

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17186

研究課題名（和文）肺腺癌に対するタイト結合分子を介したヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果

研究課題名（英文）Antitumor effects of histone deacetylase inhibitors mediated by tight junction molecules on lung adenocarcinoma

研究代表者

新井 航 (Arai, Wataru)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：30837224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤による肺癌に対する抗腫瘍効果のメカニズムをがん細胞の増殖、浸潤および遊走に密接な関与がみられるタイト結合分子lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)およびclaudin-2に焦点を当て解明する。また、手術検体より採取したヒト正常初代培養上皮細胞においてタイト結合分子に焦点を当て、HDAC阻害薬を処置した際の肺腺癌細胞株との相違点を比較検討する。HDAC阻害剤はエピジェネティックに作用する薬剤で、抗腫瘍効果を示すことが報告されている。我々はタイト結合分子の調整に関与しているHDAC阻害剤に注目した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術材料より分離培養した初代培養癌細胞および肺腺癌細胞株（A549）を用いて、HDAC阻害剤による肺腺癌に対する抗腫瘍効果のメカニズムを解明する。肺腺癌細胞株にてLSRの発現低下が2細胞間タイト結合claudinを誘導することを見出した。claudin-2の肺腺癌の増殖調節機構の報告から、肺腺癌においてもLSRがclaudin-2を介して肺腺癌の増殖能の調節に関与している可能性がある。肺腺癌細胞株に対してHDAC阻害薬による処置を行いLSRおよびclaudin-2の発現の変化や局在の変化が起こることが確認され、HDAC阻害薬の抗腫瘍効果のメカニズムに細胞接着分子が関連していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of the antitumor effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitors on lung cancer is determined by the tight junction molecules lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) and claudin-2, which are closely involved in the proliferation, invasion, and migration of cancer cells. Focus on and elucidate. We will also focus on tight junction molecules in human normal primary cultured epithelial cells collected from surgical specimens, and compare and examine the differences between them and lung adenocarcinoma cell lines when treated with HDAC inhibitors. HDAC inhibitors are drugs that act epigenetically and have been reported to exhibit antitumor effects. We focused on HDAC inhibitors that are involved in regulating tight junction molecules.

研究分野：肺癌

キーワード：tight junction 肺癌 HDAC阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤による肺癌に対する抗腫瘍効果のメカニズムをがん細胞の増殖、浸潤および遊走に密接な関与がみられるタイト結合分子 lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)および claudin-2 に焦点を当て解明する。また、手術検体より採取したヒト正常初代培養上皮細胞においての上記タイト結合分子に焦点を当て、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を処置した際の肺腺癌細胞株との相違点を比較検討する。

2. 研究の目的

HDAC 阻害剤はエピジェネティックに作用する薬剤で、ヒストンのアセチル化を亢進し、クロマチン構造の弛緩を介して発現抑制された遺伝子の発現を促進させ、癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。我々は、従来の抗癌剤とは全く異なる作用点を持ち、タイト結合分子の調整にも関与している HDAC 阻害剤に注目した。

3. 研究の方法

ヒト剖検材料、手術材料より分離培養した初代培養癌細胞および肺腺癌細胞株(A549)を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による肺腺癌に対する抗腫瘍効果のメカニズムを解明する。ヒト剖検材料を用いて前癌病変(AHH)を含めた肺腺癌におけるタイト結合分子 LSR および claudin-2 の発現および局在の変化を形態学的悪性度(EMT マーカー:Snail, ZEB, Twist)とともに比較検討する。正常肺組織より分離培養したヒト細気管支上皮細胞に hTERT 遺伝子を導入し、長期維持可能な細胞系を作製する。生体により近い肺上皮細胞を培養で再現するために3D培養系を作製する。現在までに LSR を高発現する細気管支様の3D培養が確立した。正常初代培養上皮細胞および肺腺癌細胞株(A549)を用いて、LSR および claudin-2 の発現調節機構を細胞内シグナルおよび転写因子の面から解析する。また、正常初代培養上皮細胞および肺腺癌細胞株(A549)を用いて、LSR および claudin-2 の発現による癌の悪性化への影響をみる。具体的には、それぞれの siRNA を処置して発現低下における癌細胞の浸潤、遊走および増殖への影響をみた。様々な HDAC 阻害剤を用いて、正常初代培養上皮細胞および肺腺癌細胞株(A549)に処置して、LSR および claudin-2 の発現および局在変化を検討する。さらに p38 MAPK, AMPK などの細胞内シグナル伝達の変化も同時に観察する。

原発性肺腺癌組織より初代培養肺腺癌細胞を分離培養し、正常初代培養細胞と比較検討する。癌は代謝疾患の一つであることにより、癌細胞の代謝への影響を調べる。具体的には細胞外フラックスアナライザー(XFe Series)を用いて、正常および癌細胞におけるグルコース代謝、ミトコンドリア呼吸代謝の変化を HMGB1 および HDAC 阻害剤処置後に解析する

肺腺癌細胞株を SCID マウスに移植する xenograft モデルを用いて HDAC 阻害剤を処置して in vitro と同様の解析を行う。

4 . 研究成果

肺腺癌細胞株 A549 に LSR の siRNA を処置して LSR の発現を低下した結果、claudin-2 の発現誘導がみられた。LSR のノックダウンによる claudin-2 の発現誘導は real time PCR において、RNA レベルで発現が増加していることを確認した。また、LSR の発現低下に伴い、Migration assay において細胞遊走能の低下を認めた。claudin-2 を発現低下させると cell cycle アッセイで G1 期の増加、S および G2/M 期の低下で示される細胞増殖の抑制がみられた。以前に報告されていた通り、claudin-2 の発現低下は肺癌において悪性化に寄与することが確認された。

