

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293318

研究課題名(和文) 肺癌の新しい癌化機構の解明と治療法確立に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Identification of novel targets in the treatment of lung cancer

研究代表者

三好 新一郎 (Miyoshi, Shinichiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00190827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：治療抵抗性で予後不良な疾患である肺癌の治療において、発癌に関わる新たな分子機序を解明することが重要と考えられてきた。我々は、ヒト上皮成長因子受容体関連物質2(HER2)遺伝子の新たな変異を発見し、その発癌への寄与について明らかにした。また、HER2と結合してその活性化に関与すると考えられる分子を見出し、新たな治療標的となる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent developments in the genomic characterization of tumors have contributed to novel therapeutic approaches, and some molecular-targeted therapies based on the genetic profiles of tumors have improved patient survival. Human epidermal growth factor 2 (HER2) is a member of the HER family containing four receptor tyrosine kinases. Recently, we have identified novel mutations in the transmembrane domain of HER2 in lung adenocarcinomas. In this study, we clarified that these mutations could be oncogenic alterations of lung cancer. We also investigated the efficacy of afatinib as a HER2-targeted therapy in these HER2 altered lung cancer cells. In addition, we clarified a novel HER2 binding protein cytokeratin 19 (KRT19), and investigated the impact of KRT19 and HER2 interactions in signal transduction pathways to decode their possible roles in oncogenesis.

研究分野：胸部悪性腫瘍(肺癌・悪性胸膜中皮腫)における治療感受性・抵抗性に関する研究、肺癌の外科治療

キーワード：肺癌 HER2 遺伝子変異 チロシンキナーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

肺の癌化においては、ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) をはじめとした様々な分子異常が報告されているが未だに不明な点も多く、新規治療法につながる新しい分子機構の解明は重要な課題であった。我々は、ヒト上皮成長因子受容体関連物質 2 (HER2, ERBB2) 遺伝子の膜貫通領域にミスセンス変異 (HER2 G660D および V659E) を世界で初めて発見した。この変異 HER2 は膜貫通領域内でのアミノ酸の極性が大幅に変化するため、変異 HER2 に結合する共役受容体が EGFR 等の既知の受容体と異なることが予想された。この場合、変異 HER2-未知共役受容体複合体の下流シグナル経路が、既知の癌化シグナル経路と異なることが予想され、新たな肺の癌化機構の発見に至る可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した新規 HER2 遺伝子変異が引き起こす肺の癌化に着目し、肺癌の新しい分子機構・シグナル伝達系を解明することを主要な目的とした。さらに、解明された肺癌の新規異常分子機構に対する治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

In vitro での新規変異 HER2 の機能解析：変異 HER2 が細胞に及ぼす機能についてシグナル伝達経路を解析する。同時に変異 HER2 と複合体を形成する未知共役受容体について明らかにし、この共役受容体のリガンド、並びに下流シグナル伝達経路を同定する。

In vivo での新規変異 HER2 の発癌機能解析：HER2 遺伝子変異を持つ遺伝子改変 (Tg) マウスを作製し、肺癌の発生・進展を確認する。

ヒト肺癌検体における解析：の検討で明らかになった新しい発癌経路に関係する分子について実際の肺癌検体を使用し、ヒト肺癌での異常について解析する。

新規治療法の開発：HER2 膜貫通領域変異肺癌に対する治療、さらには - の研究で同定された肺癌の新規癌化機構・シグナル伝達に参与する分子を標的とした治療法を開発する。

4. 研究成果

In vitro での新規変異 HER2 の機能解析：我々が同定した新規 HER2 膜貫通領域の変異 (V659E, G660D) を正常気管支上皮細胞 (BEAS-2B) に導入し蛋白発現を検討したところ、これまでに HER2 遺伝子の活性型変異として知られるキナーゼドメインの変異 (A775insYVMA, G776VC, G776LC, P780insGSP) を導入した時と同様に、野生型 HER2 導入時と比べて下流シグナルの HER2、EGFR および AKT の過剰リン酸化を認めた (図 1)。

