

## HB-EGF 発現調節機構に関与する分子機構の解明

がん治療の標的分子探索チーム（課題番号：117018）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者：宮本新吾 研究員：黒木政秀

### 【研究成果】

#### <背景>

ヘパリン結合性上皮系増殖因子様増殖因子（Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, HB-EGF）は、既に固形腫瘍の治療標的となっている上皮系増殖因子受容体（ErbB）ファミリーのリガンドである。当科ではこれまでに、HB-EGF が卵巣癌、乳癌、胃癌の新たな治療的分子であることを報告してきた。また、HB-EGF の選択的阻害薬である cross reacting material 197（CRM197）は卵巣癌、乳癌、胃癌の増殖を著明に抑制することが分かっている。HB-EGF はジフテリア毒素の受容体であり、ジフテリア毒素の弱毒化タンパク質である CRM197 は毒性が低くかつ HB-EGF と結合することでその増殖能を阻害することができる。HB-EGF は膜型タンパクとして合成され、細胞膜よりプロテアーゼにより切断され増殖因子として遊離するが、CRM197 は HB-EGF の切断を阻害し、また遊離型に結合することでチロシンキナーゼ型受容体である ErbB ファミリーへのシグナル伝達を阻害することができる。文部科学省がんトランスレーショナル・リサーチ事業および橋渡し研究事業の業務の委託を受け、福岡大学病院で CRM197 による「治療不能な進行・再発卵巣癌を対象とした第 I 相臨床試験」を福岡大学病院で医師主導型治験として終了した。現在は五施設での第 II 相臨床試験が進行中である。

当科では既に卵巣癌、乳癌、胃癌における HB-EGF の発現が亢進していることを報告していった。HB-EGF は元来マクロファージが腫瘍壊死因子  $\alpha$ （Tumor necrosis factor- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ ）のシグナルを受けることにより転写が亢進し、炎症反応における重要な遺伝子としてクローニングされ、重要な遺伝子あることが報告されており、その発現は炎症に関連する各種病態や抗癌剤投与により反応性に亢進することで防御因子として働くことが示唆さ

れている。また、当科における患者血清の解析においても、個体ならびに病態や治療の有無により血中濃度に差を認める。このため、HB-EGF の発現機構を解明することは、癌の防御機構を解明することと同義であり、HB-EGF の転写が亢進しやすい遺伝子プロファイルを明らかにすることは、HB-EGF を標的とした癌分子標的治療の感受性診断に重要であり、また新たな標的分子の発見につながる。そこで本研究では、HB-EGF の発現制御に関わる因子または HB-EGF によって制御される因子について検索・同定を行った。

#### <スクリーニング>

スクリーニングは乳癌細胞株である MDA-MB-231 を用いて in vitro モデルを作製し行った。HB-EGF は立体構造を形成する上で必須の分子であることは既に報告があり、細胞株を二次元培養から三次元培養に培養条件を変更することで、HB-EGF の発現が顕著に変化することが分かっている。そこで、Matrigel（Becton Deckinson 社）と免疫不全マウスである NOD/SCID マウスの皮下に細胞株を作製した Xenograft モデルを作製し、発現アレイにより網羅的な mRNA の発現を、Comparative genomic hybridization（CGH）アレイで DNA コピー数に変動している遺伝子を探索した。発現アレイにより血管新生に関わる遺伝子が三次元培養下では発現が亢進することが、CGH アレイより三つの核内タンパク質のコピー数が増加していることが分かった。

#### < HB-EGF の血管新生に関わる遺伝子の制御 >

発現アレイの結果から、三次元培養条件で 7 倍以上発現が亢進した 11 遺伝子のうち、血管新生に関わる血管内皮細胞増殖因子 A（vascular endothelial growth factor A、VEGFA）とアンジオポエチン様タンパク 4（Angiopoietin-

