

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03770

研究課題名（和文）変異p53誘導性上皮間葉転換に伴う肺癌悪性化進展シグナルの解明及び新規治療法開発

研究課題名（英文）The elucidation of mechanisms and the development of novel therapeutic methods for mutant p53-induced EMT in lung cancer

研究代表者

毛受 暁史（MENJU, Toshi）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30527081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：p53変異による肺癌細胞株のEMT活性化を確認し、変異タイプによる差異の解析を行った。A549肺癌細胞株のTGF β 誘導性EMTの阻害化合物のdrug screeningを行い、約2500種類の既存薬剤、化合物から7種類の薬剤を選択でき、数種類で実際の細胞株でEMT抑制を示し、これを論文化した。EGFR変異肺癌マウスとp53変異マウスの交配による遺伝子改変マウスを作成し、p53変異により充実成分の多い低分化な腫瘍が産生されたことを見出した。L-PDX法を用いて、ヒト肺癌のマウスへの移植を9例中7例で成功させ、今後のPDXでの薬剤有効性検討を行う系の開発を行い、論文化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p53遺伝子変異が肺癌に段階的なEMT活性化を誘導することを実験で示し、これらの細胞株やマウス腫瘍細胞の解析により、今後のさらなるメカニズムの解明に役立つと考えられた。またEMT活性化には可塑性が認められ、見出した薬剤によりEMT抑制のための新規開発の始原となることが期待できる。また実験系として、EMT抑制のためのドラッグスクリーニング系の新規開発やヒト肺癌細胞のPDXによるex vivo実験を可能とするL-PDX法の開発に成功し、これを論文化して、広く社会に知らしめることで、浸潤転移を抑制する新規薬剤によるがん治療のパラダイムシフトを起こす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We confirmed the activation of EMT in lung cancer cell lines by p53 mutation and analyzed the differences by mutation type. We performed drug screening for compounds that inhibit TGF β -induced EMT in the A549 lung cancer cell line, and we were able to select 7 drugs from approximately 2500 existing drugs and compounds, and several of them actually showed the inhibitory effect on EMT in lung cancer cell lines.

We generated genetically engineered mice by crossing EGFR mutant lung cancer mice with p53 mutant mice and found that p53 mutation yielded poorly differentiated tumors with solid components. Using the L-PDX method, we successfully transplanted human lung cancer into mice in 7 out of 9 resected specimens, and we developed a system for future studies to verify drug efficacy with PDX, which was published.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 上皮間葉転換 浸潤・転移 EGFR変異 p53変異 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、本邦において、現在最もがん関連死亡数が最も多い癌種であり、その予後に関して改善が必要と考えられている。癌関連死亡の主な理由は原発巣からの遠隔転移によりもたらされる。これは癌細胞の持つ浸潤転移能が大きく関係することが知られており、その能力は、腫瘍細胞の上皮細胞様特徴が失われ、間葉系細胞様変化をきたす、いわゆる上皮間葉転換 (EMT) が活性化することが必要とされる。近年、この上皮間葉転換 (EMT) を引き起こす様々な経路が明らかとなってきているが、EMT を直接標的とする治療法は未だ確立していない。

肺癌においては、多くの遺伝子変異が認められるが、中でもがん抑制遺伝子として知られる p53 遺伝子変異が最も頻度が多いことが、過去の多数の研究から知られている。この p53 遺伝子は、癌抑制遺伝子として、遺伝子変異細胞をアポトーシスに導くだけでなく、ある特定のタイプの変異の場合には、EMT を誘導することが提唱されてきた。

そこで、我々の研究室では、これまで、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、その活性化レベルの段階的な変化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生存予後が悪化することなどを、実臨床において明らかにしてきた。さらに、メカニズムの解明研究を行い、p53 の遺伝子変異中でも特定のタイプの変異が EMT に関係し、p53 野生型を有する肺癌細胞株に機能亢進型 p53 遺伝子変異を発現させることにより、EMT が誘導されることを実験的に明らかにしてきた。

すなわち、肺癌においては、最も高頻度に観察される p53 遺伝子変異に伴う上皮間葉転換 (EMT) 活性化により浸潤転移能が亢進し、癌のさらなる悪性をきたしている可能性が高く、同メカニズムに対する新規治療戦略の開発が必要とされる。

