

肺腺癌全エクソン解析により同定された受容体型チロシンキナーゼ KDR 変異体の解析

修了年月 2014 年 3 月

学籍番号 47-116357

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 牧野亮

指導教員 土原一哉 准教授

【キーワード】：肺がん；ゲノム；受容体型チロシンキナーゼ；変異

【序論・背景】

非小細胞肺癌の一種である肺腺癌細胞では、*EGFR*、*MET*の遺伝子重複や *EML4-ALK*転座が起こっていること、*EGFR*、*KRAS*、*ERBB2*、*MET*、*BRAF*などで遺伝子変異が起こっていること、そしてこれらのゲノム異常のほとんどが相互排他的に起こっていることが報告されている。このようなゲノム異常は受容体型チロシンキナーゼ (RTK) や MAPK、AKT の経路に集積しており、細胞増殖の亢進、細胞生存の誘導を通して発癌への関与が示唆されている。一方でこれらの遺伝子変異を持たない患者も肺腺癌患者全体の 1/4 から 1/2 存在し、その発生機構についてはいまだ未解明な部分が多い。

KDR (Kinase insert domain receptor ; VEGFR2) は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の受容体の一つで、主に血管内皮に発現する。腫瘍組織においては、がんの増殖に伴う低酸素状態によってがん細胞から分泌される VEGF 刺激による、腫瘍血管新生において重要な働きをもつ。KDR の肺腺癌細胞での発現は予後不良との相関が示唆されているが、その分子機構までは解明されていない。当研究室において肺腺癌組織 97 症例から抽出したゲノム DNA のエクソン領域を網羅的にシーケンスすることで、肺腺癌組織特異的に起こっている新規遺伝子変異のデータが得られた。本研究の目的は、肺腺癌において新たに見出された変異型 KDR (Fig.1) の機能解析を行い、肺腺癌における KDR の分子メカニズムを解き明かすことである。

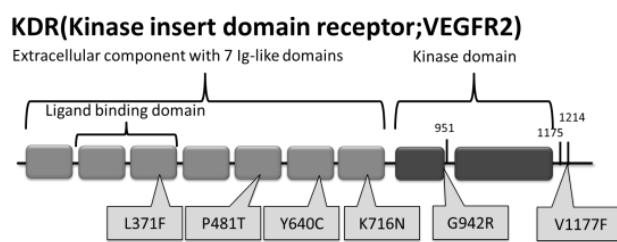


Fig1.肺腺癌97症例で新たに見つかったKDRのSNV

【結果】

1. サンガー法による somatic mutation の検討

次世代シーケンサーによるシーケンス結果をサンガー法によって再確認した。結果、Fig.1 で示したすべての single nucleotide variant (SNV) において、somatic mutation を確認した。

2. 症例検体での免疫染色による KDR 発現検討

KDR 変異が確認された肺腺癌検体 4 症例の組織切片を免疫染色し、肺腺癌細胞での KDR 発現を検討した。4 症例中 Case 060:L371F と Case 048:G942R では発現がみられなかったが、Case 009:V1177F と Case 074:P481T,Y640C,K716N では肺腺癌細胞での発現が認められた (Fig.2)。

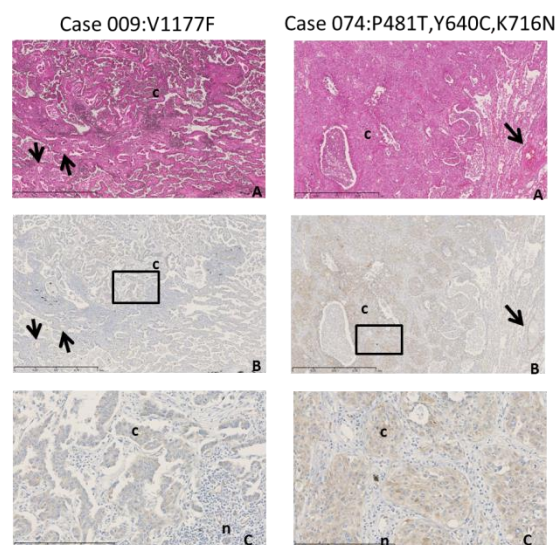


Fig.2 肺腺癌症例検体でのKDR発現
A,H&E、B,KDR (A,B:x50)、C,KDR (x200)
Arrow; vascular endothelium, c; cancerous region, n; non-cancerous region