like 4, ANGPTL4) 遺伝子を同定した。これらは血管新生を促進する因子であり、血管新生のマスター遺伝子である VEGF 受容体は既に確立された固形腫瘍の治療標的分子である。そこで VEGF のリガンドである VEGFA と今回アレイにより候補として挙げられた ANGPTL-4、この他に血管新生に寄与する Angiogenin (ANG) の発現解析を行った。real-time polymerase chain reaction (PCR) 法および Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法により、MDA-MB-231 細胞の三次元培養条件では細胞内および上清中の VEGFA、ANGPTL-4 の mRNA 発現およびタンパク質濃度が亢進していることを確認した。そこで small interference RNA (siRNA) 法により、HB-EGF、VEGFA、ANGPTL4、ANG に加え、これらの血管新生因子の転写を制御する HIF1- $\alpha$  を抑制し、それぞれの発現解析を行った。その結果、HB-EGF を抑制すると VEGFA、ANGPTL-4、ANG、HIF1- $\alpha$  の発現が低下し、HIF1- $\alpha$  を抑制すると VEGFA、ANGPTL-4、ANG の発現が低下したが、VEGFA、ANGPTL-4 および ANG の抑制ではそれら自身以外の遺伝子発現の抑制はなかった。また、VEGFA、ANGPTL-4 の発現を制御するもう一つのこれらの結果からこの遺伝子の転写を制御するもう一つの遺伝子である NF- $\kappa$ B のインヒビターを用いると、VEGFA、ANGPTL-4 の発現は低下するものの、HB-EGF の発現には変化がなかった。これらの結果から、HB-EGF は VEGFA、ANGPTL-4 および ANG の発現を制御する、より上流のシグナル伝達分子であることが示唆された。

次にこれらの因子が癌の造腫瘍能や血管新生にどのように寄与するかを検討した。HB-EGF、VEGFA、ANGPTL-4 の short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを作製し、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入により発現させた。薬剤選択を行った後、限外希釈による単クローン化を行い、発現が抑制されていることを確認できたクローンを以下の検討に用いた。これらの細胞株を NOD/SCID マウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた xenograft モデルでの検討では、コントロールと比較し、shVEGFA および shANGPTL-4 細胞株では増腫瘍能が抑制され、これらと比較しても shHB-EGF 細胞株ではより増腫瘍能が抑制されていることが分かった。この shHB-EGF 細胞で形成させた腫瘍における各遺伝子の発現を蛍光免疫染色法で解析すると、VEGFA、ANGPTL-4 の発現も低下していた。さらに、血管新生への寄与を直接評価するために、ヒト臍帯静脈内皮細胞株 (HUVEC 細胞) を用いて管腔形成試験 (tube formation assay) を行った。Recombinant human (rh) HB-EGF、rhVEGFA を上清中に投与すると、コントロールと比較し HUVEC 細胞は管状構造を形成した。これらの結果から、VEGFA や ANGPTL-4 より上流のシグナル分子である HB-EGF はそれ自身が持つ増殖能に加え、血管新生を促すことで増

腫瘍能に関わることが分かった。

最後に臨床検体での解析を行った。九州大学病院で治療が行われた乳癌患者の手術時に得られた組織検体を用いて、HB-EGF と VEGFA および ANGPTL-4 の発現を real-time PCR 法にて測定した。VEGFA および ANGPTL-4 は HB-EGF とそれぞれ正の相関を認めた (スピアマンの順位相関係数、VEGFA、 $r = 0.772$ ; ANGPTL-4、 $r = 0.449$ )。また、予後の検討については VEGFA、ANGPTL-4 ともに発現の高い患者で生存期間が長いことが分かった (Log rank 検定、VEGFA、 $p = 0.014$ ; ANGPTL-4、 $p = 0.043$ )。これらの結果から HB-EGF は血管新生因子の発現を制御し、癌の増殖に寄与することが解明された。

