

令和 4 年 8 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07193

研究課題名(和文)肺発生と肺がんに共通する遺伝子発現モジュール解析と肺がん治療への応用

研究課題名(英文)Analysis of gene module for genomic instability in lung cancer

研究代表者

新美 敦子(Niimi, Atsuko)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50508984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺がんにおける代表的ドライバー遺伝子であるEGFRの変異メカニズムを明らかにする目的でDNA複製・修復因子POLD4と発現相関のある遺伝子群をPOLD4モジュールと定義し、各種解析を行った。POLD4モジュール活性とEGFR変異との間には負の相関関係が存在し、更にPOLD4モジュール活性が低下した患者ではゲノム上にEGFR変異特徴的なdel ins(塩基群の短い欠失と挿入)が増加していることが明らかとなった。また、肺がん由来の培養細胞を用いた解析から、POLD4モジュール活性の低下はDNA修復能の低下をもたらすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFRは肺腺がんの代表的なドライバー遺伝子であり、その変異発生のメカニズムを明らかにすることで肺腺がん発生の機序を解明できる可能性がある。本研究の結果より、POLD4モジュールの概念を取り入れることでEGFR変異特異的な変異が起きやすい核内環境について新たな情報を得ることができた。また、低POLD4モジュール活性細胞ではスプラチン感受性が高いことが明らかとなり、将来的にはPOLD4モジュール活性の測定によりプラチナ製剤の感受性予測が可能となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：POLD4, a factor in DNA replication/repair pathway, is required for the suppression of genomic instability, but the function is largely unknown. We defined POLD4-correlated genes as "POLD4 module" to elucidate the mechanism of EGFR mutation in lung adenocarcinoma. Interestingly, EGFR mutation in patient is negatively correlated with the activity of POLD4 module. RNA-seq datasets analysis showed that EGFR-specific type mutation (del ins: complex mutation with deletion and insertion) are frequently observed in low POLD4 module activity group. By using human lung cancer cell lines, we found that the activity of POLD4 module highly correlated with cancer cell survival against cisplatin, which suggest that POLD4 module has a role in DNA repair.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：EGFR ゲノム不安定化 DNA修復

### 1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子は国内肺腺がん患者の約半数で変異が見られる代表的なドライバー遺伝子であり、肺がんの発生、増殖に深く関与している。一般に、遺伝子変異では1塩基置換や1塩基欠失/挿入といった比較的シンプルな変異が圧倒的に高頻度で検出されるが、EGFR 変異においては、このようなシンプルな変異の他に塩基の欠失と挿入の組み合わせによる複合型変異(delins)が高頻度で観察される。実際に、変異ホットスポットである Exon19 における delins は特徴的 EGFR 変異としてよく知られている (Tian Y, PLoS One, 2018)。しかし、この EGFR 変異に特徴的な delins の発生メカニズムに関してはほとんど明らかになっていなかった。

EGFR 変異を持つ肺がん細胞株では DSB 修復、特に非相同末端結合の効率がしばしば低下している (Amomwichee N, Sci Rep, 2015)。EGFR 変異細胞では EGFR 変異により下流シグナルが変化し DSB 修復活性が低下するとの報告は存在するが (Kriegs M, DNA Repair, 2010) 寄与は僅かであることから、申請者は EGFR 変異が起きた結果として非相同末端結合活性が低下したのではなく、何らかの理由で非相同末端結合を含む DNA 修復活性が低下した結果、ゲノム不安定化が亢進して EGFR 変異に至ったのではないかと仮説を立てた。

近年、一部の非小細胞肺がんにおいて、DNA 複製・修復酵素 DNA ポリメラーゼ 複合体の最小サブユニット POLD4 がゲノム不安定化の抑制に関与している可能性が示唆されている (Huang QM, Cancer Res. 2010)。申請者らはこの論文を参考に、POLD4 及び POLD4 と発現相関のある遺伝子群を POLD4 モジュールと定義して国立がんセンター及び名古屋大学の肺がん臨床検体 mRNA データベースの解析を行ったところ、低モジュール活性患者群において EGFR 変異を有する頻度が高い傾向を見出した。これらの予備実験の結果から、POLD4 モジュールの概念を用いることで EGFR 遺伝子変異に至るゲノム不安定化のメカニズムを明らかにできるのではないかと考え、本研究を提案した。

