

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution (P-CREATE)

研究開発課題名：(日本語) 肺腺がんの生存シグナル維持機構に対する革新的分子標的薬の開発
(英語) Development of novel molecular-targeted therapeutics for lung adenocarcinoma

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科 教授 高橋 隆
所属 役職 氏名：(英語) Nagoya University Graduate School of Medicine
Takashi Takahashi, Professor

実施期間：平成28年5月25日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 肺腺癌の生存シグナル維持機構に対する分子標的治療薬の研究開発の統括
開発課題名：と推進
(英語) Direction and development of novel molecular-targeted therapeutics for lung adenocarcinoma

研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科 教授 高橋 隆
所属 役職 氏名：(英語) Nagoya University Graduate School of Medicine
Takashi Takahashi, Professor

分担研究 (日本語) 肺腺癌の生存シグナル維持を担う分子標的の特性解明と特異的阻害剤の研究開発
開発課題名：(英語) Analysis of molecular targets mediating survival signaling in lung adenocarcinoma and development of specific inhibitors

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 准教授 山口 知也
所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University
Tomoya Yamaguchi, Associate Professor

II. 成果の概要（総括研究報告）

ROR1 は、我々が肺腺がんのリネジ生存がん遺伝子 TTF-1 によって転写活性化を受けて、その生存シグナルを伝える肺腺がんにとってのアキレス腱であることを見出した、独自性の高い研究開発シーズである。ROR1 は、キナーゼ活性依存的及び非依存的な分子機序によって、EGFR が伝達する肺腺がんの生存シグナルの維持を司るとともに、キナーゼ活性非依存的にカベオラ構造の安定化を通じて、EGFR、MET、IGF-IR などの様々な受容体型チロシンキナーゼの活性化を維持する。

本研究課題は、次世代がんの技術支援基盤による各種ハイスループットスクリーニング (HTS) で得られた候補ヒット化合物について、細胞増殖阻害活性および、結合分子と下流分子に対する影響の評価を行った。有望な特性を認めた 23 種類の化合物について、十分な量を追加入手し、これまでに我々が構築してきた様々な解析系を用いて proof of concept (POC) の取得を進めた。その結果、ROR1 のカベオラ形成・維持機能に関わる ROR1 と CAV1 の結合に対する阻害活性を持ち、肺がん細胞株の増殖を阻害し得る、既存薬 1 種類を含む 6 種類 (理研) の化合物を同定した。また同様の機能を持つ ROR1 と CAVIN1 の結合阻害活性と肺がん細胞株の増殖阻害活性を有する、既存薬 5 種類を含む 14 種類の化合物および天然物を同定した。

また、肺腺がんの生存シグナル制御に重要な役割を果たす、新たな ROR1 との蛋白質間相互作用を認める新規 ROR1 結合蛋白質を見出し、HTS のためのアッセイ系に用いる精製蛋白質の準備を完了して支援基盤に送付して、アッセイ系の確立と条件検討の開始に結び付けた。また、二次スクリーニング等のために、両者の結合状態を細胞レベルで検出可能なスクリーニング系の構築を新たに開始した。

さらに、細胞膜表面に発現する癌胎児性抗原である ROR1 を分子標的とした抗体医薬の創薬開発を目指して、抗 ROR1 抗体パネルの反応性と特異性の評価を進めた。ROR1 陽性及び陰性のヒト肺がん細胞株、及び、蛍光標識した抗 ROR1 抗体とそのアイソタイプコントロール抗体を用いて、フローサイトメトリー解析によって反応性と特異性を検討した。また、ヒト肺がん細胞株と抗 ROR1 抗体を用いた免疫沈降実験によっても、さらなる特異性の確認を行った。その結果、複数の有望な抗 ROR1 モノクローナル抗体を取得することができた。

The receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) sustains prosurvival signaling directly downstream of the lineage-survival oncogene TTF-1 in lung adenocarcinoma. ROR1 also facilitates the interaction of CAVIN1 and CAV1 at the plasma membrane in a kinase activity-independent manner, which in turn sustains caveolae formation and prosurvival signaling towards AKT through multiple RTKs via its scaffold function for CAVIN1 and CAV1 in lung adenocarcinoma. Novel therapeutic strategies to inhibit the scaffold function of ROR1 and thereby attack the cancer's 'Achilles heel' may prove effective against this devastating cancer.

