し、その分子機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の死亡原因として悪性新生物が1位で、肺癌は男女問わず高い死亡率を有する。分子標的薬など新規治療薬の開発に加え、既存の治療薬に対する耐性化の克服も重要な命題である。本研究では最も頻度が高い肺腺癌、中でもアジア人に多いEGFR変異陽性肺腺癌に着目した。そして、新規性の高いM1-Ub関連分子がEGFR変異陽性肺腺癌の要であるEGFRシグナル伝達経路に与える影響、及びEGFR-TKI耐性化との関連にも焦点を当てた点で学術的・社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：We focused on the linear ubiquitin (M1-Ub) and enzyme complex LUBAC. We showed the role of M1-Ub/LUBAC in lung adenocarcinoma both in vivo/in vitro. Especially, M1-Ub/LUBAC affected the EGFR signaling pathway in EGFR-mutant cell lines. LUBAC expression was associated with survival of lung adenocarcinoma patients and expression of LUBAC was elevated in adenocarcinoma cell lines. Suppression of LUBAC decreased the activation of EGFR pathway, and LUBAC inhibitor had similar effect. We conclude that LUBAC might be a treatment target for lung cancer. Also, we encountered a mutation of LUBAC components which could be involved in carcinogenesis.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 直鎖状ユビキチン EGFR

1. 研究開始当初の背景

肺癌は注目度の高い研究分野であるが、依然として原因遺伝子が不明の肺癌が多く存在し、これらに対する新規治療標的の同定が切望されている。また近年急増している *EGFR* 変異陽性肺癌に関して分子標的薬である *EGFR*-TKI が著効するが、数年で耐性が出現し、*EGFR*-TKI に対する耐性メカニズムの解明と克服も重要な課題である。

本研究では新規性の高い直鎖状ユビキチン(M1-Ub)とその合成酵素である LUBAC に着目し、M1-Ub/LUBAC シグナル経路が肺腺癌、及び *EGFR* 経路と関連があることを見出した。また、肺癌における M1-Ub/LUBAC の機能解析と *EGFR* 経路とのクロストークのメカニズム解明を目的とした。さらに、LUBAC 阻害剤を用いて肺癌細胞株への影響を解析し M1-Ub/LUBAC シグナル経路の治療標的としての有用性を明らかにし、肺癌治療への臨床応用の橋渡しを目指した。

2. 研究の目的

悪性新生物は日本人の死因の1位であり、心血管や脳血管疾患と比べ遙かに高く、一貫して増加している。悪性新生物の中でも肺癌が最大の死亡原因であり、肺癌対策は日本の医療における最優先事項の一つである。肺癌の治療標的として *EGFR* や *ALK* など複数の原因遺伝子が同定されたが、依然として肺腺癌の3割は発癌原因が不明で治療標的が無い。特に、近年日本人を中心に *EGFR* 変異陽性の肺腺癌患者が急増しており、その治療開発が急務となっている。分子標的薬である *EGFR*-TKI は高い治療奏効率を示すが、*HER2* や *MET* 等他のシグナル経路の活性化や secondary mutation である *EGFR* T790M 変異により治療抵抗性となり、1-2年で病勢が進行・再発する。また、耐性化のメカニズムが不明な症例も2割近く存在し、*EGFR* 変異陽性肺癌の *EGFR*-TKI 耐性化メカニズムの解明と克服が本研究の目的である。

3. 研究の方法

[1] M1-Ub/LUBAC と *EGFR* 経路とのクロストークを分子レベルで解析

EGFR 野生型や *EGFR* 変異陽性細胞株などを対象に M1-Ub 関連タンパク(M1UbRP)ノックダウンを行い、*EGFR* 経路への影響を western blot、qPCR、浸潤/増殖能試験で解析する。また CRISPR/Cas9 法を用いて M1UbRP-KO 細胞を作成し、機能解析を行う。プロテオーム、及びトランスクリプトーム解析を行い、EGF 刺激後に LUBAC の抑制が影響を及ぼすシグナル伝達経路を同定する。

[2] M1-Ub/LUBAC の阻害剤を用いて肺癌の新規治療標的としての可能性を追求する

阻害剤は(a)HOIPIN-8 や Gliotoxin、(b)HOIP/HOIL-1L 結合を阻害し LUBAC 活性化を阻害するペプチド、(c) M1-Ub/LUBAC シグナル経路で機能する NEMO を阻害するペプチドなどが存在する。多角的に M1-Ub/LUBAC シグナル経路を抑制し、M1-Ub/LUBAC シグナル経路の治療標的としての有用性を肺癌細胞株で検証する。特に抗腫瘍効果を浸潤/増殖能試験、マウスでの xenograft モデルなどを用いて解析する。