2. 研究の目的

本研究は、我々の従前の知見を活用した、肺癌における変異型 p53 誘導性 EMT 活性化メカニズム解明と、新規治療薬創出に向けた創薬研究基盤の確立を目的とする。第一に、肺癌における高頻度 p53 遺伝子変異誘導性 EMT に基づく、肺癌悪性化進展機構解明および関連薬剤の臨床的意義の検討を行う。第二に、変異型 p53 誘導性 EMT の経路を標的とした化合物をスクリーニングし、創薬候補の可能性を探索する。第三に、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 による腫瘍悪性化進展の検証、driver mutation との相互作用およびシグナル経路の解明、ヒト臨床検体に対する薬剤の抗腫瘍性の確認を実施する。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の点で、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ることに期待できる。

これらの臨床および過去の基盤・萌芽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、以下の目的を挙げる。

(1) 様々な p53 遺伝子変異により誘導される EMT に基づいた浸潤転移能および薬剤耐性のメカニズム、シグナル経路の解明および同分子の臨床的意義の検討

(2) 変異型 p53 誘導性 EMT を標的とした化合物スクリーニング及び in vitro での有効性確認

(3) 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 による腫瘍悪性化進展の検討、さらに driver mutation との相互作用およびシグナル経路の解明

(4) ヒト肺癌切除検体を用いたオルガノイドや Xenograft mice model によるスタチン及びスクリーニングヒット化合物の有効性の確認

3. 研究の方法

以下の点について検討方法を示す。

(1) 肺癌における、様々な 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。H4006、H460 など野生型 p53 を有する肺癌細胞株に様々な変異型 p53 を導入する。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。これらのシグナル経路についてもリン酸化アレイ及び RNA-seq など網羅的解析をすすめる。KEGG などを用いた ontology 解析により有意な発現上昇及びシグナル活性化がみられた経路について、siRNA や阻害剤などを用いて、EMT が回復するかどうかを確認する。また見出され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明らかにする。

(2) 変異 p53 誘導性 EMT の回復に有効な化合物の選択

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

我々は既にスタチンによる変異 p53 抑制性及び EMT の回復を示したが、さらに有効な薬剤の選択を目的とした化合物スクリーニングを行う。

E-cadherin 及び vimentin の promoter を Nano-luc につないだ vector (pNL2.2、promega 社) を既に作成済みである。これらを細胞株に遺伝子導入し、luciferase dual reporter assay を用いた化合物スクリーニングを行う (図)。使用薬剤は、京都大学研究支援センタードラッグディスクカバリーセンター保有の化合物ライブラリーを用いる。作用機序情報附随の約 2500 化合物が利用可能であり、実験支援相談員による適切なアドバイスも受けることが可能である。

(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。マサチューセッツ工科大学 Tyler Jacks 教授の研究室と MTA を交わし既に供与済みの変異 p53 (R172H) マウスと SPC-Cre マウスを交配し、肺組織特異的に p53 変異を有するマウスを作成する。遺伝子変異原としてウレタン投与後、約 30 週で肺癌が発生するため、野生型/変異型 p53 マウスにおける肺癌の相違、特に EMT 変化及び浸潤転移能について解析を行い、原発巣と転移巣との比較検討を行う。また変異型 EGFR マウスを購入、同様に p53LSL-R172H マウス、SPC-Cre マウスと交配し、転移の出現状況などを評価、EGFR 変異肺癌における変異型 p53 発現による EMT により、浸潤及び遠隔転移が促進されるかどうかを確認する。また同時に発生した腺癌組織型の変化 (例えば、lepidic type から micropapillary type への変化) についても病理医とともに確認する

(4) ヒト肺癌検体を用いた薬剤有効性の確認

自施設で切除した肺癌臨床検体から腫瘍細胞を採取し、一旦 dissociate した後に気道内散布などの方法で作成したオルガノイドや patient-derived xenograft (PDX) model (右図) を用いて、ex/ in vivo model を作成する。研究分担者である佐藤らは、90%以上の高確率での PDX モデル作成可能な手法に成功しており、マウス研究の促進を図る。p53 及びその他遺伝子変異を同定し、同時に作成したマウスモデルにおいて、statin やスクリーニングで選択された他の薬剤を用いて、EMT の回復や増殖転移能に関して、組織切片の免疫染色やオルガノイド、in vivo mouse model 中の患者由来腫瘍細胞量の減少を確認する。