### 2. 研究の目的

POLD4 モジュールと EGFR 変異特徴的な delins との間に因果関係があるか否かをバイオインフォマティクス手法及び細胞生物学的手法を用いて解析し、肺腺がん発生に関わるメカニズムの一端を解明することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

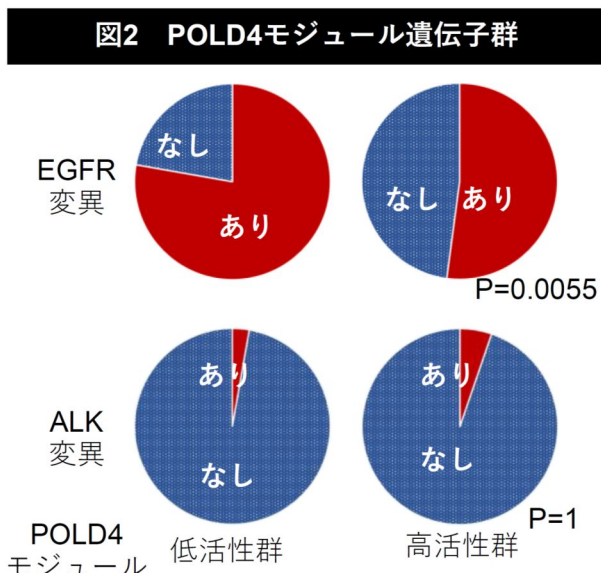
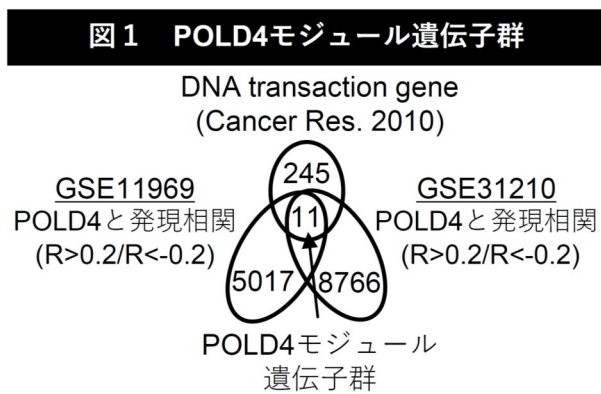
(1) バイオインフォマティクス手法による POLD4 モジュールの構築

(1-1) POLD4 モジュールの構築

GSE11969 (名古屋大学: 肺腺がん 90 症例) の mRNA 発現データセットを用い、POLD4 発現量と正及び負の相関 ( $R > 0.2$  または  $R < -0.2$ ) を持つ遺伝子を選択した。同様に GSE31210 (国立がんセンター: 肺腺がん 226 症例) の mRNA 発現データセットを用い、POLD4 発現量と正及び負の相関 ( $R > 0.2$  または  $R < -0.2$ ) を持つ遺伝子を選択した。両データセットに共通する遺伝子のうち、DNA transaction gene (Huang QM, Cancer Res. 2010) に含まれる遺伝子群を抽出し、POLD4 モジュール遺伝子群と定義した。POLD4 モジュールに含まれる遺伝子の発現量を z-score 化してその総和を POLD4 モジュール活性とし、中央値-標準偏差により高 POLD4 モジュール活性群と低 POLD4 モジュール活性群に分割して各種解析に用いた。

(1-2) TCGA データベースを用いた EGFR 特徴的変異の解析

TCGA-LUAD (230 症例) の mRNA 発現データセットを用い、(1-1) で行った



方法に従って各患者のモジュール活性を算出した。同時に各患者の RNA-seq データに含まれる総変異、欠損変異、挿入変異、フレームシフト変異、複数塩基置換、複雑変異の数を算出した。なお、複数塩基置換は(総塩基置換-1塩基置換)と定義し、複雑変異は(総変異-(1塩基置換+1塩基欠損+1塩基挿入))と定義した。算出した変異数を用い、高 POLD4 モジュール活性群と低 POLD4 モジュール活性群における各種変異の分布を解析した。

