

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590324

研究課題名(和文) 肺癌の高転移性・高悪性度に関与するエピジェネティックな異常の解析

研究課題名(英文) Investigation of epigenetic abnormalities involved in lung cancer progression.

研究代表者

長田 啓隆 (OSADA HIROTAKA)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・室長

研究者番号：30204176

研究成果の概要(和文)：高転移性・高悪性度肺癌である神経内分泌肺癌に注目し、神経内分泌分化を誘導する因子 ASH1 のシグナルとエピジェネティック異常との関連を検討した。その結果 ASH1 で制御され、エピジェネティックな異常も持つ新規の癌抑制遺伝子候補を見出した。また、ASH1 で制御される microRNA も見出し、プロモーター構造及びエピジェネティックな制御を解明した。ASH1 の発現誘導システムも構築した。

研究成果の概要(英文)：Lung cancers with neuroendocrine features are usually highly metastatic and aggressive. We investigated the relationship between ASH1 signaling and epigenetic abnormalities in lung cancers, because neuroendocrine features are induced by ASH1. Our findings revealed a novel tumor suppressor candidate gene, which is suppressed by ASH1 signaling and epigenetic abnormalities. We also found ASH1-upregulated miRNA and characterized the epigenetic status of its promoter region. Finally, a tetracycline-inducible ASH1 expression system was established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

肺癌のジェネティック異常やエピジェネティック異常は、それまでの癌の発症進展過程で蓄積された情報であり、その癌が発症・進展・悪性化と進行していく分子機序そのものであり、この情報を網羅的に確実に解析できれば、癌の分子病態の解明だけでなく予後診断や薬剤感受性診断等テーラーメイド医療のための重要な情報となる可能性が高い。

我々はこれまで、肺癌における DNA メチル化異常やヒストン修飾異常を検討し、肺癌発症におけるエピジェネティック異常の重要性を報告してきた (Osada et al. Cancer Res 2001; Osada et al. Oncogene 2002)。更に、エピジェネティック異常の蓄積は、最初にヒストン脱アセチル化が起こり、次にヒストンメチル化修飾が変化し、更に DNA メチル化の

蓄積へと段階的に進行し、その進行の度合いが遺伝子発現低下の強さと相関していることを報告した (Osada et al. Mol. Carcinog, 2005)。

このような研究経緯から、エピジェネティック異常を肺癌の分子病態の重要な側面として捉え、このような肺癌の発症・悪性化にかかわるエピジェネティック異常の全貌解明のために、エピジェネティック異常を引き起こす分子機序や、そのエピジェネティック異常の標的となっている遺伝子群を解明することを研究の全体的構想にした。

2. 研究の目的

本研究は、代表的難治癌である肺癌の高転移性・高悪性度獲得に係る分子機序を、エピジェネティック異常を中心に解明していくことを目的としている。特に神経内分泌分化は小細胞肺癌や一部の大細胞肺癌に見られ、これら神経内分泌肺癌は、高転移性・高悪性度であることが知られている。したがって本研究では特に高転移性・高悪性度肺癌である神経内分泌肺癌を中心に検討した。

我々は以前に神経内分泌分化を誘導するASH1がヒストンのアセチル化や特殊なメチル化を制御することを見出しているため、肺癌においてエピジェネティック異常を引き起こす重要な分子機序としてASH1シグナルに注目した。そしてASH1シグナルの全貌解明と、ASH1シグナルが引き起こす神経内分泌分化に伴うエピジェネティック異常の標的となっている遺伝子群の解明を本研究の目的とした。

具体的には研究期間内に以下の点を明らかにすることを目指した。

(1) ASH1下流シグナルのエピジェネティック異常の検討：

神経内分泌分化異常に伴うエピジェネティック異常の蓄積機構の解明を目指し、神経内分泌分化を誘導するASH1の下流シグナルを、microarray解析等を用いて網羅的に詳細に解明する。見出したASH1下流シグナル分子群の中で、エピジェネティック異常の標的となる遺伝子群を検索解明する。

(2) ASH1下流で作用するmiRNAの検討：

現在miRNAも遺伝子発現制御に関わる重要なシグナル分子であることが判明しているが、プロモーター構造等不明な点が多く、エピジェネティック異常の検討が進んでいない。ASH1の下流シグナルにおいてもmiRNAが重要な役割を果たしている可能性があり、ASH1に制御されるmiRNAを網羅的に検索していく。ASH1に制御されるmiRNAに関して、プロモ-