#### <翻訳調節因子による HB-EGF の制御>

先に述べた通り、HB-EGF の発現が亢進している三次元培養条件下でコピー数の変動を来す遺伝子を抽出するために、MDA-MB-231 細胞を用いて、二次元培養と Matrigel 培養と xenograft モデルの CGH アレイによる比較を行った。このうち、三次元培養環境下では exon junction complex Y14 (Y14, RNA binding motif 8A [RBM8A]) ほかに 2 つの核内タンパク質の遺伝子が増幅していることが分かった。Real time PCR 法により RBM8A の発現が三次元培養で増幅していることを確認し、これについて解析を進めた。RBM8A は mago-nashi homolog (MAGOH) や partner of Y14-mago (PYM) と共に exon junction complex を構成するタンパク質であり、mRNA の転写後調節、特に核外輸送から翻訳制御を行っているタンパク質である。線虫などにも存在する保存性の高い遺伝子であるため、種々の遺伝子の転写後発現制御や翻訳調節を担うものと考えられたが、MDA-MB-231 細胞を用いて siRNA 法で Y14、MAGOH、PYM に加え翻訳やスプライシングに関わる Eukaryotic initiation factor 4A-III (EIF4AIII) の発現を抑制し、ELISA 法で上清中の EGF ファミリーの濃度を検討した。驚くべきことに、いずれの siRNA を導入した細胞株でも、HB-EGF の濃度のみが特異的に低下しており、Amphiregulin や Transforming growth factor- $\alpha$  の濃度は変化しないか増加していた。RBM8A はスプライシングに関わる遺伝子であり、mRNA の構造変化について解析した。スプライシングを受けた後の HB-EGF の mRNA が増幅できるプライマーを用いて RBM8A の発現を siRNA 法で抑制した MDA-MB-231 の total RNA を Reverse transcription-PCR 法で増幅した。コントロールと比較し、HB-EGF の全長は増幅されず、より短い DNA フラグメントが増幅された。これらの塩基配列をサブクローニングし、サイクルシーケンス法で確認すると、エキソンスキッピングを起こした HB-EGF の配列であることが分かった。これらの結果から、乳癌細胞株において RBM8A は EGF

ファミリーの中で特異的に HB-EGF の翻訳調節を変化させていることが示唆された。

RBM8A による HB-EGF の発現制御が癌増殖へどのような影響を及ぼすかを検討する為に、shRNA 法により RBM8A を発現抑制させた MDA-MB-231 細胞 (HB-EGF 高発現細胞株) と RBM8A を過剰発現させた BT20 細胞 (HB-EGF 低発現乳癌細胞株) を用いて NOD/SCID マウスにおける造腫瘍能を検討した。その結果、shHB-EGF 細胞では著明に造腫瘍能の低下を来し、shRBM8A 細胞でも、shHB-EGF 細胞ほどではないものの、コントロールと比較し造腫瘍能の低下を認めた。RBM8A の過剰発現細胞株では、HB-EGF 過剰発現細胞ほどではないが、コントロールと比較し有意な造腫瘍能の亢進を認めた。これらの結果から、RBM8A は HB-EGF の発現調節、特に翻訳調節において、寄与し、癌の増殖に寄与する因子であることが示唆された。

生体内で RBM8A を含む exon junction complex がどのような遺伝子の mRNA のプロセシングに寄与しているか、また、実際に HB-EGF を特異的に制御しているかという検討が現在進行中である。また、臨床検体を用いた解析も行う予定である。

#### <血液中 micro RNA の検討>

近年、エクソソームと呼ばれる細胞外輸送機構が注目を集めている。旧来細胞内からのタンパク質や核酸の排泄を担うとされていたエクソソームは、膜表面にレセプターや抗体を持ち、内部には種々のシグナル伝達物質を含むタンパク質や核酸を含んでおり、細胞間情報伝達に寄与することが明らかとなった。このうち micro RNA と呼ばれる 20 塩基前後の non-coding small RNA は RNA であるにもかかわらず、エクソソーム内では非常に安定した構造となっており、即ち安定した状態で血液中に存在する。このため、新たな疾患マーカーとしての有用性が示唆されている。癌においては未だ多くの報告はないが、転移や浸潤における腫瘍細胞の生着や前癌病変の悪性転換に関わっているとされている。そこで、本研究ではマイクロアレイによるスクリーニングを福岡大学病院で行われた HB-EGF の選択的阻害薬である CRM197 を投与した「難治性・再発卵巣癌患者を対象とした第 I 相臨床試験」の患者検体を用いて行い、CRM197 の感受性となり得る血中マーカーを探索することとした。また、初発卵巣癌患者の血清の検討も行い、予後に関わる micro RNA を同定することで新たなマーカーや標的分子を探索することとした。

