

# 主論文

## Tumor-suppressive effect of LRIG1, a negative regulator of ErbB, in non-small cell lung cancer harboring mutant EGFR

(ErbB 抑制因子である LRIG1 の EGFR 変異型非小細胞肺癌における腫瘍抑制効果)

### [緒言]

肺癌は先進主要国において癌関連死亡原因の第 1 位である。非小細胞肺癌においてドライバー遺伝子変異として EGFR 遺伝子変異が発見されて以降、EGFR 変異型肺癌に対する EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の劇的な治療効果は肺癌の治療を大きく変化させた。しかし、奏効した症例も大部分が約 1 年で耐性を獲得し再発するため、その耐性の克服や、異なる機序で EGFR を抑制する薬剤の開発が期待されている。

2000 年代より、Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) という膜貫通タンパク質に ErbB (EGFR, HER2-4) の発現・リン酸化を抑制する効果があることが報告され注目されている。脳腫瘍の分野では野生型 EGFR よりも変異型 EGFR に対する抑制効果の方が強いと報告されている。しかし、最も変異型 EGFR と関係が深い肺癌においては LRIG1 の機能は不明である。

今回我々は肺癌における LRIG1 の発現レベルを調べ、LRIG1 が EGFR 変異型肺癌に及ぼす影響を検討した。

### [材料と方法]

#### mRNA 発現解析

正常気管支上皮細胞株 (BEAS-2B)、EGFR 野生型肺癌細胞株 (A549、H1299)、EGFR 変異型肺癌細胞株 (HCC827、HCC4006、PC9、HCC4011、H1975) における LRIG1 の mRNA 発現量を定量 PCR 法によって測定した。また当科で手術を行った 10 例の肺癌手術検体における LRIG1 の mRNA 発現量も同様に測定した。

#### DNA メチル化解析

BEAS-2B、A549、H1299、HCC827、HCC4006、PC9、HCC4011、H1975 細胞株の DNA を用いてメチル化特異的 PCR・バイサルファイトシーケンスを行い、LRIG1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を調べた。またそれらの細胞株に DNA 脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine を曝露させ、LRIG1 の mRNA 発現量の変化を調べた。

#### Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データベースを用いた遺伝子発現解析

CCLE のデータベースより 978 種類の癌細胞株における LRIG1 の mRNA 発現量を取得した。EGFR の変異の有無が分かっている 101 種類の肺癌細胞株を EGFR 野生型群 (n=85) と EGFR 変異型群 (n=16) に分け、グループ間の LRIG1 発現量を比較した。

#### LRIG1 安定発現細胞株の作成

LRIG1 遺伝子を含むプラスミドをリポフェクション法により肺癌細胞株 (EGFR 野生型、A549 ; EGFR 変異型、HCC827、HCC4011、H1975) に導入し、トランスポゼースを用いて遺伝子組み込みを促進することで、LRIG1 の安定発現細胞株 (A549-LRIG1、HCC827-LRIG1、HCC4011-LRIG1、H1975-LRIG1) を作成した。コントロールとして、それぞれの肺癌細胞株において GFP の安定発現細胞株 (A549-GFP、HCC827-GFP、HCC4011-GFP、H1975-GFP) も同様に作成した。

#### ウエスタンブロット

LRIG1、EGFR、リン酸化 EGFR、それらの下流シグナル、また上皮間葉転換 (EMT) 関連因子のタンパク質レベルでの発現を測定するためにウエスタンブロットを行った。

### 細胞増殖能測定

IncuCyteZOOM を用いて LRIG1 安定発現細胞株と GFP 安定発現細胞株の増殖能を測定した。

### 細胞浸潤能・遊走能測定

Invasion chamber と Boyden chamber を用いて LRIG1 安定発現細胞株と GFP 安定発現細胞株の浸潤能・遊走能をそれぞれ測定した。

### 動物実験

LRIG1 安定発現細胞株と GFP 安定発現細胞株をそれぞれマウスの皮下に移植した。その後 6 週間にわたり腫瘍の大きさを観察し、それぞれの腫瘍形成能を測定した。

### リン酸化レセプターチロシンキナーゼ (RTKs) 測定

リン酸化 RTKs 測定キットを用いて LRIG1 安定発現細胞株と GFP 安定発現細胞株の 44 種類の RTKs のリン酸化タンパク質発現レベルを測定した。

### 上皮間葉転換 (EMT) 誘導実験

TGF- $\beta$  を用いて LRIG1 安定発現細胞株と GFP 安定発現細胞株に EMT を誘導した。その後、ウェスタンブロットで EMT 関連タンパク質を測定した。

## **[結果]**

### 肺癌における LRIG1 の発現

7 種類の肺癌細胞株 (A549、H1299、HCC827、HCC4006、PC9、HCC4011、H1975) すべてにおいて、正常気管支上皮細胞株 (BEAS-2B) より、LRIG1 の mRNA 発現は低下していた。DNA メチル化解析では、これらの肺癌細胞株において LRIG1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が示され、このことが LRIG1 の発現低下に関与していると考えられた。また臨床検体を用いた実験では、10 例中 9 例の肺癌手術検体で、腫瘍組織においては非腫瘍組織よりも LRIG1 の mRNA 発現が低下していた。