ーター領域の解析と、その領域におけるエピジェネティックな変化を解明する。

(3) ASH1のテトラサイクリン誘導系の検討：神経内分泌分化に伴うエピジェネティック異常の蓄積機構を解明するために、経時的なエピジェネティックな変化を解析することを最終的目標とし、そのために、ASH1のテトラサイクリン誘導発現系 (Tet-ON) を作成し、ASH1発現をONにした後に、時系列データの取得を目指す。

3. 研究の方法

(1) ASH1下流シグナルのエピジェネティック異常の検討：

ASH1の下流で発現制御を受ける遺伝子群で、癌の発症・悪性化に関与するエピジェネティックな異常の標的遺伝子候補を検索していく。神経内分泌分化を持たない肺腺癌細胞株へASH1を導入して、microarray解析にて網羅的な遺伝子発現プロファイルを得る。その結果を肺癌検体における遺伝子発現プロファイルと比較検討して、ASH1下流シグナルで機能し、肺癌において発現異常のある分子を検索していく。ASH1による誘導されるエピジェネティックな変化の重要な標的と考えられる標的候補遺伝子に関して、肺癌症例・肺癌細胞株におけるDNAメチル化・ヒストン修飾異常をChIP解析・bisulfite解析等を用いて詳細に検討する。また、DNAメチル化酵素阻害剤5-aza-deoxycytidineやHDAC阻害剤によるエピジェネティック異常の除去・発現の回復等も検討する。

また標的候補遺伝子の強制発現誘導、及びノックダウン等を用いて、癌抑制遺伝子としての機能を解明していく。

(2) ASH1下流で作用するmiRNAの検討：

ASH1の下流シグナルとして作用するmiRNAを、miRNA microarrayを用いて網羅的に検討する。miRNAはプロモーター構造等が不明瞭なことが多いので、種間での保存や、転写因子の結合モチーフから、プロモーター構造を予想単離して、機能解析を加える。更にASH1によるエピジェネティックな制御を、ChIP解析・bisulfite解析等で詳細に検討していく。

(3) ASH1のテトラサイクリン誘導系の検討：

迅速に有効な発現誘導を安定的に保つテトラサイクリン誘導系を作成するために、現在得られる種々のテトラサイクリン誘導系を用いて比較検討し、ASH1誘導系の樹立を目指す。

4. 研究成果

(1) ASH1 下流シグナルのエピジェネティック異常の検討:

神経内分泌分化を持たない肺癌細胞株へ ASH1 を導入した遺伝子発現プロファイルを、肺癌検体における発現プロファイルと比較検討した。その検討の結果、ASH1 により発現抑制され、神経内分泌分化肺癌の高悪性度に係る候補遺伝子として新規遺伝子 ADw1 (Lab name) を見出した。ADw1 は肺癌検体及び肺癌細胞株で高頻度に発現低下しており、特に神経内分泌肺癌の代表である小細胞肺癌症例で発現低下傾向が強かった。

ADw1 発現低下の機序を検討したところ、ADw1 発現低下の見られる肺癌細胞で、ADw1 プロモーター領域の DNA メチル化・転写抑制性ヒストン修飾が検出され、エピジェネティックな異常により ADw1 の発現低下が起こっていることが確認された。

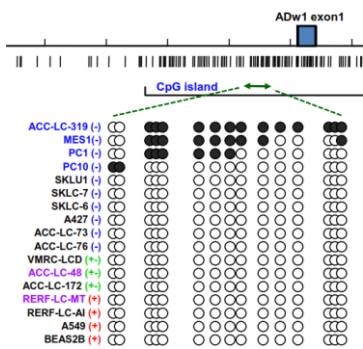


図 1. ADw1 プロモーター領域の DNA メチル化。メチル化 CpG を黒丸で示す。ADw1 発現消失した細胞の一部で異常 DNA メチル化が見られる。

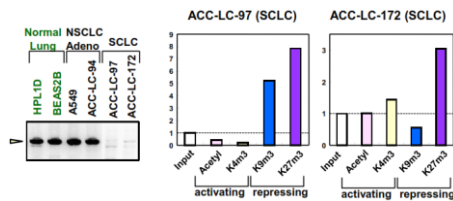


図 2. ADw1 プロモーター領域のヒストン修飾異常。(左)ADw1 の RT-PCR。神経内分泌肺癌である小細胞肺癌で ADw1 発現消失が見られる。(中・右) これら ADw1 発現消失した細胞株では ADw1 プロモーター領域で転写抑制性のヒストン修飾が見られる。

さらにこの ADw1 遺伝子の機能を、ADw1 強制発現系・ADw1 ノックダウン系を用いて検討した。肺癌細胞株に於いて ADw1 を強制発現させると、細胞が多核化・大型化し、その後細胞周期が停止する傾向が見られた。一方、ADw1 ノックダウンにより、細胞が小型化し運