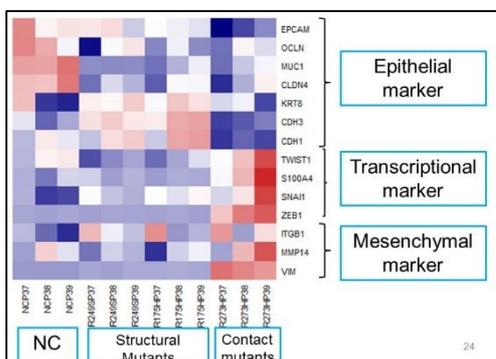
4. 研究の成果

(1) 肺癌における、様々な 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

野生型 p53 を有する EGFR 変異肺癌細胞株である H1650 株に、腫瘍特異的 p53 変異の中でも HOTSPOt mutation と呼ばれる高頻度な p53 変異を vector として作成し、遺伝子導入後、安定発現株を FACS sorting 法により作成した。その結果、機能亢進型 p53 変異タイプの中でも DNA contact 部位の mutation タイプである変異 p53 発現により、上皮系マーカーである E-cadherin は減少し、間葉系マーカーである vimentin や EMT 関連 Transcriptional factor である ZEB1 の発現増強を認め、EMT full 活性化が起こっていた。また別のタイプの機能亢進型変異である structural mutation が導入された株では、E-cadherin の減少のみがみられ、partial な EMT 活性化がみられた。

contact mutation 型 p53 変異が導入された株においては、細胞株の形態変化も明らかであり紡錘形様細胞となっており、EMT 活性化を裏付けるものと考えられた。

さらに、これらの中から R175H、R273H、R249S 変異および vector のみの negative control を導入した 4 株の RNA-seq を行い、遺伝子発現を比較したところ、contact mutation タイプである R273H 株の EMT 関連諸遺伝子の発現亢進が明らかとなった。



(2) 変異 p53 誘導性 EMT の回復に有効な化合物の選択

EMT の回復を標的とする薬剤のスクリーニングを行うため、E-cadherin および vimentin promoter を promega 社製の Nano-luc に結合した vector を作成し、A549 細胞株に導入、drug selection により bulk で vector 発現細胞株を作成し、プロモーターアッセイを行うこととした。A549 は p53 変異誘導性ではないが、TGF- β 1 を投与することにより、full EMT を起こすことが示されている細胞株であり、EMT に対する治療薬スクリーニング系の開発に適していると考え、

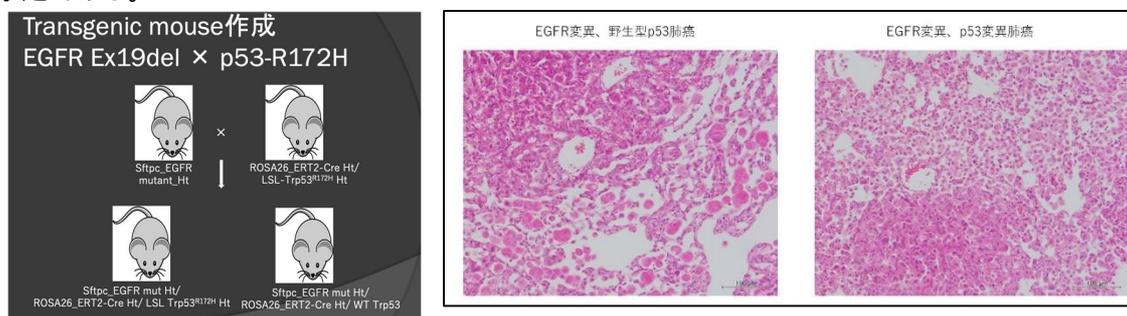
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

実験を行った。京都大学のドラッグディスカバリーセンターの保有する約 2500 種類の化合物を使用して、TGF 誘導性に E-cadherin 減少、vimentin 増加を、それぞれ半減させる化合物を選択した。計 7 種類の化合物がスクリーニングされ、うち 3 種類が TGF 阻害剤として知られている薬剤であり、系の妥当性が示された。その他 4 種類は、Avagacestat (セクレターゼ阻害剤)、L-thyroxine、Cladribine、GDC-0879 (B-Raf 阻害剤) であった。これらの 4 種類は、実際に A 5 4 9 細胞株に投与して、ウェスタンブロットングで vimentin タンパク発現低下や Matrigel invasion assay により EMT の表現型の一つである浸潤能の低下を確認でき、論文発表を行った (Ishikawa et al, Lung Cancer, 2023)。

(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

EGFR 変異肺癌における p53 変異がどのような影響を及ぼすか検討するために、トランスジェニックマウスの作成を行った。共同研究として、EGFR 変異マウスを供与してもらい、当科で保有していた p53 変異マウスと交配させ、二重変異マウスを作成した。また同マウスには、ERT2-Cre も導入されており、タモキシフェン投与により、Cre が発現するコンディショナルマウスとして任意の時期に p53 変異を起こさせることが出来るマウスとした。

このマウスを用いて、EGFR 肺癌の腫瘍が確認できる時期以降に p53 変異を導入し、野生型 p53 の EGFR 肺癌との比較を行った。その結果、充実成分の多い、より低分化な腫瘍の増生を p53 変異肺癌の方で認めた。EMT 活性化やその他の表現型の違い、免疫微小環境などの解析を今後行う予定である。