3. KDR 発現ベクターの作製とウェスタンブロッティングによる自己リン酸化の検討

鈴木・菅野 cDNA ライブラリーより KDR の cDNA クローンである HCR03357 クローンを入手し、レトロウイルスベクター pQCXIP にサブクローニングすることで KDR wild type 発現ベクターとした。サンガー法によって確認できた各新規変異型 KDR を、作製した wild type をもとに mutagenesis し、pQCXIP にサブクローニングすることで各 KDR 発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターを HEK293 細胞にトラン

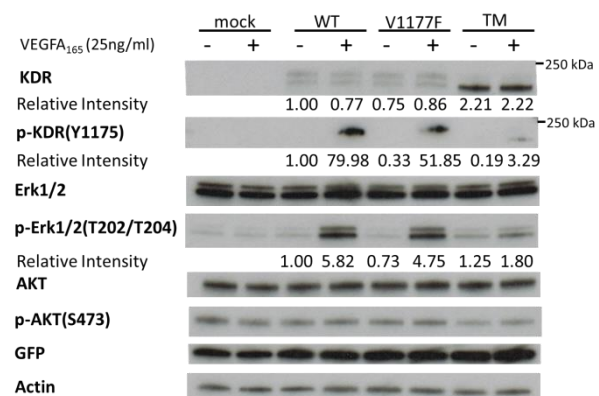


Fig.3 VEGF 刺激による自己リン酸化および下流のシグナルの評価

スフェクションし、ウェスタンブロッティングにて KDR の自己リン酸化および下流シグナルのリン酸化を検討した。VEGF 25 ng/ml、10 分の刺激によって、WT、V1177F 共に KDR の自己リン酸化および下流の ERK のリン酸化が引き起こされていた。また、P481T,Y640C,K716N (Triple Mutant; TM) に関しては、WT に比べて 210kDa の糖鎖修飾中間体 KDR が強く検出され、自己リン酸化および下流のシグナルのリン酸化は WT に比べて低かった (Fig.3)。

4. フローサイトメーターを用いた一過性発現系での細胞増殖アッセイ

各 KDR 発現ベクターと GFP 発現ベクターを HEK293 細胞に共トランスフェクションし、VEGF 25 ng/ml、24 時間刺激した際の GFP 蛍光強度をフローサイトメーターで検出することで、GFP を指標とした細胞増殖アッセイを行った。WT、V1177F 共に VEGF 刺激により細胞増殖が亢進していることが示唆された。また、TM に関しては VEGF 刺激による細胞増殖の亢進は見られなかった (Fig.4)

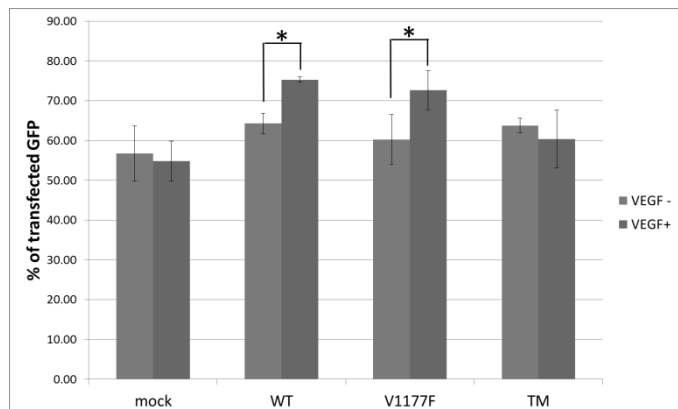


Fig.4 VEGF 刺激による細胞増殖の評価 *p<0.05

【結論】

V1177F 変異体は WT と同等の活性を持ち、肺腺癌細胞で発現していることから、VEGF-KDR パラクリンループによる、細胞増殖の亢進等の影響が示唆された。決定的な driver mutation ではないにしろ、今後、薬剤感受性の評価や、他のリン酸化サイトのリン酸化による細胞遊走能の評価を行うことで新たな治療ターゲットとしての可能性を見出すことができるかもしれない。TM 変異体は検体組織での強い染色強度と、ウェスタンブロッティングによるタンパク発現増加に一定の傾向が認められた。加えて 210kDa の糖鎖修飾中間体が強く検出された。しかし、VEGF に対する応答はなかった。細胞外ドメインに変異があることから、VEGF との結合が弱くなっている可能性があり、糖鎖修飾にも影響を与えていることが示唆された。この細胞外ドメインへの変異により、VEGF 以外のリガンドと結合しシグナルを伝達する可能性がある。加えて、KDR は FLT1 とヘテロダイマーを形成し、PLGF 刺激により自己リン酸化、下流へのシグナル伝達を行う事が報告されている。PLGF、FLT1 共に非小細胞性肺癌での発現も報告があり、今回の症例に関しても、FLT1 発現を確認し、ヘテロダイマーによるシグナル伝達について検討する必要がある。