

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16305

研究課題名(和文) RAS野生型大腸癌細胞株における抗EGFR抗体薬の内在化機序の検討

研究課題名(英文) Internalization mechanism of anti-EGFR antibody drugs in RAS wild-type colorectal cancer cell lines

研究代表者

福家 慧 (FUKUYA, Akira)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：30780051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞株を用いて蛍光顕微鏡により細胞膜上のEGFR量を定量化した。siRNAや特異的阻害剤を用いた抗EGFR抗体薬の内在化はclathrin依存性であることを同定した。抗EGFR抗体薬添加時の細胞から蛋白抽出を行いプロテオーム解析を施行し細胞内動態関連遺伝子としてUBR4を絞り込んだ。UBR4は抗EGFR抗体薬添加時に蛍光二重免疫で優位にEGFRと共局在していた。またUBR4をknockdownすると抗EGFR抗体薬による細胞増殖抑制やapoptosisの効果は減弱し、Lysosomeでの分解も抑制された。臨床検体ではUBR4の腫瘍内発現と抗腫瘍効果や全生存期間は相関関係にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得た効果予測バイオマーカーUBR4は実臨床において従来治療よりも抗EGFR抗体薬に奏功する患者群の選定に寄与できる可能性がある。また腫瘍内発現を免疫染色により簡便に得られることより生検検体のみで治療効果予測できることは非常に意義が大きい。さらに抗EGFR抗体薬は大腸癌以外に頭頸部癌、肺がんなどに保険適応されており、本研究結果が今後他の癌種にも応用できる可能性が秘められていると考える。最終的には抗EGFR抗体薬と結合したEGFRの細胞内動態の解明が大腸癌の個別化医療に寄与し大腸癌患者のQOLを保ち、より長期にわたる生存期間を得ることが可能になると思われる。

研究成果の概要(英文)：We quantified the amount of EGFR on the plasma membrane by fluorescence microscopy in colorectal cancer cell lines, and identified clathrin-dependent internalization of anti-EGFR antibody drugs by siRNA and specific inhibitors. Proteome analysis of the protein extracted from anti-EGFR antibody-treated cells identified UBR4 as a gene associated with intracellular dynamics, and UBR4 was predominantly co-localized with EGFR by fluorescence double immunization upon addition of anti-EGFR antibody-treated cells. Knockdown of UBR4 suppressed the effects of anti-EGFR antibody drugs on cell proliferation and apoptosis, and also suppressed degradation of Lysosomes. Intratumor expression of UBR4 in clinical specimens correlated with anti-tumor efficacy and overall survival.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：消化器

キーワード：colon cancer EGFR Cetuximab Panitumumab internalization early tumor shrinkage lysosome depth of response

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の人口動態統計によれば、わが国の大腸癌死亡者数は第3位であり、有効な治療法の確立が求められている。現在切除不能進行再発大腸癌の標準治療は化学療法であるが、その中でも分子標的治療は重要な役割を占めており、RAS 野生型の大腸癌には抗 EGFR 抗体薬の投与が推奨されている。しかし、RAS 野生型大腸癌症例においても、抗 EGFR 抗体薬の治療効果は症例毎にまちまちであり、抗 EGFR 抗体薬に対する有効なバイオマーカーは開発されていない。

研究代表者はこれまで、RAS 野生型(BRAF 野生型)細胞株でも抗 EGFR 抗体薬の効果はまちまちであり、抗 EGFR 抗体薬添加による細胞膜上 EGFR 減少率(内在化の割合)と抗腫瘍効果には正の相関があることを報告した (Mol Cancer Res, 2017; 15:1445-1454)。また、EGFR にリガンド(TGF- など)が結合すると、EGFR は内在化されたのち、再度膜上にリサイクルすることがよく知られている。研究代表者は、抗 EGFR 抗体薬が癌細胞表面の EGFR に結合すると、EGFR が内在化してリサイクルされないで分解されることを見出した。さらに免疫蛍光二重染色により、内在化した EGFR は後期末ソームに移行しライソゾームに運ばれて分解されることを報告した。つまり抗 EGFR 抗体薬はリガンドの EGFR との結合を阻害するのみならず、EGFR をライソゾームで分解することにより癌細胞の増殖抑制に寄与することを明らかにした (Mol Cancer Res, 2017)。また研究代表者は予備実験において、clathrin 遺伝子を knockdown した大腸癌細胞に抗 EGFR 抗体薬を添加しても、内在化率は変わらないことを見出している。つまり、抗 EGFR 抗体薬により誘導される内在化は、リガンドにより誘導される clathrin-dependent な経路とは異なると考えられる。また、研究代表者は予備実験で、大腸癌細胞株に抗 EGFR 抗体薬を添加し、細胞を可溶化して別の抗 EGFR 抗体で免疫沈降を行ない、得られた EGFR 結合蛋白質を解析したところ、約 200 の蛋白質が同定された。このうち、一部の蛋白質を質量分析したところ、Superoxide dismutase、TNF receptor-associated protein、Stomatinなどの分子が抽出されている。つまり、抗 EGFR 抗体薬の添加により、EGFR は何らかの機序で内在化し、これらの分子と相互作用することによりライソゾームで分解されると考えられる。抗 EGFR 抗体薬は、EGFR の内在化が早く進む癌細胞ほど有効性が高いことから、Superoxide dismutase、TNF receptor-associated protein、Stomatin などの分子の中で、内在化を規定する重要な分子を見出せば、抗 EGFR 抗体薬の効果を予測しうる有効なバイオマーカーになる可能性が高い。