## (2) POLD4 及び POLD4 モジュール遺伝子群の細胞生物学的解析

POLD4 モジュールと DNA 修復活性の関連性について解析をする目的で、非小細胞肺癌培養細胞株 9 株を用い、コロニーフォーメーション法にてシスプラチンに対する感受性測定を行った。各細胞を 6 ウェルプレートに播種後、シスプラチンを含む培地にて 24 時間培養し、PBS にて洗浄後に通常培地で 7-14 日間培養してコロニーを形成した。培養後のプレートは染色してコロニー数を調べることで各細胞株のシスプラチン感受性を測定した。また、POLD4 及び POLD4 モジュール遺伝子の発現量は各細胞から抽出した RNA をもとに RT-qPCR を行うことで測定した。

POLD4 と POLD4 モジュール遺伝子群とのタンパク質レベルでの相互作用の確認には免疫沈降-質量分析法を用いた。POLD4 高発現である肺腺がん培養細胞 A549 を用い、抗 POLD4 抗体を用いて免疫沈降後に得られた共沈画分を質量分析により解析した。独立した実験を 3 回試行し、全てにおいてコントロール IgG 画分より 3 倍以上の存在比が確認されたタンパク質を POLD4 相互作用候補因子とし、POLD4 モジュール遺伝子群が含まれているか否かを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) POLD4 モジュールの構築

研究方法(1)に従って POLD4 モジュール遺伝子群を同定した(図1)。POLD4 モジュール遺伝子群は POLD4 以外に 10 遺伝子から成り、そのうち遺伝子オンロジーの生物学的プロセスにおいて DNA\_Repair に含まれる遺伝子が 5 つ、SIGNAL\_TRANSDUCTION\_IN\_RESPONSE\_TO\_DNA\_DAMAGE に含まれる遺伝子が 3 つ存在していた。GSE31210 データセットを用いて患者群を高 POLD4 モジュール活性群及び低 POLD4 モジュール活性群に分けて解析したところ、EGFR 変異患者の分布は低 POLD4 モジュール活性群に統計的に有意に増加していることが示された。また、比較のため ALK 変異患者についても同様に解析したところ、こちらでは有意な差は見られなかった(図2)。更に、GSE11969 データセットを用いて同様の解析を行ったところ、やはり EGFR 変異を持つ患者は低 POLD4 モジュール活性群に優位に増加していることが確認された。2つの独立したデータセットを用いた解析で得られた結果から、POLD4 モジュール活性の低下と EGFR 変異との間に何らかの相関関係が存在している可能性が強く示唆された。また、POLD4 発現量のみを指標として同様の解析を行った場合は EGFR 変異患者は低 POLD4 発現群に有意に増加していなかった。この結果から、POLD4 遺伝子単独ではなく POLD4 モジュール遺伝子群としての機能に焦点を当てることで、EGFR 変異発生をもたらすゲノム不安定化メカニズムを明らかにできるのではないかと推測された。

図3 総変異数分布図

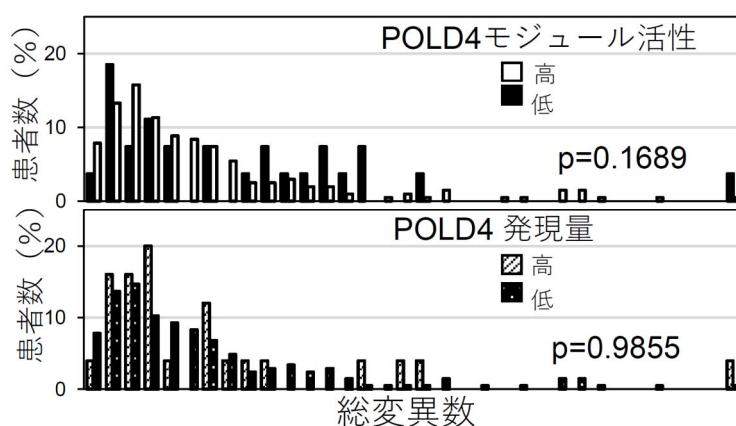
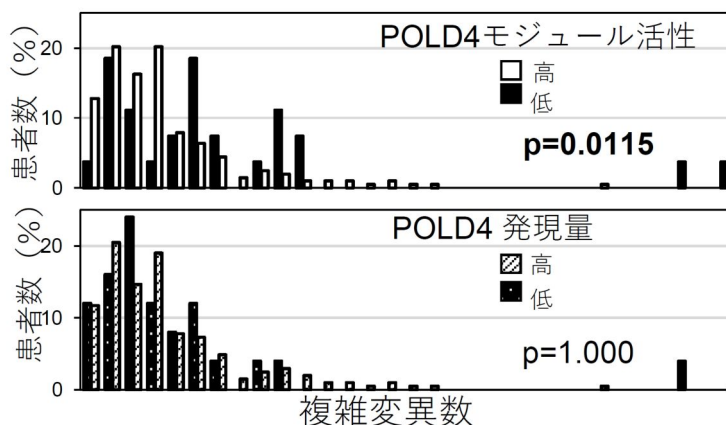


