

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590316

研究課題名（和文） 難治性肺非小細胞癌における分子治療標的の検索

研究課題名（英文） Detection of the molecular target in intractable non-small cell lung cancer

研究代表者

古賀 孝臣 (KOGA TAKAOMI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70380615

研究成果の概要（和文）：

CHFR 遺伝子が異常メチル化により失活した肺扁平上皮癌 QG56 培養細胞に CHFR 遺伝子を導入した (QG56<sup>+</sup>)。QG56<sup>+</sup>細胞はコントロール細胞 (QG56<sup>-</sup>) に比べて有意に増殖速度と細胞運動性が低下し、また多核、あるいは巨大な核を持った細胞が有意に減少した (QG56<sup>-</sup> 24.4%, QG56<sup>+</sup> 3.6%,  $p<0.05$ )。フローサイトメトリーによる解析で、CHFR 導入により異数体が減少する傾向にあった (QG56<sup>-</sup> 10.1%, QG56<sup>+</sup> 1.8%,  $p=0.08$ )。以上の結果より、CHFR 導入により肺扁平上皮癌細胞の悪性形質が低下することが示唆され、CHFR 異常は治療対象となり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The QG56 cell, which was established from a lung squamous cell carcinoma, with CHFR inactivation due to aberrant methylation was transfected the CHFR expression vector (QG56<sup>+</sup>). QG56<sup>+</sup> cells showed suppressed tumor growth rate and cellular motility with statistical significances, and decreased a ratio of multinucleated cells or cells with bizarre nuclei compared with control cells (QG56<sup>-</sup>) (QG56<sup>-</sup> 24.4%, QG56<sup>+</sup> 3.6%,  $p<0.05$ ). In flow cytometric analysis, a ratio of aneuploid cells tended to decrease (QG56<sup>-</sup> 10.1%, QG56<sup>+</sup> 1.8%,  $p=0.08$ ). Our study suggested that retrieval of CHFR expression in NSCLC cells with CHFR loss suppresses tumor aggressiveness. Based on this result, CHFR abnormality might be a therapeutic target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：呼吸器・縦隔、非小細胞肺癌、分子標的、CHFR

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において、肺がんは男性のがん死亡率の第一位であり、その征圧は緊急な課題と

認識されている。細胞周期 G2-M 期のチェックポイント分子である CHFR は、微小管ストレスに対し、核膜が崩壊するか否かのチェッ

クに関与する (Scolnick DM, et al, Nature 2000)。CHFR は固形癌において異常メチル化が見られること、CHFR ノックアウトマウスで固形癌や悪性リンパ腫の発生を見ることなどから、がん抑制遺伝子として機能すると考えられている。さらに CHFR は HDAC1 を抑制することにより、転移を抑制する遺伝子、KAI1 や E-cadherin の発現を促進することが示され、転移を抑制する機能を持つことも示唆された (Oh YM, et al, Nat Cell Biol 2009)。さらにマイクロサテライト不安定性を示す大腸癌は、高頻度に CHFR のサイレンシングを伴うことが示され (Brandes JC, et al, Carcinogenesis 2005)、エピジェネティックドライバー変異と考えられるに至った (Adv Genet 2010)。我々の研究で、喫煙者非小細胞肺癌の約 50% の症例で CHFR 蛋白発現が消失ないしは低下し、発現低下例は有意に予後不良であることを示した (Takeshita M, et al, Int J Cancer 2008)。また非小細胞肺癌における CHFR の異常メチル化は約 20% の症例に見られ、独立した予後因子であること、さらに EGFR 変異、および K-ras 変異と排他的に見出されることを示した (Koga T, et al., Int J Cancer 2011)。我々の研究により、CHFR は EGFR 野生型の予後不良な喫煙者の非小細胞肺癌の治療標的となる可能性が示唆された。

一般に異なった発癌経路上の分子異常は高頻度に同一癌組織中に見られるが、同じ系路上の分子異常は排他的に見出される傾向がある (Oda K, et al, Cancer Res 2008)。従って、EGFR 変異と CHFR メチル化は同一発癌経路上に位置する可能性があるが詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

- 1) CHFR 遺伝子の治療標的としての可否を検討するために、肺癌細胞株に CHFR 遺伝子を導入し、増殖が抑制されるかを検討する。
- 2) CHFR のシグナル伝達経路 (MAPK, JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR) への関与の有無についても検索する。
- 3) 分子標的の見地から、CHFR と連動して発現変動する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて検索する。

## 3. 研究の方法

- 1) CHFR 遺伝子導入による強制発現、さらに抗体、SiRNA などを用いたノックダウンによる非小細胞肺癌培養細胞の増殖・浸潤能の変化を細胞生物学的に明らかにする。
- 2) 上記実験における、各伝達経路上の分子の遺伝子発現の変化をリアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法にて観察し、CHFR 異常と各伝達経路との関連の有無を検討する。