CCLE データベースを用いた解析では、EGFR 変異型群では EGFR 野生型群より有意に LRIG1 の mRNA 発現レベルが低かった。

### LRIG1 の遺伝子導入が EGFR の発現に与える影響

ウェスタンブロットを行ったところ、A549-LRIG1、HCC827-LRIG1、HCC4011-LRIG1、H1975-LRIG1 では、A549-GFP、HCC827-GFP、HCC4011-GFP、H1975-GFP よりもそれぞれ EGFR タンパク質の発現が低下していた。また、EGFR 変異型肺癌細胞株由来の HCC827-LRIG1、HCC4011-LRIG1、H1975-LRIG1 においては EGFR のリン酸化タンパク質もより顕著に低下していた。これらの結果から、LRIG1 の遺伝子導入は EGFR の発現・リン酸化を低下させることが示唆された。

### LRIG1 の遺伝子導入が細胞の増殖能、浸潤能、遊走能、腫瘍形成能に与える影響

EGFR 変異型肺癌細胞株由来の HCC827-LRIG1、HCC4011-LRIG1、H1975-LRIG1 では HCC827-GFP、HCC4011-GFP、H1975-GFP よりそれぞれ細胞増殖能が著しく低下していた。一方で EGFR 野生型肺癌細胞株由来の A549-LRIG1 と A549-GFP では増殖能に差は見られなかった。

また EGFR 変異型肺癌細胞株由来の HCC827-LRIG1 は HCC827-GFP より浸潤能・遊走能ともに著しく低下していた。

マウスの皮下に癌細胞を移植する動物実験を行ったところ、HCC827-LRIG1 は HCC827-GFP よりも腫瘍形成能が著しく低下していた。これらの結果は、LRIG1 が EGFR 変異型肺癌に対して強力な抗腫瘍効果を有することを示唆した。

### LRIG1 が EGFR 以外の RTKs に与える影響

EGFR 変異型肺癌細胞株由来の HCC827-LRIG1 においては HCC827-GFP よりも、EGFR だけでなく、HER2、HER3、MET、および IGF-1R のリン酸化タンパク質の発現が低下していた。

## LRIG1 が EMT に及ぼす影響

EGFR 変異型肺癌細胞株由来の HCC827-LRIG1、HCC827-GFP において TGF- $\beta$  を用いて EMT を誘導したところ、HCC827-GFP では上皮系マーカーの低下と間葉系マーカーの上昇が見られ、EMT が生じたと考えられたが、HCC827-LRIG1 では上皮系・間葉系マーカー共に変化が見られなかった。この結果から、LRIG1 は EMT の抑制効果を有する可能性が示唆された。

## **[考察]**

今回我々は肺癌細胞において LRIG1 の発現が低下していたことを発見したが、腎癌や子宮頸癌など他の癌腫においても同様に LRIG1 の発現が低下していたと報告されている。癌細胞において LRIG1 の発現が低下している原因は完全には解明されていないが、大腸癌や頭頸部癌では LRIG1 のプロモーター領域のメチル化が関係しているという報告がある。今回我々は、肺癌細胞においても LRIG1 のプロモーター領域のメチル化を検出し、LRIG1 低下の原因と考えられた。また LRIG1 の発現は癌のサブタイプによっても異なると報告されている。そのため我々は CCLE のデータベースを用いて EGFR 遺伝子変異の有無で LRIG1 の発現を比較したところ、EGFR 変異型肺癌では EGFR 野生型肺癌よりも LRIG1 の発現が低下していることを発見した。

LRIG1 の EGFR 抑制機序に関しては、LRIG1 が EGFR と結合しユビキチン化・分解を促進する機序と、モノクローナル抗体のように働き EGFR のリン酸化を妨げる機序の 2 つがあると報告されている。我々の実験では LRIG1 は EGFR の全タンパク質量も抑制していたが、リン酸化 EGFR をより強力に抑制しており、EGFR 変異型肺癌細胞株においても両方の抑制機序が作用していたと考えられた。

今回の研究では LRIG1 は EGFR-TKI に対する耐性機序である second mutation T790M を有する肺癌細胞株 (H1975) においても抗腫瘍効果を呈した。さらに LRIG1 は他の EGFR-TKI 耐性機序として知られる MET、HER2、IGF-1R の活性化や EMT も抑制することが示された。これらの結果から LRIG1 は EGFR 変異型肺癌に対して抗腫瘍効果を持つだけでなく、EGFR-TKI に対する耐性獲得抑制の働きも有する可能性が示唆された。

脳腫瘍の分野では、LRIG1 の安定化タンパク質の治療効果が実証されており、臨床応用に向けた研究が進んでいる。肺癌の分野においても、臨床応用に向けて、さらなる研究が必要である。

## **[結論]**

LRIG1 は肺癌、特に EGFR 変異型肺癌においてその発現が低下していた。EGFR 変異型肺癌細胞に対する LRIG1 の遺伝子導入は、EGFR の発現とリン酸化を著しく低下させ、強力な抗腫瘍効果を示した。今回の結果から、LRIG1 には治療標的としての可能性が期待される。