

LKB1 が不活化した肺癌における SMOC1 を標的とした新規治療戦略の構築

名古屋大学医学部附属病院

呼吸器内科 病院助教 田中一大

呼吸器内科 病院講師 森瀬昌弘

愛知県がんセンター研究所

分子生物学分野 主任研究員 佐藤龍洋

1. 研究の背景・目的

Liver Kinase B1 (LKB1) は、消化管ポリポーシスを引き起こす常染色体優性遺伝疾患；Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子として知られ、細胞のエネルギー代謝・極性制御に関わる腫瘍抑制遺伝子である。LKB1 の不活化は、肺癌だけでなく大腸癌、悪性黒色腫、卵巣癌など様々な癌腫で報告されているが、未だ有効な治療法が確立されていない。非小細胞肺癌においては、p53・KRAS・EGFR に次いで4番目に頻度が高く、EGFR など治療標的となるドライバー遺伝子変異とは排他的な関係にある¹。進行が早く、治療の主体が殺細胞性の抗癌剤に依存しているため、近年でも予後の改善はほとんどない。

研究代表者は、2017年の5月まで米国のMD Anderson Cancer Center に留学し、肺癌細胞株におけるオミクスデータの統合解析と基礎研究を行ない、LKB1 が不活化した肺癌において、カルバモイルリン酸合成酵素 (CPS1) が過剰発現していることを世界に先駆けて発見した。CPS1 はアンモニア解毒と塩基合成に関わる酵素であり、臨床検体を用いた検討で CPS1 が強発現している症例は非常に予後が悪く、有効な予後マーカーになるという結果を得て JNCI に報告を行った²。しかし、CPS1 は正常の肝臓でも発現しており、のちの解析で有効な治療標的にはなり難い現状が判明した。

LKB1 が不活化した肺癌の分子生物学的な特徴を追求するため、研究代表者は肺癌細胞株のオミクスデータを統合解析し、LKB1 が不活化した細胞株のみが特徴的に高発現する分泌タンパク質 SPARC Related Modular Calcium Binding 1 (SMOC1) に着眼した。SMOC1 は、正常組織では主に精巣に発現が限局しており、成長過程では骨や眼の形成を促進する因子である。複数のタンパク質に結合することが知られ、近年では、低酸素状態になると血管上皮細胞から分泌されることが報告された³。TGF- β の受容体の1つ Endoglin に作用

し、血管上皮細胞の増殖と活性化に関わる。しかし、腫瘍における機能解析は極めて限定的で、神経膠芽腫など報告が一部の癌腫に限られる。肺癌においては、これまでに全く報告がなく、腫瘍進展や微小環境の形成に着眼した詳細な検討は行われていない。本研究では、LKB1 が不活化した肺癌が特異的に分泌する SMOC1 が腫瘍増殖と血管新生を促進するという仮説に基づき、腫瘍進展におけるメカニズムの一端を解明し、同因子を標的とした新たな治療戦略の構築を目指す。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 肺癌における SMOC1 発現の制御機構の解明

In vitro で、siRNA を用いて LKB1 をノックダウンし、リアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法で標的分子である SMOC1 の発現レベルを確認する。細胞培養上清液は、遠心式フィルターユニット用いて濃縮する。また、LKB1 の強制発現による検証のため、合成プラセミドからレンチウイルスベクターに TOPO クローニングを行い、LKB1 発現ベクターを作成する。LKB1 の下流には、AMPK ファミリーや SIK など複数のシグナル経路があるため、LKB1 を強制発現した細胞株を用い、下流の AMPK・SIK1 をノックダウンすることで、SMOC1 の発現制御機構を解明する。

(2) 腫瘍進展における SMOC1 の機能解析（腫瘍増殖・形質転換への関与・血管新生に対する働き）

SMOC1 の肺癌細胞自身に対する影響を検証する。具体的には、WST アッセイを用いた細胞増殖、及びスクラッチアッセイ・マトリゲルを用いた移動/浸潤能に対する評価を行う。SMOC1 のパラクラインによる機能解析については、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた tube formation assay で検証する。さらに、オミクスデータの解析から、SMOC1 と結合することで腫瘍進展を促進する細胞膜タンパク質・分泌タンパク質の特定を行い、その相互作用についても検証する。SMOC1 が結合する分子の種類から、腫瘍増殖・TGF-beta シグナル経路への関与、形質転換、血管新生に及ぼす影響を見定め、結合する受容体及びそのシグナル経路に至る詳細なメカニズムを解析する。