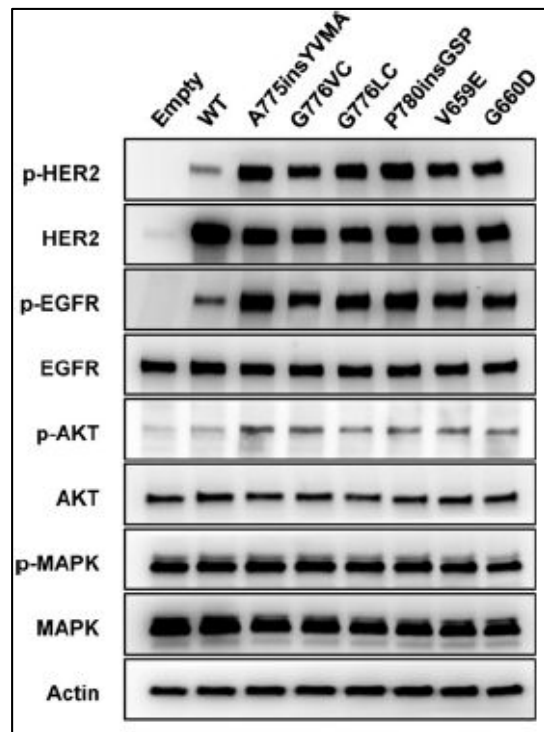


図 1. 変異 HER2 遺伝子導入による下流シグナルの変化 既知の HER2 キナーゼドメイン変異導入時と同様に、膜貫通領域変異 (V659E, G660D) 変異導入時にも下流の HER2, EGFR, AKT の過剰リン酸化を認めた

これらの結果より、新規 HER2 変異肺癌において、下流の EGFR および HER2 が新たな治療標的である可能性が示唆された。

一方で、野生型 HER2 遺伝子をヒト胎児腎細胞 (HEK293T) および肺癌細胞株 (A549) に遺伝子導入して過剰発現させ、免疫沈降法を用いて HER2 複合体を回収し電気泳動および銀染色したところ、A549 のみにタンパクバンドが得られ、これを LC-MS/MS 解析したところ、サイトケラチン 19 (KRT19, CK19) が新たな HER2 結合タンパクであることが明らかとなった (図 2)。

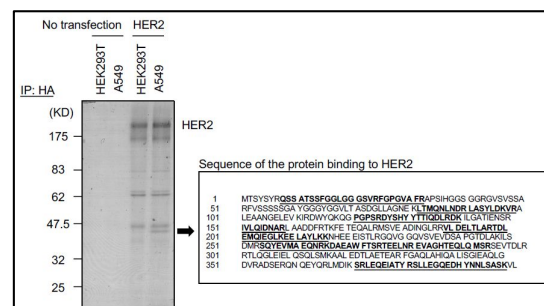


図 2. HER2 新規結合タンパク KRT19 の発見 肺癌細胞株 A549 では HER2 遺伝子導入による過剰発現で、HER2 新規結合タンパクである CK19 の存在が明らかとなった。

HER2 と KRT19 の結合についてさらに詳細な検討を行ったところ、これらの結合がそれぞれ KRT19 の N 末端 (図 3A, B) と HER2 の C 末端 (図 3C, D) で起きていることが判明した。

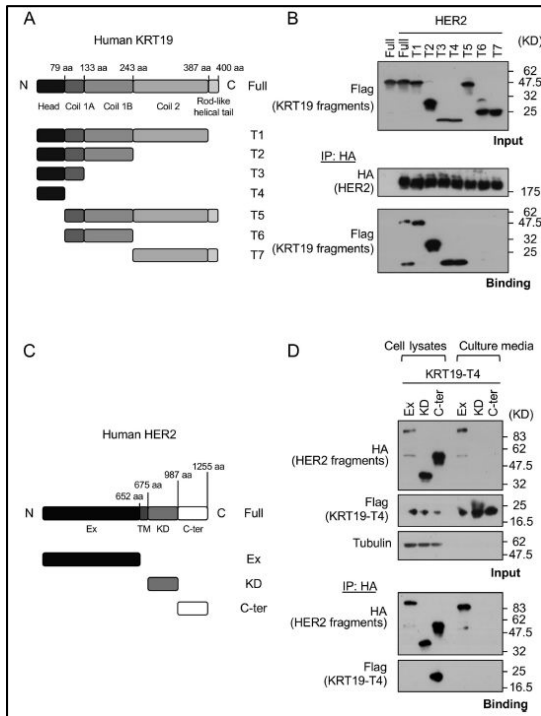


図 3. KRT19 および HER2 結合部位の決定 KRT19 および HER2 それぞれのドメインを製作し HEK293T 細胞に遺伝子導入した後に免疫沈降法を用いて回収し検討したところ、KRT19 の N 末端 (A,B) と HER2 の C 末端 (C,D) が結合に関与していることが明らかとなった。

さらに、HER2 および KRT19 の結合により活性化される分子を検討したところ、KRT19 の N 末端および HER2 の C 末端両者が存在するプラスミドを遺伝子導入した場合において ERK の過剰リン酸化が起きることが明らかとなり、下流経路として非常に重要と考えられた (図 4)。