CRM197 を投与された患者 11 例中、血清を取得できた 10 例で検討を行った。10 例のうち CRM197 を投与することにより血液中の HB-EGF の濃度が低下した患者は 5 例であり、このうち「効果有りまたは不変」と判定された症例が 3 例、「効果なし」と判定された症例が 2

例であった。これらの比較により、5 種類の発現が変動している micro RNA を同定した (miR-574-5p、miR-483-5p、miR-4298、miR-3610、miR-1207-5p)。これらのうち HB-EGF が元来低く、治療前後で変動しない患者で、2 種類の micro RNA が同様に変動していた (miR-483-5p、miR-4298)。また、HB-EGF が低下した 5 例の投与前後の比較で、元々発現が高くかつ CRM197 投与後に発現が減少した micro RNA は 3 種類であった (miR-92a、miR-1281、miR-486-5p)。予後と投与前後の比較で抽出した際の micro RNA 二群間に共通するものはなかった。

一方で初発卵巣癌患者の血清の比較を行った。初回手術後半年以内に再発した予後不良群 6 例と同期間に再発のない 6 例の比較にて、3 種類の micro RNA の発現に差を認めた (miR-1207-5p、miR-630、miR-135a)。これらを別の 98 例の初発卵巣癌患者の血清で real-time PCR 法で解析すると、miR-135a が有意に予後不良群で低下していることが分かった。さらに、子宮筋腫などの正常卵巣患者や良性卵巣腫瘍患者の血清と比較しても、miR-135a は悪性度の高い卵巣癌患者で低下していることが示された。卵巣癌の予後に最も寄与する因子の一つにプラチナ製剤への感受性が挙げられる。このため、細胞株 SK-OV-3 と OVCAR-3 に miR-135a 過剰発現させて、代表的なプラチナ製剤であるシスプラチンを用いた細胞生存試験を行ったところ、miR-135a 過剰発現細胞株ではシスプラチン感受性が亢進した。このことから、悪性の高い癌を持つ担癌患者の血清中では miR-135a の発現が低下しており、予後のマーカーとなる可能性と miR-135a の補充によりプラチナ感受性を変化させることができ、新たな治療戦略の可能性となることが示唆された。

#### <総括と今後の展望>

今回の検討により HB-EGF を制御する遺伝子または HB-EGF により発現制御を受ける遺伝子群を同定した。血管新生を抑制すると癌の増殖を抑制することは既報により多数報告があり、これに基づき抗 VEGFR 抗体を基とした分子標的治療はすでに確立され、臨床において使用されている。今回の検討で、HB-EGF は血管新生を制御する遺伝子群の発現をより上流で制御していることが新たに分かったため、HB-EGF のシグナル伝達を CRM197 で抑制することは、癌の増殖をより効果的に抑制することができると思われる。

また、DNA の構造異常を解析し、得られたデータから RBM8A と exon junction complex を構成する MAGOH、PMY は HB-EGF の発現を特異的にしていることが同定できた。癌において HB-EGF の発現を調節する因子が機能・発現していることは、炎症や抗癌剤暴露により HB-EGF の発現を亢進しやすく、癌の防御機構に関わることが考えられ、発現が亢進した HB-EGF を選択的阻害薬である CRM197 で抑制することは抗癌

剤と CRM197 の感受性を高める結果となると考えられる。今回の検討とは別に、レポーターアッセイを用いた検討により、癌における HB-EGF の転写因子である SP1 や NRF2 などのいくつかの転写因子群も同定しており、癌での HB-EGF 制御遺伝子の発現プロファイルを評価することで、抗癌剤および CRM197 を併用した際の感受性のマーカーとなりうる。SP1 は創傷治癒または受精卵の着床に、NRF2 は低酸素や脂質代謝に関わる遺伝子であることがされており、今回同定したのも含め、HB-EGF に関連する遺伝子群のシグナルカスケードを解明することにより、HB-EGF は卵巣癌、乳癌、胃癌の確かな治療標的分子であるため、新たな治療標的が同定できる。