(3) SMOC1 の発現レベルが予後に及ぼす影響の解析

パブリックデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) を用いて、SMOC1 の mRNA 発現レベルと全生存期間の関連を非小細胞肺癌のデータセットにおいて解析する。

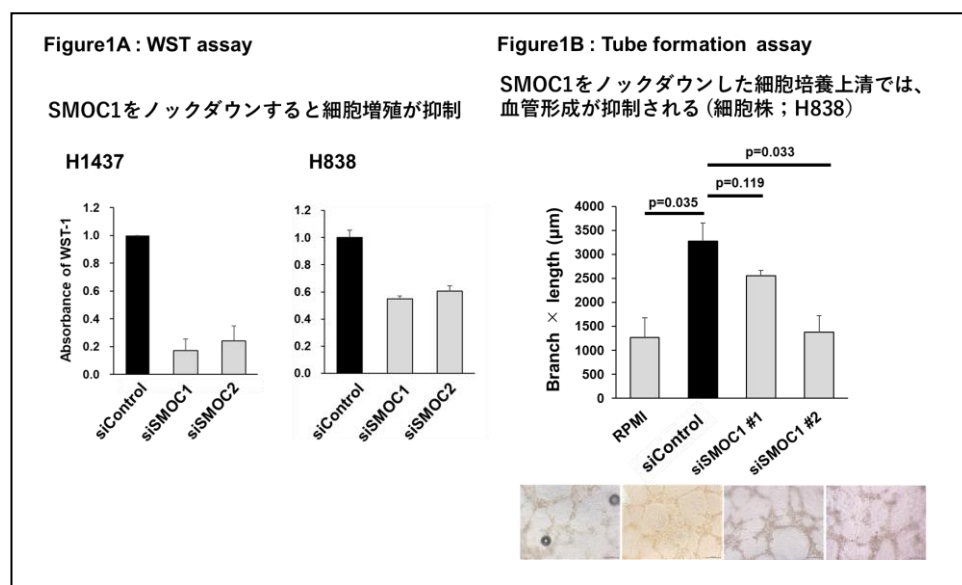
基本的な臨床情報と LKB1 の発現レベル・遺伝子情報を加えた多変量解析を行い、SMOC1 の発現が独立した予後予測因子になるかどうかを検討する。

3. 研究結果

(1) SMOC1 の発現調整機構の解析においては、LKB1 をノックダウンすると mRNA レベルで SMOC1 の発現が数倍に増強することが判明し、LKB1 が不活化した肺癌において SMOC1 が高発現している原因の一端を突き止めた。しかし一方で、LKB1 をノックダウンしても SMOC1 の発現レベルが全く変化しない細胞株も認められた。また、SMOC1 の発現増強に関して、過去に報告されている TGF- β ・Tumor necrosis factor- α (TNF α) の添加や、低酸素での培養条件下で検証を行ったが、SMOC1 の発現上昇には細胞株毎で一致しない結果であった。これらの検討結果から、LKB1 を強制発現するためのレンチウィルスを作成し、さらなる追加検証を行っている。SMOC1 の発現レベルの調整には、複数の因子が関与している可能性が高く、複合的な解析が必要と考えられる結果であった。