図4 複雑変異数分布図



この結果から、POLD4 遺伝子単独ではなく POLD4 モジュール遺伝子群としての機能に焦点を当てることで、EGFR 変異発生をもたらすゲノム不安定化メカニズムを明らかにできるのではないかと推測された。

## (2) TCGA データベースを用いた EGFR 特徴的変異の解析

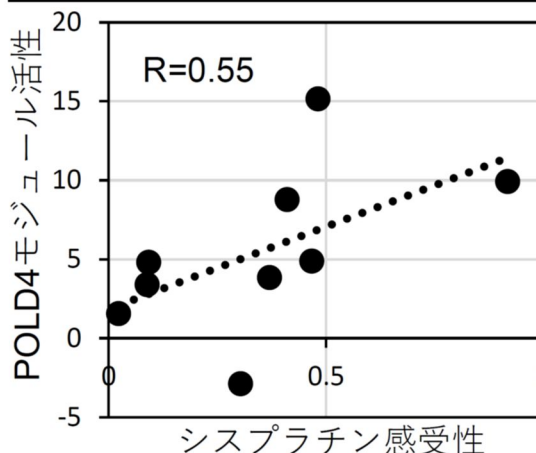
申請者の仮説が正しければ、POLD4 モジュール活性が低い患者では EGFR 遺伝子以外のゲノム DNA 上にも EGFR 変異特徴的な delins が高頻度で見られると予想される。そこで TCGA-LUAD のデータセットを用いて POLD4 モジュール活性の高低により変異の種類に差が見られるかを解析した。TCGA-LUAD には全ゲノムシークエンスの結果は含まれていなかったため、各変異タイプ数の検出には RNA-seq データを用いた。また、RNA-seq データには delins の情報は含まれていなかったため、複数塩基置換及び複雑変異を EGFR 変異特徴的な delins の一形態と仮に定義した。高 POLD4 モジュール活性群及び低 POLD4 モジュール活性群で比較したところ、総変異、欠損変異、挿入変異、フレームシフト変異においては統計的に有意な差は得られなかった。一方で、複数塩基置換及び複雑変異については低 POLD4 モジュール活性群にて有意に増加していることが明らかとなった。また、高 POLD4 発現群及び低 POLD4 発現群にて同様の解析をした場合ではこのような統計的に有意な差はいずれの変異においても得ることはできなかった。代表例として総変異分布図(図3)及び複雑変異分布図(図4)の結果を載せる。これらの結果から、POLD4 モジュール活性が低い患者群では、何らかの理由によりゲノム DNA 上に delins がおきやすい環境となっている可能性が示唆された。