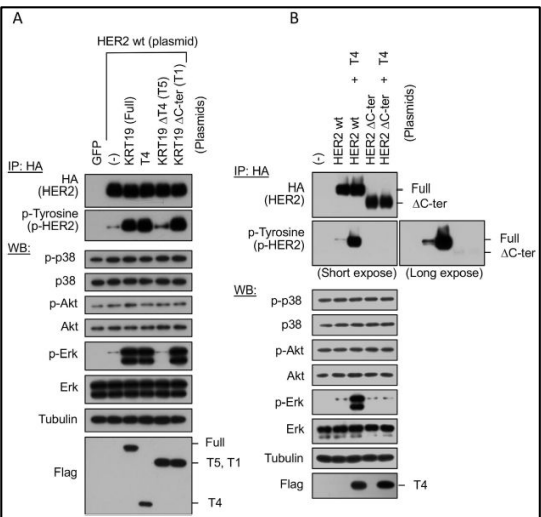


図 4. KRT19 および HER2 結合による下流シグナルの活性化 KRT19 の N 末端および HER2 の C 末端を含むプラスミドを同時に遺伝子導入した場合にのみ、ERK の過剰リン酸化が見られた。

以上の結果により、HER2 が過剰発現している肺癌においては、HER2 下流分子とともに、結合タンパクである KRT19 も治療標的となる可能性が示唆され、さらにその結合部位も同定できたことで、新たな治療法の開発につながる非常に興味深い研究結果が得られた。

In vivo での新規変異 HER2 の発癌機能解析:

ヒト野生型および変異型 HER2 (G660D) を有するトランスジェニックマウス作製を行った。当初、野生型 HER2 を有するトランスジェニックマウスは得られたものの、変異型 HER2 を有するマウスは得られなかった。そのため、Rosa26 locus へ CAG-loxP-STOP-loxP-野生型または変異型 HER2 cDNA を導入するノックインマウスの作製に切り替え、野生型および変異型 HER2 を有するキメラマウス、そして F1 マウスおよび F2 マウスを作製した。現在、全身性に Cre を発現するマウスと交配することで食餌により HER2 を全身性に誘導するマウスを作製し、変異型 HER2 マウスにおいて肺癌あるいは他臓器の癌が発生するかを検討しており、今後得られた結果を報告する予定である。

ヒト肺癌検体における解析:

主に得られた発癌経路に関係する分子として、新規 HER2 結合タンパクである KRT19 の発現を肺癌細胞株およびヒト肺癌検体で検討した。

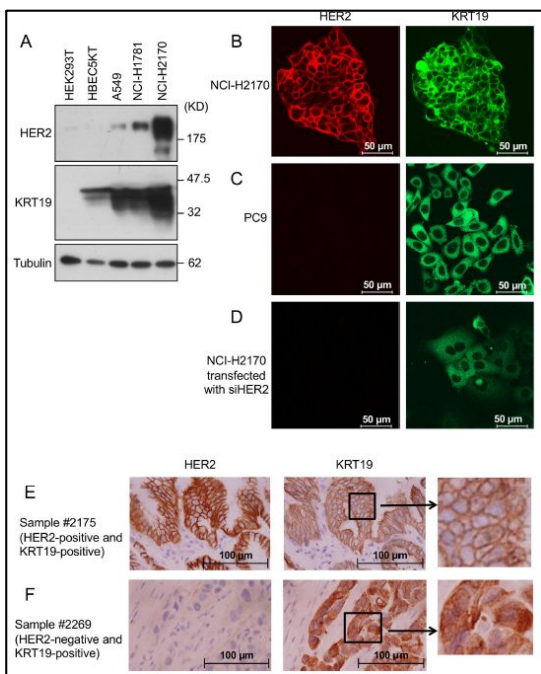


図 5. HER2 新規結合タンパク質 KRT19 の発現と局在 (A) HER2 高発現肺癌細胞株 (NCI-H1781 および H2170) では KRT19 も同様に高発現していた。肺癌細胞株 (B,C,D) およびヒト肺癌検体 (E,F) において、HER2 高発現肺癌検体では KRT19 が細胞質ではなく細胞膜に局在変化していた。

	HER2 expression status	HER2 expression status		P value
		(+)	(-)	
KRT19 expression status (n=86)	Positive	36	34	0.001
	Negative	1	15	
KRT19 location in KRT19 (+) cases (n=70)	Cell membrane	34	23	0.0052
	Cytoplasm	2	11	