動能が亢進する傾向が見られた。

したがって ADw1 は細胞接着・運動能に関与すると考えられる。我々は以前に ASH1 自身が細胞接着低下を誘導することを見出しているが、ADw1 発現低下が ASH1 下流シグナルの重要な因子であり、肺癌悪性化に関与することが示唆された。

このような機能を示す遺伝子は殆ど例が無く、したがって、ADw1 は細胞接着と細胞周期制御を関連付け、細胞増殖を抑制的に制御するがん抑制遺伝子である可能性が有る。

さらに肺癌症例で、ADw1 発現レベルと予後の関連を検討したところ、full-length の ADw1 isoform (ADw1a) の発現低下が予後不良と有意に相関した (Logrank 解析 $p=0.003$)。

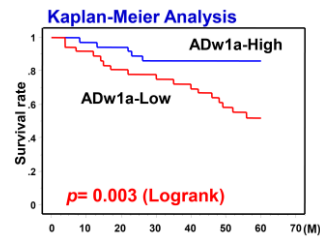


図 3. 肺癌患者の生存率解析。ADw1 発現低下と予後不良との関連が見られる。

以上のような解析から、ADw1 遺伝子は肺癌におけるエピジェネティック異常の標的遺伝子の一つで、癌抑制遺伝子としての機能も持ち、肺癌の発症・悪性化において重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。

(2) ASH1 下流で作用する miRNA の検討:

ASH1 の下流シグナルの解析を更に進め、ASH1 の下流で帰納する miRNA のゲノムワイドな検索を進めた。その結果、ASH1 が 12 個の miRNA を発現誘導・8 個の miRNA を発現抑制と、両方向性の発現制御をすることを見出した。その中で特に miR-375 が 1000 倍以上と非常に強く発現誘導された。この ASH1 による発現誘導機序を検討した。miRNA のプロモーター構造は解明が進んでいないが、我々は miR-375 上流の高度保存領域を単離しレポーターに挿入して、ASH1 の反応領域を検討した。その結果、この保存領域が ASH1 に誘導されるプロモーター活性を持つことが確認され、ASH1 の結合モチーフと考えられる E-box も複数見出された。

次にこの見出したプロモーター領域での DNA メチル化状態・ヒストン修飾状態を検討した。miR-375 は神経内分泌分化傾向のない

細胞では殆ど発現していないが、発現の無い細胞でも DNA メチル化は見られなかった。しかし、転写抑制性のヒストン修飾が見られ、ASH1 発現を誘導すると、発現促進性のヒストン修飾が誘導された。したがって miR-375 の発現誘導は ASH1 のエピジェネティックな作用機序によることが判明した。

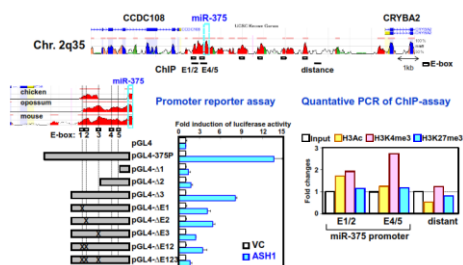


図 4. miR-375 プロモーター領域の検討。(左) 単離したプロモーター領域のレポーター解析。ASH1 により強いレポーター活性の上昇が見られ、この ASH1 反応性は ASH1 結合モチーフの E-box に依存した。したがって単離部位が ASH1 反応性 miR-375 プロモーターと考えられた。(右) ASH1 によるプロモーター領域のヒストン修飾の変化。ASH1 により転写促進性ヒストン修飾が誘導されている。

この miR-375 発現誘導の意義を検討するために、miR-375 を導入して機能解析を進めたところ、miR-375 単独でも ASH1 と同様に神経内分泌分化を誘導し、また、miR-375 をアンチセンスで抑制すると、ASH1 による神経内分泌分化誘導も抑制される傾向が見られた。したがって、この miR-375 が ASH1 の神経内分泌分化誘導のシグナル伝達に重要な役割を果たすことが判明した。

ASH1 がエピジェネティックな作用により miRNA を発現制御し、その ASH1-miRNA シグナルが、高悪性度の神経内分泌肺癌の発症に関わることが強く示唆されたことは新規で重要な所見であり極めて意義深い。

(3) ASH1 のテトラサイクリン誘導系の検討：

エピジェネティックな制御をゲノムワイドに継時的に検討するために、種々の Tet-ON 発現誘導ベクターを用い、非神経内分泌肺癌である肺腺癌細胞株において、ASH1 が Tet-ON により発現誘導されるシステムを比較検討し、最終的に安定的に効率よく ASH1 を発現誘導できるシステムを作成した。この Tet-ON システムで ASH1 を発現誘導すると、期待通りに神経内分泌肺癌様の形態変化や神経内分泌マーカー発現誘導が確認され、当所の目