## (3) POLD4 モジュールの細胞生物学的解析

肺がん由来の培養細胞を用いてシスプラチンに対する感受性を測定した結果、POLD4 モジュール活性が低い細胞ではシスプラチン感受性が高いことが明らかとなった(図5)。このことから、POLD4 モジュール活性が低い肺がん細胞ではシスプラチンが誘導する DNA 損傷を修復する能力が低下していると考えられた。この DNA 修復能の低下をもたらすメカニズムについて解析するため、POLD4 と POLD4 モジュール遺伝子産物の間にタンパク質レベルでの相互作用があるか否かを免疫沈降-質量分析法により解析した。質量分析では、既に POLD4 との相互作用が報告されている pol 複合体のサブユニット POLD1、POLD2、POLD3 が特に高頻度で検出されたことから、実験の妥当性が確認された。しかしながら、モジュール遺伝子産物やそれらと複合体を形成している可能性が高いタンパク質は相互作用候補因子として検出されず、POLD4 モジュール遺伝子群はタンパク質レベルでは POLD4 と相互作用していない可能性が強く示唆された。一方で、今回の実験から少なくとも 10 種類のタンパク質が POLD4 相互作用候補因子として同定された。これら相互作用候補因子に関しては、これまで報告のない新規のものであり、DNA 複製関連因子及び DNA 修復因子が大半であったことから、POLD4 の DNA 損傷応答に関わる機能解明に向けて興味深い結果となった。また、A549 細胞を用いて siCtrl 及び siPOLD4 細胞における POLD4 モジュール遺伝子群の発現量を RT-qPCR にて解析したところ、モジュール遺伝子群の転写レベルは POLD4 ノックダウンによる影響を受けておらず、POLD4 モジュール遺伝子群の発現は POLD4 発現量に依存していないことが明らかとなった。

本研究により、POLD4 モジュール活性の低下は DNA 修復能の低下を導くため、ゲノム DNA 上に特徴的な delins が高頻度で引き起こし、これが EGFR 遺伝子の変異を介して肺がん発生の一因となっている可能性が確認された。一方で、POLD4 は POLD4 モジュール遺伝子産物と直接的に相互作用しておらず、その転写調節にも関与していないことから、POLD4 モジュール活性の低下が具体的にどのように DNA 修復能の低下につながるのか、機能的な関連性について更なる研究が求められる結果となった。

図5 POLD4モジュール活性とシスプラチン感受性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shi H, Niimi A, Takeuchi T, Shioyama K, Mizutani Y, Kajino T, Inada K, Hase T, Hatta T, Shibata H, Fukui T, Chen-Yoshikawa TF, Nagano K, Murate T, Kawamoto Y, Tomida S, Takahashi T, Suzuki M	4. 巻 112
2. 論文標題 CEBP facilitates lamellipodia formation and cancer cell migration through CERS6 upregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2770-2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki M, Cao K, Kato S, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Nakatani N, Yanagisawa K, Takeuchi T, Shi H, Mizutani Y, Niimi A, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Kyogashima M, Tomida S, Takahashi T	4. 巻 24
2. 論文標題 CERS6 required for cell migration and metastasis in lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med	6. 最初と最後の頁 11949-11959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.15817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新美敦子、水谷泰嘉、竹内俊幸、鈴木元
2. 発表標題 A suppressor role of POLD4, the smallest subunit of DNA polymerase complex, in lung cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石含笑、新美敦子、竹内俊幸、水谷泰嘉、塩竈和也、稲田健一、長谷哲成、長谷川好規、高橋隆、鈴木元
2. 発表標題 CEBP and YBX1 regulate lung cancer metastasis via CERS6 expression and lamellipodia formation
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新美敦子、岩瀬咲良、竹内俊幸、水谷泰嘉、鈴木元
2. 発表標題 DNAポリメラーゼ 複合体サブユニットPOLD4の肺がん発生における役割解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石含笑、竹内俊幸、新美敦子、水谷泰嘉、村手隆、高橋隆、鈴木元
2. 発表標題 A metastasis protein CERS6 is transcriptionally regulated by miR-101 and YB-1
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新美敦子、水谷泰嘉、竹内俊幸、鈴木元
2. 発表標題 POLD4 pathway is required for repair of CDDP-induced DNA damage
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.fujita-hu.ac.jp/faculty/medicine/departmen/molecular_oncology.html">https://www.fujita-hu.ac.jp/faculty/medicine/departmen/molecular_oncology.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	梶野 泰祐  (Kajino Taisuke)  (50723673)	愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR分野・主任研究員    (83901)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	鈴木 元  (Suzuki Motoshi)  (80236017)	藤田医科大学・医学部・教授    (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関