一方、細胞膜受容体の内在化の機序として、clathrin-dependent 経路の他に caveolin-dependent, clathrin/caveolin-independent (flotillin, GRAF1, Arf6, RhoA-dependent), micropinocytosis などがあり、抗 EGFR 抗体薬が細胞表面の EGFR に結合した後、いずれかの機序により内在化する可能性が高い。これらの内在化経路については、重要な蛋白質の siRNA によるノックダウンや特異的阻害剤を用いることにより、検索することが可能である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず抗 EGFR 抗体薬による EGFR の内在化機序について、多くの細胞株を用いて、いろいろな内在化経路のキーとなる蛋白質のノックダウン実験や阻害実験を行い、内在化の機序を検討する。また、抗 EGFR 抗体を用いて EGFR の免疫沈降およびプロテオーム解析を行い、その内在化の過程で関与する蛋白質を質量分析により明らかにする。次いで、これらの候補蛋白質について、抗 EGFR 抗体薬の効果の高い大腸癌細胞株と低い細胞株を用いて発現を調べ、そのバイオマーカーとしての意義を明らかにする。さらに、抗 EGFR 抗体薬により治療している

大腸癌症例の癌組織における内在化や蛋白質分解関連分子の発現と有効性との関連を調べ、治療予測バイオマーカーとしての意義を明らかにする。

3．研究の方法

本研究では抗 EGFR 抗体薬感受性大腸癌細胞株を用いて、現在の大腸癌治療の中心の一つである抗 EGFR 抗体薬の癌細胞内での分子機序を解明していくために、LS-MS/MS による質量解析や共免疫沈降を用いて候補蛋白を選択し、siRNA などを用いた免疫蛍光顕微鏡、RT-PCR を行い候補蛋白の臨床的意義について解明する。また臨床検体を用いて免疫染色による腫瘍内発現を調べ治療効果との関連性を解明する。

4．研究成果

これまで研究代表者は、抗 EGFR 抗体薬が癌細胞表面の EGFR に結合すると、EGFR が内在化してリサイクルされずに分解されること、また免疫蛍光二重染色により、内在化した EGFR は後期エンドソームに移行しライソゾームに運ばれて分解されることを報告してきた。

これまでの実験結果を背景に研究代表者は、令和 2 年度は大腸癌細胞株を用いて免疫顕微鏡により細胞膜上の EGFR 量を定量化した。各経路の重要な蛋白質を、siRNA によるノックダウンや特異的阻害剤を用いることで抗 EGFR 抗体薬の内在化経路を同定した。そして抗 EGFR 抗体薬添加時の細胞から蛋白抽出を行いプロテオーム解析を施行した。解析結果を内在化経路に関連する文献や各種蛋白の機能に照合し内在化経路に関連する候補遺伝子を絞り込んだ。令和 3 年度は、候補蛋白(遺伝子)の細胞内局在が抗 EGFR 抗体薬添加時に免疫二重免疫染色で優位に EGFR と共局在することを確認した。また候補遺伝子を knockdown することで、抗 EGFR 抗体薬の効果の減弱や細胞内動態の変化も確認した。令和 4 年度はこれまで行ってきた研究成果をもとに臨床検体を用いて腫瘍内候補蛋白発現と抗腫瘍効果や全生存期間との相関関係を見出した。現在論文執筆中である。

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 0件）

1. 発表者名 福家 慧, 佐藤康史, 岡田泰行, 岡本耕一, 宮本弘志, 高山哲治
2. 発表標題 大腸癌に対する抗EGFR抗体薬の新たなバイオマーカーとしてのUBR4の意義
3. 学会等名 第7回Gastro-PLUS
4. 発表年 2022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
---------	---------