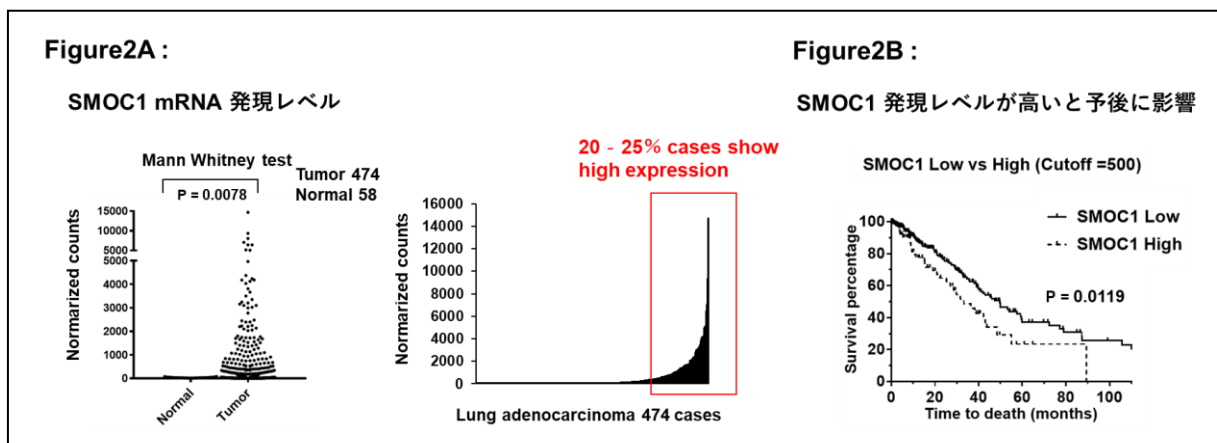
(2) SMOC1 の機能解析：LKB1 の機能喪失変異がある複数の細胞株において、SMOC1 をノックダウンすると癌細胞の増殖が抑制されることを見出した (Figure1A)。また、スクラッチアッセイ及びトランスウェルを持ちいた解析で、SMOC1 が、LKB1 不活化肺癌の移動・浸潤能を促進していることも発見した。SMOC1 が、TGF- β 受容体の構成因子の一つである Endoglin に結合する報告があることから、SMOC1 ノックダウン後に上皮間葉転換への関与についても検討を行ったが、Vimentin (VIM)・Cadherin-1 (CDH1) の発現レベルに有意な変化は認められなかった。

一方で、HUVEC を用いた tube formation assay において、SMOC1 をノックダウンした癌細胞の培養上清中では、有意に血管新生が抑制されるという結果も得た



(Figure1B)。腫瘍細胞から分泌される SMOC1 が、腫瘍血管の形成を促進する働きがあることが推測される結果であった。以上から、LKB1 不活化肺癌における SMOC1 の分泌は、オートクライン及びパラクラインに作用して、腫瘍の進展を促進していると考えられる。

(3) TCGA のデータベースを用いて、肺腺癌 (474 例) と正常肺 (58 例) の SMOC1 の発現レベルを解析した。正常肺と比較し、肺腺癌の 20-25% で SMOC1 は著しく高発現しており、細胞株の解析と同様に SMOC1 の発現は LKB1 と有意に逆相関している結果であった。また、SMOC1 の高発現は、全生存期間における予後不良と有意に相関していた (Figure2A-B)。さらに基本的な臨床情報と LKB1 を含む多変量解析において、SMOC1 の高発現が独立した予後予測因子となることも突き止めた。



4. 考察

以上の解析結果は、LKB1 が不活化した肺癌において、SMOC1 が細胞増殖・移動浸潤能の促進に寄与していると同時にパラクラインとしても機能を持ち、腫瘍微小環境における血管新生にも関与していると考えられる。予後解析では、LKB1 を加えた多変量解析において、SMOC1 が独立した予後予測因子として算出された。以上の解析結果は、LKB1 が不活化した肺癌において、SMOC1 が腫瘍進展のキーファクターになっていることを強く示唆している。一方で、SMOC1 の発現制御には複数の因子が関与しており、さらなる追加解析が必要と考えられた。今後は、本研究結果を基盤に、*in vivo* による解析を加えて、SMOC1 を標的とした新たな治療戦略の構築を目指すことが可能と考えられる。

5. 文献

1. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology

and therapy. *Nat Rev Cancer*. 19(9):495-509. 2019.

2. Çeliktas M *, Tanaka I * (同等貢献筆頭著者) , Tripathi SC, Fahrman JF, Aguilar-Bonavides C, Villalobos P, Delgado O, Dhillon D, Dennison JB, Ostrin EJ, Wang H, Behrens C, Do KA, Gazdar AF, Hanash SM, Taguchi A. Role of CPS1 in Cell Growth, Metabolism and Prognosis in LKB1-Inactivated Lung Adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1;109(3):1-9. 2017.

3. Awwad K1, Hu J1, Shi L1, Mangels N1, Abdel Malik R1, Zippel N1, Fisslthaler B1, Eble JA2, Pfeilschifter J3, Popp R1, Fleming I4. Role of secreted modular calcium-binding protein 1 (SMOC1) in transforming growth factor β signalling and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1;106(2):284-94. 2015.

6. 論文発表

本研究結果は、2021年4月開催の American Association for Cancer Research (AACR) での発表を予定している。また、刊行物に関しては、2020年度の投稿を目指す。