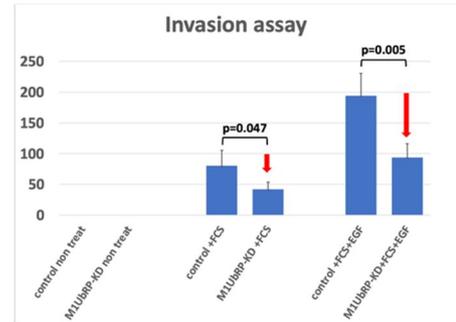
[3] 肺癌細胞株で得られた知見を肺癌切除検体で検証し、実臨床への橋渡しを行う

上記で同定された標的タンパクやシグナル経路の活性化を臨床検体で検証する。具体的には肺癌切除検体を対象に免疫染色を行い、標的タンパクの発現量などを評価する。さらに、患者データベースの臨床病理学的因子との関連を解析する事で悪性度・再発・予後との関係を解明し、実臨床における M1-Ub/LUBAC シグナル経路の有用性を検証する。

4. 研究成果

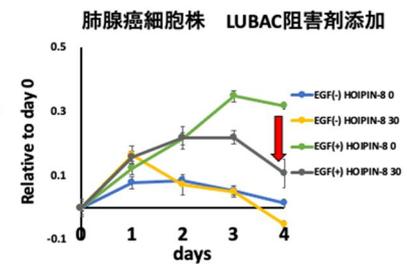
[1] M1-Ub/LUBAC と EGFR 経路とのクロストークを分子レベルで解析

M1-Ub 関連タンパク(M1-Ub related protein, M1UbrP)を siRNA を用いてノックダウンすると、EGF 依存性細胞増殖が有意に低下した。同様に浸潤能も低下し、M1UbrP と EGF シグナル経路との関連が示唆された。さらに EGF シグナル経路の下流の分子のリン酸化を確認すると、EGFR-TKI 耐性の肺癌細胞株を始め、数種類の肺癌細胞株でリン酸化 AKT、MEK1/2、ERK1/2 などの減弱を認めた。EGFR シグナル経路において M1UbrP と相互作用を及ぼす分子を同定するために更なる研究を進めている。



[2] M1-Ub/LUBAC の阻害剤を用いて肺癌の新規治療標的としての可能性を追求する

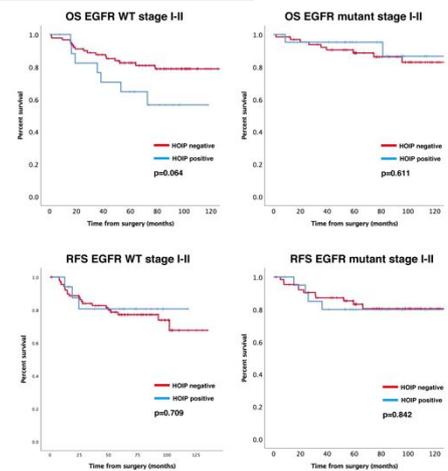
M1UbrP-KO 細胞株を CRISPR/Cas9 法を用いて構築した。M1UbrP-KO 細胞では EGF による細胞増殖能が抑制された。同様に、LUBAC 阻害剤を用いる事で EGF による増殖能が抑制され、M1UbrP-KO 細胞と一部類似した結果を認めた。また、M1UbrP-KO 細胞を用いたマウス xenograft モデルでは腫瘍形成能が低下していた。以上から、M1-Ub 関連タンパクはノックアウトや阻害する事で EGF シグナル経路を抑制する事が可能となり、肺癌の新たな治療標的としての可能性が示唆された。



[3] 肺癌細胞株で得られた知見を肺癌切除検体で検証し、実臨床への橋渡しを行う

肺癌切除検体で M1UbrP の免疫染色を行った。生存率、再発率との関連を解析すると、公開データベースとは異なり、予後との関連は認めなかった。ただ、EGFR WT のサブセット解析では HOIP 高発現群が予後不良の傾向にあった。

また、過去にリンパ腫発症との関連が報告された HOIP Q622L/Q584H 変異と類似した部位の HOIP 変異を有する症例を認めた。HOIP 変異を有する肺癌症例では HOIP は高発現していたが、NFkB の活性化は認めなかった。HOIP 変異症例ではリンパ腫発症とは異なった発癌メカニズムが示唆された。



以上から肺癌における治療標的として M1UbrP/LUBAC シグナル経路の可能性、及び EGFR-TKI 耐性メカニズムとの関連が示唆され、更なる臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakazawa S, Shimizu K, Ibe T, Obayashi K, Kawatani N, Yajima T, Shirabe K
2. 発表標題 Atypical ubiquitin as a molecular target in lung cancer
3. 学会等名 World Conference on Lung Cancer 2019 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------