癌における分子標的治療は、癌の混沌とした性靴学的特性と遺伝子発現制御に挑むものであり、症例の選択は必須であると考えられ、新たな分子標的治療と併せて感受性診断薬を確立していくことが不可欠であると考えている。今回の検討では、HB-EGF の選択的阻害薬である CRM197 の感受性診断薬の確立までには至らなかったものの、候補として挙げられた遺伝子群では実際に癌の予後に関わることを示しており、今後の検討により感受性診断薬の確立を目指していく。

#### 【研究業績】

- Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Shirasu N, Miyamoto S, Kuroki M. Possible therapeutic targets among the molecules involved in the Warburg effect in tumor cells. *Anticancer Res.* 33 (7) :2855-60. 2013.
- Yotsumoto F, Tokunaga E, Oki E, Maehara Y, Yamada H, Nakajima K, Nam SO, Miyata K, Koyanagi M, Doi K, Shirasawa S, Kuroki M, Miyamoto S. Molecular hierarchy of heparin-binding EGF-like growth factor-regulated angiogenesis in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Res.* 11 (5) :506-17. 2013.
- Yotsumoto F, Kuroki M, Miyamoto S. [Biological characteristics of ovarian cancer]. *Nihon Rinsho.* 70 Suppl 4:488-92. Japanese. 2012.
- Kasai N, Kobayashi K, Shioya S, Yoshikawa Y, Yotsumoto F, Miyamoto S, Mekada E, Enokizono J. Soluble heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) detected by newly developed immuno-PCR method is a clear-cut serological biomarker for ovarian cancer. *Am J Transl Res.* 4 (4) :415-21. 2012.
- Miyata K, Yotsumoto F, Nam SO, Kuroki M, Miyamoto S. Regulatory mechanisms of the HB-EGF autocrine loop in inflammation, homeostasis, development and cancer. *Anticancer Res.* 32 (6) :2347-52. 2012.
- Kuroki M, Miyamoto S, Morisaki T, Yotsumoto F, Shirasu N, Taniguchi Y, Soma G. Biological response modifiers used in cancer biotherapy. *Anticancer Res.* 32 (6 & ) :2229-33. 2012.
- Nojiri T, Yoshizato T, Fukami T, Obama H, Yagi H, Yotsumoto F, Miyamoto S. Clinical significance of amphiregulin and epidermal growth factor in colostrum. *Arch Gynecol Obstet.* 286 (3) :643-7. 2012.
- Ishitsuka K, Kunami N, Katsuya H, Nogami R, Ishikawa C, Yotsumoto F, Tanji H, Mori N, Takeshita M, Miyamoto S, Tamura K. Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma: in vitro and in vivo effects of the novel Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Lett.* 317 (2) :218-25. 2012.
- Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, Yotsumoto F, Yoneda T, Hamaoka M, Yagi H, Murakami T, Hori S, Shitara K, Mekada E. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 17 (21) :6733-41. 2011.
- Hikita S, Yotsumoto F, Fukami T, Horiuchi S, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Tsujioka H, Ueda T, Shirota K, Yoshizato T, Maeda K, Ishikawa T, Okuno Y, Kuroki M, Mekada E, Miyamoto S. Assessment of HB-EGF levels in peritoneal fluid and serum of ovarian cancer patients using ELISA. *Anticancer Res.* 31 (7) :2553-9. 2012.
- Kunami N, Yotsumoto F, Ishitsuka K, Fukami T, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Tamura K, Kuroki M, Miyamoto S. Antitumor effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res.* 31 (7) :2483-8. 2012.
- Tsujioka H, Fukami T, Yotsumoto F, Ueda T, Hikita S, Takahashi Y, Kondo H, Kuroki M, Miyamoto S. A possible clinical adaptation of CRM197 in combination with conventional chemotherapeutic agents for ovarian cancer. *Anticancer Res.* 31 (7) :2461-5. 2011.

本研究は福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。(課題番号：117018)