表1. ヒト肺癌検体におけるHER2発現とKRT19局在

まず、肺癌細胞株におけるHER2およびKRT19の発現について検討したところ、HER2高発現肺癌細胞株（NCI-H1781およびH1-H2170）ではKRTも高発現しており（図5A）、さらに普段は細胞質に存在するKRT19が、HER2高発現細胞株では細胞膜に局在を変えて存在していることが判明した（図5B,C,D）。実際の肺癌臨床検体でも同様に、HER2高発現検体ではKRT19が細胞膜に高発現していることを見出した（図5E,Fおよび表1）。

新規治療法の開発：

HER2膜貫通領域変異肺癌に対する治療、さらにはその研究で同定された肺癌の新規癌化機構・シグナル伝達に参与する分子を標的とした治療法を検討した。

まず、新規HER2膜貫通領域変異（V659E, G660D）によって下流のHER2およびEGFRが活性化されることより、これら双方に対する阻害効果を有するチロシンキナーゼ阻害剤であるAfatinibの効果を検討したところ、Afatinibは従来のキナーゼドメインの変異と同様に新規HER2変異に対しても下流経路を効果的に阻害することが分かった（図6）。

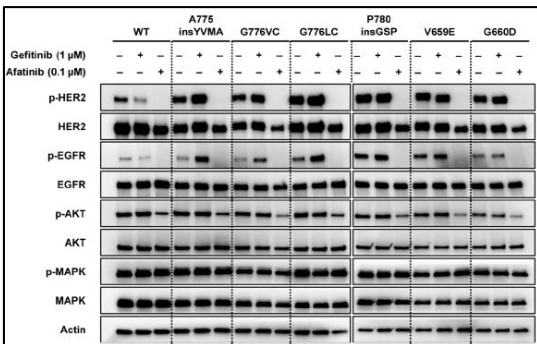


図6. HER2変異に対するチロシンキナーゼ阻害剤の効果。キナーゼドメインの変異と同様に、膜貫通領域の変異（V659E, G660D）に対してもEGFRおよびHER2のチロシンキナーゼ阻害剤であるAfatinibが効果的に下流のシグナルを抑制した。

さらにAfatinibの抗腫瘍効果を検討したところ、*in vitro*の実験ではHER2のコピー数増幅（H2170, Calu3）あるいはHER2キナーゼドメインの活性型変異（H1781）によりいずれもHER2の高発現を示す肺癌細胞株において、Afatinib治療により細胞周期G1期の増加を示し（図7(a)）さらにアポトーシスマーカーであるCleaved PARPの発現が増加していた（図7(b)）。

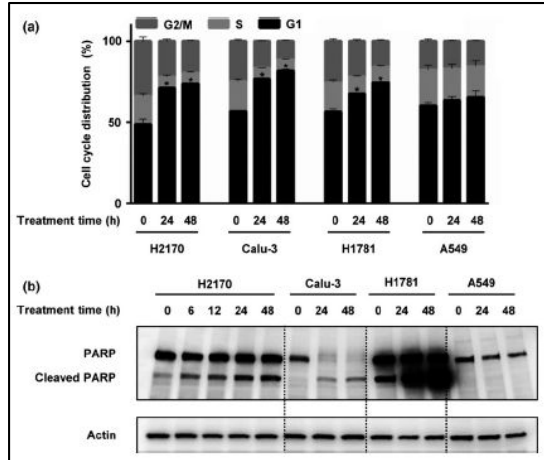


図7. HER2高発現肺癌細胞株（H2170, Calu3, H1781）におけるAfatinibの抗腫瘍効果（*in vitro*） Afatinib投与により、これらの細胞の(a)G1期増加、あるいは(b)アポトーシスマーカーCleaved PARPの増加を示した。

また、マウスを用いた*in vivo*でAfatinibの効果を検討したところ、HER2遺伝子増幅細胞株（H2170）HER2活性型変異細胞株（H1781）いずれに対しても高い抗腫瘍効果を示した（図8）。

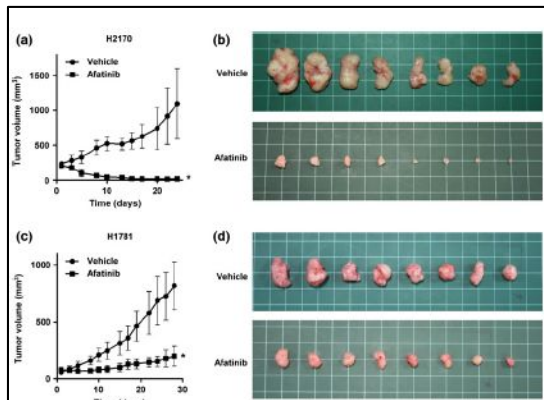


図8. マウスゼノグラフトモデルにおけるAfatinibの抗腫瘍効果。H2170(HER2コピー数増幅)およびH1781(HER2変異)いずれの肺癌細胞株においても、Afatinibが高い抗腫瘍効果を示した。