(4) ヒト肺癌検体を用いた薬剤有効性の確認

EMT 活性化を抑制する薬剤の ex vivo 実験を行うため、肺癌患者からの腫瘍組織を個々の細胞に分離して、免疫抑制マウス肺癌に生着させる、いわゆる患者由来 xenograft (PDX) の作成に取り組んだ。通常の免疫抑制マウスにヒト肺癌を投与しても、腫瘍細胞は生着せず、PDX は作成されないため、より生着しやすくなる工夫として、Bleomycin による肺線維化をマウスに起こさせ、線維増生期に患者由来腫瘍細胞を経気道的に散布して、PDX を作成した。この手法については、共同研究者である佐藤らの研究室から L-PDX として、論文化し (Miyata et al, iScience, 2022) 。その中で実際に、肺癌患者 9 例からマウスに移植し、L-PDX として 7 例の生着を認めた。今後、肺癌患者の中で EMT 活性化している症例の L-PDX を ex vivo で EMT 抑制薬を使用して、その有効性を確認する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Ishikawa Hiroyuki, Menju Toshi, Toyazaki Toshiya, Miyamoto Hideaki, Chiba Naohisa, Noguchi Misa, Tamari Shigeyuki, Miyata Ryo, Yutaka Yojiro, Tanaka Satona, Yamada Yoshito, Nakajima Daisuke, Ohsumi Akihiro, Hamaji Masatsugu, Okuno Yukiko, Date Hiroshi	4. 巻 175
2. 論文標題 A novel cell-based assay for the high-throughput screening of epithelial-mesenchymal transition inhibitors: Identification of approved and investigational drugs that inhibit epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 36 ~ 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2022.11.015	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 Miyata Ryo, Hasegawa Koichi, Menju Toshi, Yoshizawa Akihiko, Watanabe Akira, Hirai Toyohiro, Date Hiroshi, Sato Atsuyasu	4. 巻 25
2. 論文標題 Lung fibrogenic microenvironment in mouse reconstitutes human alveolar structure and lung tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104912-104912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104912	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 Tamari Shigeyuki, Menju Toshi, Toyazaki Toshiya, Miyamoto Hideaki, Chiba Naohisa, Noguchi Misa, Ishikawa Hiroaki, Miyata Ryo, Kayawake Hidenao, Tanaka Satona, Yamada Yoshito, Yutaka Yojiro, Nakajima Daisuke, Ohsumi Akihiro, Hamaji Masatsugu, Date Hiroshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Nrf2/pFyn/ABCB1 axis accompanied by pFyn nuclear accumulation plays pivotal roles in vinorelbine resistance in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2022.8386	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 Noguchi Misa, Menju Toshi, Nakajima Naoki, Yoshizawa Akihiko, Ohsumi Akihiro, Nakajima Daisuke, Hamaji Masatsugu, Haga Hironori, Date Hiroshi	4. 巻 52
2. 論文標題 High programmed death ligand 1 expression in carcinomatous components predicts a poor prognosis in pulmonary pleomorphic carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1090-1095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02439-7	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 Toshi Menju, Hiroshi Date	4. 巻 5
2. 論文標題 Lung cancer and epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 781-789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11748-021-01595-4	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石川浩之
2. 発表標題 肺癌細胞を用いた新規ハイスループットスクリーニングシステムによる上皮間葉転換阻害薬剤の網羅的同定
3. 学会等名 第64回肺癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玉里 滋幸
2. 発表標題 Osimertinib耐性化におけるEMTとStat3の意義
3. 学会等名 第63回肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉直久
2. 発表標題 肺腺癌においてArf6のエフェクター分子AMAP1発現はPD-L1発現と関連があり、予後を悪化させる
3. 学会等名 第63回肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田 亮
2. 発表標題 CD133, GLUT-1発現: micropapillary/solid陽性肺腺癌の予後不良因子
3. 学会等名 第61回肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉 直久
2. 発表標題 肺腺癌切除症例におけるリン酸化focal adhesion kinase発現の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第62回肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉 直久
2. 発表標題 非小細胞肺癌において AMAP1 と PD-L1 はリン酸化 EGFR のネガティブフィードバックと NF-κB によって逆相関する
3. 学会等名 第82回癌学会学術総会
4. 発表年 2023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	佐藤 篤靖 (Sato Atsuyasu) (30706677)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	西川 滋人 (Nishikawa Shigeto)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究協力者	住友 亮太 (Sumitomo Ryota)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究協力者	玉里 滋幸 (Tamari Shigeyuki)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	

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