

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19578

研究課題名（和文）変異型p53誘導性上皮間葉転換を起こした肺癌のシグナル経路の解明及び治療法の確立

研究課題名（英文）The elucidation of key signaling pathways and the establishment of treatment strategies for mutant p53-induced epithelio-mesenchymal transition in lung cancer

研究代表者

伊達 洋至（Date, Hiroshi）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60252962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌細胞株に野生型及び変異型p53を導入し、安定発現細胞株を作成した。野生型p53細胞株は、上皮型マーカーを発現していたが、変異型p53発現細胞株でのみ間葉型へのEMT変化が起こり、浸潤能の亢進や薬剤耐性化がみられた。これらの変化はスタチン投与により抑制され、間葉型から上皮型への回復、浸潤能や耐性化の抑制がみられた。

臨床検体を用いた研究では、肺腺癌完全切除例239例を用いた解析を行った。p53遺伝子変異の有無による層別化を行い、p53変異群において、EMT亢進及び予後不良がみられたが、さらにp53変異群のスタチン内服の有無によるサブグループ解析では、スタチン内服群で予後良好であった

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、浸潤転移能を直接標的とする治療法はまだない。本研究の学術的意義は、変異型p53という肺癌の50%を占める腫瘍特異的な変化による浸潤転移能に関するEMTを標的としている点である。スタチンという既存薬によるEMTの回復が可能であり、臨床応用へのハードルも低い。また分子標的薬使用中のEMTによる薬剤耐性化が問題となっているが、これを克服することで、既存の分子標的治療薬との相乗効果も考えられる。結果、術後再発予防や、遠隔転移症例に対する局所療法への適応拡大など様々な点で、既存治療法に加えて新たな癌治療戦略を採ることが可能となり、癌治療のパラダイムシフトにつながりうる。

研究成果の概要（英文）：Stable expression cell lines were generated by transfection of wild-type and mutant p53 into lung cancer cell lines. Wild-type p53 cell lines expressed epithelial markers, but only mutant p53-expressing lines showed EMT changes to the mesenchymal type, showing increased invasive capacity and drug resistance. These changes were attenuated by statin administration, with recovery from mesenchymal to epithelial form.

In a study using clinical specimens, 239 completely resected cases of lung adenocarcinoma were analyzed. All cases were stratified by p53 mutation status, and p53-mutant group showed enhanced EMT activity and poor prognosis. Furthermore, a subgroup analysis of the p53 mutant group with and without statins showed a better prognosis in the statin-treated group.

研究分野：肺癌

キーワード：p53 肺癌 上皮間葉転換（EMT） EGFR スタチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EMT による肺癌浸潤転移能活性化および予後悪化

癌の転移機序の中でも非常に重要なのが、EMT である。EMT は E-cadherin 消失および Vimentin 発現亢進が特徴であり、その活性化は段階的ともいわれている(null partial full)。我々は、これまでに、肺腺癌手術例において、この EMT メカニズムが活性化すると、その活性化レベルに応じてリンパ節転移頻度が高くなることや、再発までの期間およびその予後が悪化するかなどを明らかにしてきた。

p53 遺伝子変異を有する肺癌における EMT と浸潤能亢進

近年、腫瘍で高頻度に起こる p53 遺伝子変異は、正常細胞の癌化に関わるだけでなく、EMT を起こして、その浸潤転移能を亢進させることが報告されている。我々は肺癌切除検体 282 例を対象に、EGFR や p53 と EMT 活性化レベルの情報を統合解析することで、p53 遺伝子変異と EMT 活性化との相関は、変異型 EGFR でより顕著となっており、予後に与える影響として、driver mutation の有無によって相違がある事がわかった(未発表)。実際、臨床的には、同一の EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌であっても、浸潤転移のないスリガラス像を主体とした腺癌から aggressive に転移を来す腫瘍まで幅広い臨床像を取ることがよく知られており、EMT がその特性に関わっている可能性が高い。

変異型 p53 導入による EMT と薬剤による回復

また、EGFR 変異を有する肺癌細胞株に変異型 p53 を発現させることで、EMT(E-cadherin 消失および Vimentin 発現亢進)が誘導され、Statin により、その表現型が回復することが分かった

2. 研究の目的

本研究は、臨床および過去の基盤研究から得た知見に基づいた、肺癌における変異型 p53 誘導性 EMT 活性化メカニズムの解明とその治療応用可能性の確立を目的とする。具体的には、以下を目的とした。

- ・肺癌における、p53 遺伝子変異により誘導される EMT に基づく浸潤転移能および薬剤耐性メカニズムの解明および同分子の臨床的意義の検討
- ・トランスジェニックマウスを用いた p53 遺伝子変異発現と EMT による腫瘍悪性化、さらに driver mutation との相互作用およびシグナル経路の解明
- ・変異型 p53 誘導性 EMT の経路を標的とした治療法の確立

