

対象研究テーマ:HGF-Met系を中心とするがん転移・薬剤耐性のメカニズムと制がん・創薬研究

研究期間:2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目:Ror1チロシンキナーゼ-Met相互作用を介した肺がん分子標的薬耐性の新規機構の研究

研究代表者:神戸大学大学院医学研究科 准教授 西田 満

研究成果の概要:

肺腺がんの治療において上皮成長因子受容体EGFRに変異が認められるケースではEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)であるゲフィチニブが奏効する。しかしその多くは薬剤耐性を獲得し1年程度で再発するため、耐性獲得メカニズムの完全な解明が急務である。耐性機構には、がん細胞における*Met*の増幅、また、がん細胞自身や間質の線維芽細胞が産生するHGFによるHGF-Metシグナルの活性化などが関わっていることが明らかになっている。本研究では、肺腺がん細胞のHGF-Metシグナルによるゲフィチニブ耐性化における受容体型チロシンキナーゼRor1の役割について検討した。その結果、Ror1がHGFによるゲフィチニブ耐性化において、細胞増殖に重要なErkの活性化に関与していることを見出した。さらに、Ror1と*Met*が結合することも見出した。

研究分野:腫瘍生物学

キーワード:薬剤耐性、肺がん、HGF-Met、Ror1

1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子に活性型変異を有する肺腺がんに対して、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)であるゲフィチニブやエルロチニブが奏効する。しかし、EGFR活性型変異を有する肺腺がんであってもEGFR-TKIに自然耐性を示す症例があることや、奏効した症例もほぼ例外なく耐性を獲得することから、EGFR-TKIに対する耐性機構の解明と耐性の克服が臨床的にも重要な課題となっている。耐性機構には、がん細胞における*EGFR*の二次的変異や*Met*の増幅、また、がん細胞自身や間質の線維芽細胞が産生するHGFによるHGF-Metシグナルの活性化が関わっていることが明らかになっている。*Met*増幅とHGF-Metシグナルの活性化は、共にPI3K/Akt経路を活性化することで耐性を獲得させる。しかし、前者はErbB3の活性化を介するが、後者はErbB3を介さずにPI3K/Akt経路を活性化することから、*Met*から下流へのシグナル伝達機構は両者の間で異なると考えられている。

HGFは、その α 鎖に*Met*との結合に重要な4個のクリングルドメインを有する。Rorファミリーは細胞外領域にクリングルドメインを有する唯一の受容体型チロシンキナーゼであるが、我々は世界に先駆けてマウスRor1、Ror2を同定し、ノックアウトマウス等の解析からRor1、Ror2がWnt5a受容体として

non-canonical (β -catenin非依存的) Wntシグナルを活性化し、肺、心臓、骨・軟骨系等の発生に必須な役割を担っていることを明らかにしてきた(Minami et al., Dev. Dyn. 2010)。また、Ror1、Ror2はがん関連遺伝子産物としても機能し、諸種のがんにおけるRor1、Ror2またはWnt5aの過剰発現に伴うRorを介するシグナルの恒常的活性化が、がんの増悪過程と密接に関係することを見出している(Nishita et al., Trends Cell Biol. 2010)。特に、難治性トリプルネガティブ乳がん細胞株においては、Ror1が過剰発現しておりPI3K/Akt経路の活性化を介した細胞の生存・増殖に関与することを見出している(未発表)。さらに、*Met*の増幅が認められる肺腺がんや胃がんの細胞において、Ror1が*Met*にリン酸化されることで細胞増殖に関与することが最近報告された(Gentile et al., Cancer Res. 2011)。しかしながら、Ror1と*Met*の相互作用が、どのようにして細胞内シグナル伝達系を活性化し、細胞増殖を引き起こすのかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、培養肺腺がん細胞を用いて、HGF-MetシグナルとRor1の相互作用による細胞増殖の制御機構と、そのEGFR-TKI耐性化における役割を明らかにすることを目的と

する。本研究により得られる知見は、*Met* の増幅や HGF-*Met* シグナルの活性化による肺腺がんの薬剤耐性のメカニズムを解き明かし、EGFR-TKI の適応をより明確に判定するための検査方法や、薬剤耐性を克服するための新たな治療方法の確立に貢献する。