典型的な HDAC 阻害剤である tricostatinA (TSA) を A549 細胞に処置した結果、用量依存的に claudin-2 の発現低下がみられたが、LSR の発現に変化は認められなかった。そして HDAC 阻害剤処置細胞において cell cycle アッセイで G1 期の増加、S および G2/M 期の低下で示される細胞増殖の抑制がみられた。

我々は手術材料より正常組織から上皮細胞を分離し初代培養を行い、さらに hTERT 遺伝子を導入して常時使用可能な細胞系を確立した。この分離正常ヒト上皮細胞に TSA を処置した結果、LSR の明らかな発現低下がみられたが免疫染色において細胞間接着分子の二細胞間接着への局在変化を認めた。

タイトジャンクション (TJ) タンパク質シングリン (CGN) と転写因子フォークヘッドボックスタンパク質 O1 (FOXO1) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤について A549 細胞について解析した。A549 細胞では、CGN のノックダウンにより、ミトゲン活性化プロテインキナーゼ/アデノシナーリン酸活性化プロテインキナーゼ (MAPK/AMPK) 経路を介して二細胞 TJ タンパク質クローディン-2 (CLDN-2) が増加し、細胞遊走が誘導されたのに対し、FOXO1 のノックダウンによりクローディン-4 (CLDN-4) が増加し、CGN が減少し、細胞増殖が誘導された。CGN および FOXO1 のノックダウンにより、A549 細胞における細胞代謝が誘導された。TSA およびキシノスタットは、A549 において CGN および三細胞 TJ タンパク質アンギュリン-1/脂肪分解刺激リポタンパク質受容体 (LSR) を増加させた。正常な HLE 細胞では、CGN と FOXO1 のノックダウンにより CLDN-4 が増加し、HDAC 阻害剤により CGN と CLDN-4 が増加した。結論として、FOXO1 を介した CGN のノックダウンは NSCLC の悪性度に寄与した。TSA と Quisinostat の両方の HDAC 阻害剤は、CGN と FOXO1 の発現の変化を介して肺腺癌の治療に使用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Arai Wataru, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kodera Yuki, Tsujiwaki Mitsuhiro, Shindo Yuma, Chiba Hirofumi, Miyajima Masahiro, Sakuma Yuji, Watanabe Atsushi, Kojima Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Downregulation of angulin-1/LSR induces malignancy via upregulation of EGF-dependent claudin-2 and TGF- β -dependent cell metabolism in human lung adenocarcinoma A549 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 261 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27728	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 Ishii Daichi, Shindo Yuma, Arai Wataru, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Honda Kazuya, Miyajima Masahiro, Watanabe Atsushi, Kojima Takashi	4. 巻 25
2. 論文標題 The Roles and Regulatory Mechanisms of Tight Junction Protein Cingulin and Transcription Factor Forkhead Box Protein O1 in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells and Normal Lung Epithelial Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1411 ~ 1411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25031411	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 Ishii Daichi, Aoyama Satoshi, Arai Wataru, Hasegawa Masaru, Tanaka Akihiko, Sakuraba Motoki	4. 巻 15
2. 論文標題 A component of high grade fetal lung adenocarcinoma diagnosed as the cause of lymph node metastasis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1112 ~ 1116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.15296	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 Arai Wataru, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kodera Yuki, Tsujiwaki Mitsuhiro, Shindo Yuma, Chiba Hirofumi, Miyajima Masahiro, Sakuma Yuji, Watanabe Atsushi, Kojima Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Downregulation of angulin-1/LSR induces malignancy via upregulation of EGF-dependent claudin-2 and TGF- β -dependent cell metabolism in human lung adenocarcinoma A549 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 261 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27728	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 Kodera Y	4. 巻 -
2. 論文標題 HMGB1 enhances epithelial permeability via p63/TGF- signaling in lung and terminal bronchial epithelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2020.1805997. Epub 2020 Aug 28.	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 Arai W	4. 巻 -
2. 論文標題 Downregulation of angulin-1/LSR induces malignancy via EGF-dependent claudin-2 and TGF- dependent cell metabolism in human lung adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kojima T	4. 巻 -
2. 論文標題 Dysfunction of epithelial permeability barrier induced by HMGB1 in 2.5D cultures of human epithelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1972760. Online ahead of print.	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 該当する

1. 著者名 Wataru Arai	4. 巻 -
2. 論文標題 Downregulation of angulin-1/LSR induces malignancy via upregulation of EGF-dependent claudin-2 and TGF- dependent cell metabolism in human lung adenocarcinoma A549 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yuma Shindo	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of histone deacetylase inhibitors Tricostatin A and Quisinostat on tight junction proteins of human lung adenocarcinoma A549 cells and normal lung epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-01966-1. Online ahead of print.	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 Yuki Kodera	4. 巻 -
2. 論文標題 HMGB1 enhances epithelial permeability via p63/TGF- signaling in lung and terminal bronchial epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2020.1805997. Epub 2020 Aug 28.	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 新井 航
2. 発表標題 肺腺癌におけるHMGB1の役割
3. 学会等名 第38回呼吸器外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 航
2. 発表標題 肺腺癌におけるHMGB1の役割
3. 学会等名 第38回呼吸器外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 航
2. 発表標題 HDAC阻害薬のLSR/claudin-2を介した抗腫瘍効果の解析
3. 学会等名 第37回呼吸器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井 航
2. 発表標題 肺癌におけるタイトジャンクション分子claudin-2およびLSRの 解析
3. 学会等名 第73回胸部外科学会
4. 発表年 2020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

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