3. 研究の方法

<1>肺癌における、p53 遺伝子変異により誘導される EMT に起こるシグナル解析

肺癌細胞株において、p53 遺伝子変異の有無を確認すると共に、lentivirus transfection により外因性 p53 を導入する。EMT 活性化の有無が野生型および変異型 p53 の違いにより起こりうるかどうか検討する。我々は、現在、H1650 細胞株および A549 細胞株に野生型 p53 と Gain of function 型 p53 を外因性に導入することで、E-cadherin 発現低下と Vimentin 発現亢進を確認している。

さらに、変異型 p53 依存的に様々な癌種で予後不良因子である **LDL-receptor Related Protein 1** および受容体のリサイクリングに関わる **Rab-Coupling Protein** が増加することを確認しており、関連したシグナル経路の解析を siRNA、WB などの手法を用いて行う。またシグナル経路分子発現の臨床的意義を、臨床切除検体を用いた免疫染色、遺伝子発現解析により検討する。

<2>in vitro および in vivo 浸潤転移能の解析

EMT 活性化による浸潤転移能の変化を確認する。具体的には、in vitro では、**matrigel invasion assay** により、in vivo では EMT が恒常的活性化した腫瘍細胞を用いた **orthotopic model** により浸潤転移能の変化を解析する。またその際に、浸潤転移能だけではなく、mouse 内で形成する腫瘍の組織型についても解析する。EMT を起こすことで、どのような組織型の変化が起こるのか、また構成する細胞群についても変化があるのかどうかを、免疫染色および FACS により解析する。

<3>肺特異的 p53 遺伝子変異トランスジェニックマウスを用いた腫瘍悪性化機序と driver

mutation の相互作用の解明

Cre Recombinase による肺組織特異的遺伝子組み換えと GFP lineage trace 技術を使用する。**変異型 p53 マウスと変異型 EGFR マウスを交配**し、変異型 p53 を持たない変異型 EGFR マウスと共に、転移の出現状況などを評価、原発巣(肺病変)と転移巣との比較検討を行う。

<4>臨床応用を目的とした EMT 阻害による浸潤転移能や治療抵抗性変化の解析

変異型 p53 によって EMT 活性化が起こり、治療抵抗性や浸潤転移能の獲得が明らかとなった際には、同分子およびその下流シグナルを標的とした治療薬剤の検討を行う。具体的には、変異型 p53 の安定化に寄与する**メバロン酸経路阻害剤である Statin や Hsp90 阻害剤**などの投与により、EMT 活性化によってもたらされた表現型の消失を確認する。また薬剤耐性化克服の可能性についても解析する。in vivo では、治療介入を行い、腫瘍縮小、転移能低下や生存期間に与える影響を検討する。

4. 研究成果

変異型 p53 を導入した肺癌細胞株に上皮間葉転換 (EMT) が起こることや、スタチンによるこれらの phenotype の変化を抑制可能であることが実験的に確かめることが出来た。また臨床的にも変異型 p53 の有無により、スタチンの効果に違いがあることを確認し、これらの内容を論文として発表することができた。

まず肺癌細胞株に野生型及び変異型 p53 を発現する lentivirus を導入し、FACS による sorting を行って、安定発現細胞株を作成した。これらの継代により、オリジナルは上皮型マーカーを発現していた細胞株から間葉型への変化が起こることが確認できた。また細胞形態も紡錘形へとなり、phenotype の変化としても浸潤能の亢進や薬剤耐性化がみられた。これらのマーカーや phenotype の変化はスタチン投与により抑制され、間葉型から上皮型への回復、浸潤能や耐性化の抑制がみられた。変異型及び野生型 p53 導入株の比較検討において LRP1 や RCP の発現増加がみられたが、これらの分子の silencing によっても EMT の明らかな改善はみられず、主要な経路との判断は困難であった。

さらに臨床検体を用いた研究では、我々がこれまでに作成した肺腺癌完全切除例 239 例を用いた TissueMicroarray を使用して、p53 遺伝子変異の有無による層別化を行い、EMT マーカー発現や、そしてスタチン内服の有無による術後生存に対する影響を確認した。p53 遺伝子変異グループにおいては、スタチン内服群は予後良好であったが、野生型 p53 グループでのスタチン内服には、それらの効果がみられなかった。これらの結果を論文化し、報告した (Nishikawa et al, Cancer Manag Res, 2019)。

引き続き in vivo での実験として、SPC-Cre に p53LSL-R172H を交配させたマウスに、肺癌物質であるウレタンを投与して、肺特異的な変異型 p53 を有する肺癌モデルを作成した。その結果、変異型 p53 を有するモデルにおいて、一部で肝転移が認められた。さらにスタチンをマウスに投与することで肝転移がみられなくなった。