的に合う有効な発現誘導システムであることが確認された。

このシステムにより今後、神経内分泌肺癌におけるエピジェネティックな制御を継時的に検討することが可能となり極めて意義深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Osada H, Takahashi T. let-7 and miR-17-92: Small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci.* 査読有 102: 9-17, 2011.
2. Murakami H, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. (計 13 名中 12 番目) LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 査読有 71: 873-83, 2011.
3. Yanagisawa K, Yatabe Y, Osada H, Takahashi T. (計 10 名中 9 番目) Novel Metastasis-Related Gene CIM Functions in the Regulation of Multiple Cellular Stress-Response Pathways. *Cancer Res.* 査読有 70: 9949-58, 2010.
4. Huang QM, Osada H, Yatabe Y, Takahashi T, Suzuki M. (計 12 名中 7 番目) Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. *Cancer Res.* 査読有 70: 8407-16, 2010.
5. An B, Kondo Y, Osada H, Issa JP, Sekido Y. (計 20 名中 15 番目) A characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. *Int J Cancer.* 査読有 127: 2095-105, 2010.
6. Horio Y, Osada H, Sekido Y. (計 6 名中 2 番目) Relationship of mRNA expressions of RanBP2 and topoisomerase II isoforms to cytotoxicity of amrubicin in human lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 査読有 66: 237-43, 2010.
7. Ebi H, Yatabe Y, Osada H, Takahashi T. (計 10 名中 8 番目) Counterbalance between RB inactivation and miR-17-92 overexpression in reactive oxygen species and DNA damage induction in lung cancers. *Oncogene.* 査読有 28: 3371-9, 2009.
8. Ebi H, Yatabe Y, Osada H, Takahashi T. (計 9 名中 8 番目) Relationship of

- deregulated signaling converging onto mTOR with prognosis and classification of lung adenocarcinoma shown by two independent in silico analyses. *Cancer Res.* 査読有 69: 4027-35, 2009.
9. Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Osada H, Issa JP, Sekido Y. (計 22 名中 11 番目) Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 査読有 69: 9073-82, 2009.
 10. Kawaguchi K, Osada H, Sekido Y. (計 16 名中 8 番目) Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. *Carcinogenesis.* 査読有 30: 1097-105, 2009.
 11. Osada H, Yatabe Y, Takahashi T. (計 9 名中 1 番目) Roles of achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res.* 査読有 68: 1647-55, 2008.
 12. Yokoyama T, Osada H, Sekido Y. (計 12 名中 2 番目) YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis.* 査読有 29: 2139-46, 2008.
 13. Shimizu J, Osada H, Takahashi T, Yatabe Y. (計 9 名中 3 番目) mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. *Respirology.* 査読有 13: 510-7, 2008.
 14. Yamada H, Osada H, Takahashi T. (計 8 名中 6 番目) Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 査読有 47: 810-8, 2008.
 15. Gao W, Kondo Y, Osada H, Issa J-P J, and Sekido Y. (計 14 名中 11 番目) Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 査読有 29: 1901-10, 2008.

[学会発表] (計 34 件)

1. 長田啓隆. 肺癌における microRNA 異常. 第 51 回日本肺癌学会総会シンポジウム 2010 年 11 月 3 日(広島)

2. Osada H. Roles of ASH1-regulated miRNAs in lung cancer development 第 69 回日本癌学会総会 International Session. 2010 年 9 月 22 日 (大阪)

3. Nishikawa E, Osada H, Takahashi T. (計 9 名中 2 番目). miR-375 induced by ASH1 plays a role in neuroendocrine differentiation in lung cancers. 100th AACR Annual Meeting. 2009 年 4 月 20 日(米国 Denver)

4. 長田啓隆他. 新規遺伝子 ADw1 は上皮細胞間接着に関与し、肺癌で高頻度に発現低下する 第 67 回日本癌学会総会. 2008 年 10 月 29 日 (名古屋)

5. 長田啓隆. 肺癌における microRNA の異常と意義. 第 23 回肺癌学会ワークショップ 2008 年 7 月 19 日(名古屋)

6. Osada H, Sekido Y, Takahashi T. (計 9 名中 1 番目) Roles of ASH1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. 2008AACR Annual meeting 2008 年 4 月 15 日 (米国 San Diego)

[その他]

ホームページ

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 啓隆 (OSADA HIROTAKA)

研究者番号 : 30204176