一方で、HER2新規結合タンパクであるKRT19についても、治療標的として検討を行った。si-RNAを用いて実験的にKRT19の発現を抑制したところ、H1781およびH2170いずれの細胞株においても細胞増殖が抑制された（図9）。

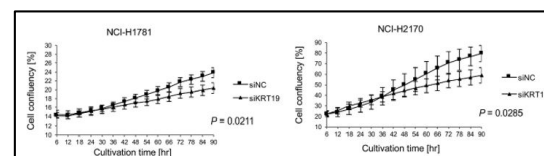


図9. 肺癌細胞株に対するKRT19ノックダウンの抗腫瘍効果。si-RNAを用いてKRT19を抑制したところ、H1781およびH2170いずれも増殖が抑制された。

まとめ：

今回の検討により、肺癌における HER2 遺伝子についての様々な知見が得られた。まず、我々が発見した新規 HER2 遺伝子変異である膜貫通領域の変異を有する細胞では、下流の HER2 および EGFR の活性化を通して AKT が活性化されており、これらを効果的に阻害するチロシンキナーゼ阻害剤である Afatinib が治療薬として有効である可能性が示唆された。一方で、HER2 と結合するたんぱく質としての KRT19 の可能性を見出し、これらの複合体および結合により活性化される下流の ERK 等が新たな治療標的となり得る可能性が考えられた。

今回得られた知見については、世界的な評価を得ている学術雑誌にその結果を発表した。これらはいずれも、治療が困難な肺癌に対する新たな治療法の可能性を示す非常に重要な知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ken Suzawa, Shinichi Toyooka, Shinichiro Miyoshi (他 11 名), Antitumor effect of afatinib, as a human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapy, in lung cancers harboring HER2 oncogene alterations, *Cancer Science*, 査読有, 107, 2016, 45-52, DOI: 10.1111/cas.12845

Tomoaki Ohtsuka, Masakiyo Sakaguchi, Shinichiro Miyoshi (他 16 名), Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway, *Scientific Reports*, 査読有, 23, 2016, 39557, DOI: 10.1038/srep39557

〔学会発表〕(計 6 件)

枝園和彦、三好新一郎 他、HER2 肺癌に対する afatinib の有効性、第 1 回肺癌バイオカンファレンス、2016 年 9 月 24 日、日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社(東京都品川区)

Tomoaki Ohtsuka, Shinichiro Miyoshi 他, Cytokeratin 19 binds to HER2 and activate HER2 and its downstream signaling, AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2016 年 2 月 16-20 日, Hyatt Regency Maui (Maui, Hawaii, USA)

諏澤憲、三好新一郎 他、HER2 関連肺癌に対するアファチニブの抗腫瘍効果、第 58 回関西胸部外科学会学術総会、2015 年 6 月 12-13 日、岡山コンベンションセンター(岡山市)

Tomoaki Ohtsuka, Shinichiro Miyoshi 他, Identification of a novel binding protein playing a critical role in HER2 activation in lung cancer cells, AACR Annual Meeting 2015, 2015 年 4 月 19 日, Pennsylvania

Convention Center (Philadelphia, Pennsylvania, USA)

Ken Suzawa, Shinichiro Miyoshi 他, Anti-tumor effect of afatinib, an irreversible EGFR/HER2 dual inhibitor, in lung cancers harboring HER2 oncogene, AACR Annual Meeting 2015, 2015 年 4 月 20 日, Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, Pennsylvania, USA)

諏澤憲、三好新一郎 他、新規 HER2 膜貫通部領域遺伝子変異の機能解析、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 新一郎 (MIYOSHI, Shinichiro)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00190827

(2) 研究分担者

豊岡 伸一 (TOYOOKA, Shinichi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30397880

宗 淳一 (SOH, Junichi)
岡山大学病院・講師
研究者番号：90559890

山本 寛斉 (YAMAMOTO, Hiromasa)
岡山大学病院・助教
研究者番号：40467733

佃 和憲 (TSUKUDA, Kazunori)
岡山大学病院・講師
研究者番号：20346430

阪口 政清 (SAKAGUCHI, Masakiyo)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70379840

片山 博志 (KATAYAMA, Hiroshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90713975

(3) 研究協力者

枝園 和彦 (SHIEN, Kazuhiko)
諏澤 憲 (SUZAWA, Ken)
大塚 智昭 (OHTSUKA, Tomoaki)