また変異型 p53 を導入した肺癌細胞株に上皮間葉転換 (EMT) が起こることや、スタチンによるこれらの phenotype の変化を様々な p53 変異においても同様の事象が起こるか検討した。R175H、R273H 以外の HOTSPOOT 変異 4 種類について、lentivirus vector での作成および H1650 への transfection を行い、安定発現細胞株を作成した。

さらに EMT に対する阻害剤の検討も行った。既報により、肺癌細胞株に対する TGF 刺激により、EMT が起こることが知られているが、同 EMT を Tranilast が抑制することを示した。Tranilast は臨床で既にケロイドに対する治療薬として使用している薬剤である

が、TGF 刺激により E-cadherin が消失し、vimentin 発現が増加し、形態的にも紡錘形となり EMT を起こしていた。その状態で Tranilast 投与を 48 時間行ったところ、E-cadherin 発現、vimentin 抑制され、EMT が改善されたと考えられた。Tranilast により Smad4 が抑制されることで EMT が改善していることが確認された。この結果を現在、論文投稿中である。

そして EMT を標的とした薬剤スクリーニングを行うための系を確立した。E-cadherin と vimentin の promoter の下流に、luciferase を挿入した vector を肺癌細胞株に導入し、reporter assay を行うことが可能となった。肺癌細胞株に TGF を添加して、EMT を起こし、24 時間後から候補薬剤を投与することで、E-cadherin 発現の上昇、vimentin 発現の低下を起こす薬剤をスクリーニングできる。現在、TGF 受容体阻害剤などでこの系が有効に働くことを確認している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shigeto Nishikawa, Toshi Menju, Koji Takahashi, Ryo Miyata, Toyofumi Fengshi Chen-Yoshikawa, Makoto Sonobe, Akihiko Yoshizawa, Hisataka Sabe, Tosiya Sato, Hiroshi Date	4. 巻 11
2. 論文標題 Statins may have double-edged effects in patients with lung adenocarcinoma after lung resection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Management and Research	6. 最初と最後の頁 3419-3432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/CMAR.S200819.	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 Muranishi, Y., T. Sato, S. Ito, J. Satoh, A. Yoshizawa, S. Tamari, Y. Ueda, Y. Yutaka, T. Menju, T. Nakamura and H. Date	4. 巻 1
2. 論文標題 The Ratios of monounsaturated to saturated phosphatidylcholines in lung adenocarcinoma microenvironment analyzed by Liquid Chromatography-Mass spectrometry and imaging Mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8916-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45506-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishikawa, S., T. Menju, K. Takahashi, R. Miyata, M. Sonobe, A. Yoshizawa and H. Date	4. 巻 5
2. 論文標題 Prognostic Significance of Phosphorylated Fyn in Patients with Lung Adenocarcinoma after Lung Resection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Thoracic Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 246-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5761/atcs.oa.19-00078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Neri, S., T. Menju, T. Sowa, Y. Yutaka, D. Nakajima, M. Hamaji, A. Ohsumi, T. F. Chen-Yoshikawa, T. Sato, M. Sonobe, A. Yoshizawa, H. Haga and H. Date	4. 巻 128
2. 論文標題 Prognostic impact of microscopic vessel invasion and visceral pleural invasion and their correlations with epithelial-mesenchymal transition, cancer stemness, and treatment failure in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 13-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S.Nishikawa, T.Menju, T.Sowa, K.Takahashi, R.Miyata, H.Ishikawa, D.Nakajima, M.Hamaji, H.Motoyama, A.Aoyama, T.sato, F.Chen-Yoshikawa, M.Sonobe, H.Date
2. 発表標題 Suppression of mutant-p53-induced EMT by statins have double-edged effects on the patients with lung adenocarcinoma according to p53 mutation status
3. 学会等名 American Association for Cancer Research, Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛受暁史、西川滋人、曾和晃正 2、千葉直久、宮本英明、玉里滋幸、野口未紗、石川浩之、宮田亮、伊達洋至
2. 発表標題 上皮間葉転換を標的とした肺癌新規治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会、
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 毛受暁史、西川滋人、曾和晃正、玉里滋幸、野口未紗、石川浩之、宮田亮、田中里奈、山田義人、豊洋次郎、中島大輔、大角明宏、濱路政嗣、佐藤寿彦、陳豊史、伊達洋至
2. 発表標題 上皮間葉転換を標的とした肺癌新規治療法の開発
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会、シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	園部 誠 (Sonobe Makoto) (00432378)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	毛受 暁史 (Menju Toshi) (30527081)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	