The aim of this research is to develop the ROR1-specific inhibitor and functional antibody in order to inhibit the ROR1 kinase activity-dependent and/or -independent function in lung cancer. Previously, we performed a high-throughput AlphaScreen assay for discovering small-molecule inhibitors of ROR1 kinase activity or ROR1-CAVIN1/CAV1 protein-protein interaction *in vitro*. In this study, we selected 23 compounds as those that deserve further proof-of-concept (POC) evaluation, and conducted POC studies such as cell proliferation assay, kinase activity assay, and

binding assay using lung adenocarcinoma cells. As a result, we found that 6 compounds have the ability to inhibit cell growth and ROR1-CAV1 interaction. We also found that 14 compounds have an ability to inhibit cell growth and ROR1-CAVIN1 interaction.

In addition, we have identified a new ROR1-interacting protein, which is involved in prosurvival signaling in lung adenocarcinoma. Development and optimization of a high-throughput screening assay based on AlphaScreen technology using each recombinant protein was initiated aiming at discovery of small molecules that can disrupt interactions between ROR1 and the ROR1-interacting protein. We also started establishing a screening system to be used for the secondary screening. To this end, we are currently establishing a cell-based system, which can monitor disruption of binding between ROR1 and the ROR1-interacting protein.

Furthermore, we evaluated a panel of anti-ROR1 monoclonal antibodies to utilize ROR1 as a molecular target for an antibody-based therapeutics by taking advantage of the characteristics of ROR1 as an oncofetal antigen. Flow cytometric analysis and immunoprecipitation assay were conducted to evaluate the anti ROR1 monoclonal antibodies. As a result, we successfully obtained multiple anti-ROR1 monoclonal antibodies with high reactivity and selectivity to lung adenocarcinoma cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 3件）

- 1 Tai MC, Yanagisawa K, Nakatochi M, Hotta N, Hosono Y, Kawaguchi K, Naito M, Taniguchi H, Wakai K, Yokoi K, Takahashi T. Blood-borne miRNA profile-based diagnostic classifier for lung adenocarcinoma. **Sci Rep.** 6: 31389, 2016: doi: 10.1038/srep31389 (2016)
- 2 Liu Z, Yanagisawa K, Griesing S, Iwai M, Kano K, Hotta N, Kajino T, Suzuki M, *Takahashi T. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. **Oncogene** (in press)
- 3 Griesing, S, Kajino T, Tai MC, Liu Z, Nakatochi M, Shimada Y, Suzuki M, *Takahashi T. TTF-1-regulated miR-532-5p targets KRAS and MKL2 oncogenes and induces apoptosis in lung adenocarcinoma cells. **Cancer Sci.** (in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. TTF-1/NKX2-1: An Enigmatic Double-Edged Sword in Lung Adenocarcinoma, 口頭（シンポジウム）, Takahashi T. The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Diseases, 2017/2/17, 国内.
2. Identification of non-coding RNAs modulating MYC activity in human lung cancers, 口頭（シンポジウム） Takahashi T. 第75回日本癌学会総会, 2016/10/6-2016/10/8, 国内

3. ROR1による肺腺癌のリネジ特異的生存シグナル伝達機構の解明、口頭（奨励賞受賞講演）、山口知也、高橋隆、第75回日本癌学会学術総会、2016/10/6～2016/10/8、国内
4. ROR1 functions as a scaffold of cavin-1 and CAV1, sustaining caveolae and RTK-mediated survival signaling in lung cancer、口頭、Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T、第41回内藤コンファレンス、2016/7/5～2016/7/8、国内
5. ROR1による肺腺癌のリネジ生存シグナル伝達とカベオラ形成を標的としたEGFR-TKI耐性の克服、口頭（招請講演）、山口知也、高橋隆、第31回日本肺癌学会ワークショップ、2016/7/2、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. スパコンを使ってゲノムの未開のジャングルから鍵遺伝子を探す、高橋隆、一般向け講演会（人工知能とスーパーコンピュータでがんをチャレンジ）, 2016/12/25, 国内
2. 医学を研究するという事、高橋隆、四日市高校 SGH リーダー授業, 2016/6/18, 国内.

(4) 特許出願

公開対象なし