3. 研究の方法

ヒト肺腺がん細胞株である HCC827 細胞に *Ror1* siRNA をトランスフェクションすることによって *Ror1* の発現を抑制した。HGF とゲフィチニブを単独もしくは両方同時に処理した細胞を溶解し、Western blotting によって各種タンパク質の発現やリン酸化レベルの解析を行った。*Ror1* と *Met* の相互作用は抗 *Ror1* 抗体を用いた共免疫沈降によって解析した。また、*Ror1* における *Met* 結合部位を明らかにするため、COS7 細胞に Flag タグを付加した各種 *Ror1* 変異体および野生型 *Met* を強制発現させ、抗 Flag タグ抗体を用いて共沈免疫沈降実験を行った。

4. 研究成果

ゲフィチニブ感受性である HCC827 肺腺がん細胞株を HGF 処理することにより、ゲフィチニブ耐性を誘導することができる。また私たちは HCC827 を含む複数の肺腺がん細胞株において *Ror1* の発現を確認している。そこで、HCC827 細胞を用いて *Ror1* の発現を抑制した後 HGF およびゲフィチニブ処理を行い、各種シグナル伝達因子のリン酸化動態を解析した。その結果、*Ror1* の発現抑制処理に関わらず、ゲフィチニブは EGFR とそれと共役する ErbB3、また細胞増殖・生存に重要な Erk および Akt のリン酸化を阻害した。また、コントロール siRNA を導入した細胞において、HGF はゲフィチニブ添加による EGFR と ErbB3 のリン酸化阻害には影響を与えず、Erk および Akt のリン酸化阻害を解除した。この結果は、HGF がゲフィチニブ存在下で増殖・生存シグナルを活性化しうること、すなわちゲフィチニブ耐性を誘導したことを意味している。一方、*Ror1* siRNA を導入した細胞においては、ゲフィチニブ添加による Erk のリン酸化阻害は HGF を同時添加しても完全には解除されなかった。したがって、*Ror1* が HGF によるゲフィチニブ耐性化において、Erk の活性化を介して細胞増殖に関与していることが示唆された。

HGF 受容体である *Met* は ErbB3 をリン酸化し、ErbB3-Erk/Akt 経路を活性化することによりゲフィチニブ耐性を誘導することが知られている。しかし、HGF はゲフィチニブ存在下で ErbB3 のリン酸化を誘導しなかったことから、HGF-*Met* は ErbB3 非依存的に Erk/Akt を活性化していると考えられる。そこで、*Met* が *Ror1* に結合しうるかを調べるた

め共沈実験を行った。HCC827 細胞において内在性の *Ror1* を免疫沈降した結果、内在性の *Met* の共沈が検出され、さらに HGF 刺激によって *Met* の共沈量が増加した。したがって、*Met* と *Ror1* は結合し、HGF 刺激に伴いその結合が増強することが示された。次に *Met* と *Ror1* の結合に *Ror1* のキナーゼ活性が必要か、また *Met* が *Ror1* のどのドメインに結合するかを検討するために *Ror1*DK および各種欠失変異体を用いて解析を行った。その結果、*Ror1* の DK および細胞内領域を全て欠失させた Tc 変異体において *Met* が結合したことから、*Met* との結合に *Ror1* のキナーゼ活性や細胞内領域は必要ではないことが明らかになった。現在、これらの結果を踏まえ、HGF-*Met* シグナルと *Ror1* シグナルの相互作用による細胞増殖の制御機構と、その EGFR-TKI 耐性化における役割について解析を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Li, X., Yamagata, K., Nishita, M., Endo, M., Arfian, N., Rikitake, Y., Emoto, N., Hirata, K., Tanaka, Y., and Minami, Y. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Genes Cells*, 2013, in press.
2. Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., and Takahashi, N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat. Med.* 18: 405-412, 2012
3. Endo, M., Doi, R., Nishita, M., and Minami, Y. Ror family receptor tyrosine kinases regulate the maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. *J. Cell Sci.* 125: 2017-2029, 2012.
4. Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., and Minami, Y. Dissection of Wnt5a-Ror2 Signaling Leading to Matrix Metalloproteinase (MMP-13) Expression. *J. Biol. Chem.* 287:

1588-1599, 2012.

[学会発表] (計1件)

1. 西田満、喬森、宮本真里、山田真紀子、大谷浩、Christine Hartmann、西中村隆一、南康博「マウス腎臓発生におけるWnt5a-Ror2 シグナルの役割」日本分子生物学会年会、2012年12月(福岡)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸大学大学院医学研究科・准教授
西田 満

(2) 研究分担者

神戸大学大学院医学研究科・教授
南 康博

(3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