3) 培養細胞を用いた実験により得られた結果を基に、臨床検体を用いて各伝達経路上の分子の mRNA・免疫組織化学的蛋白発現解析を行い、結果を対比させる。

4) 上記実験にて得られた結果と臨床病理学的データを対比し、新たな臨床病理学的マーカーを検索する。

5) DNA マイクロアレイを用いた検索にて CHFR と連動して動く分子が見出されればさらに各々の分子について遺伝子・タンパク発現を臨床検体を用いて解析する。

## 4. 研究成果

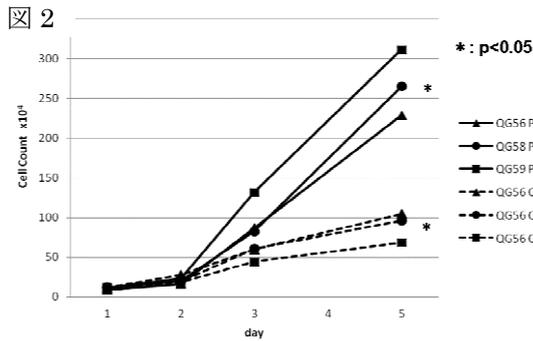
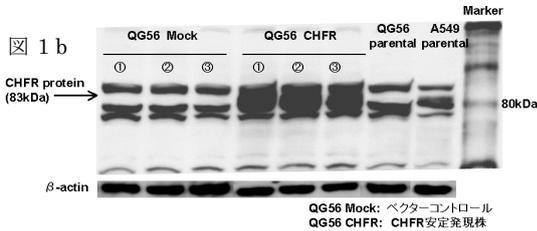
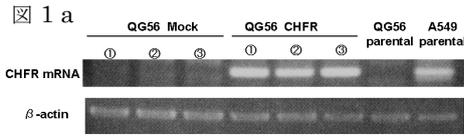
非小細胞肺癌において CHFR 異常メチル化と EGFR 変異は臨床病医学的因子と患者予後が明瞭に対極の関係にあることが明らかにした (Koga T, et al., Int J Cancer 2011)。208 例の非小細胞肺癌において、CHFR 異常メチル化は 29 例 (14%) に見られ、EGFR 変異は 48 例 (23%) に見出された。CHFR 異常メチル化と EGFR 変異は相互に背反 (同一症例中に重複して見られない) に見出され ( $p=0.004$ )、CHFR 異常メチル化例は喫煙、低分化、リンパ管浸潤 (これらは予後不良と関連する)、および有意に予後不良と関係し、これらは EGFR 変異が予後良好な方向に各因子と関連したこととは対照的であった。これらの結果は、CHFR とその上流、下流の遺伝子は予後不良非小細胞肺癌の有望な治療標的になり得る可能性を示唆する。

165 例の肺腺癌において EML4-ALK、CHFR 異常メチル化、EGFR 変異、KRAS 変異を解析した結果、それぞれ 11 (6.7%)、16 (10%)、48 (29%)、13 (8%) 例に見出された。CHFR 異常メチル化と EGFR 変異は相互に背反 (同一症例中に重複して見られない) に見出され ( $p=0.025$ )、CHFR 異常メチル化陽性例は陰性例に比べて有意に予後不良であった ( $p=0.0017$ )。EML4-ALK、EGFR 変異、KRAS 変異のいずれかの遺伝子異常を有する症例はいずれの遺伝子変異も持たない群に比べて予後不良の傾向が見られた (Koga T, et al., Hum Pathol 2013)。以上の結果は、扁平上皮癌症例の解析にて CHFR 発現低下例が有意に予後不良であったのと同様であった (Takeshita M, et al., Int J Cancer 2008)。

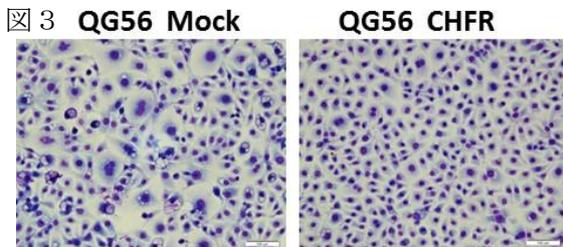
これらの結果を踏まえて、CHFR の強制発現による癌細胞の細胞生物学的、および分子生物学的変化を見るために CHFR がサイレンシングされている QG56 と QG95 扁平上皮癌細胞株に CHFR cDNA 搭載プラスミドベクター (pcDNA3.1) を導入し、CHFR 安定発現株を樹立した (図 1 a, b)。

CHFR 遺伝子を導入し強制発現させた QG56 培養細胞は、コントロール細胞に比べて有意に増殖速度が低下した ( $p<0.05$ ) (図 2)。また空ベクターを導入した細胞は紡錘形態を

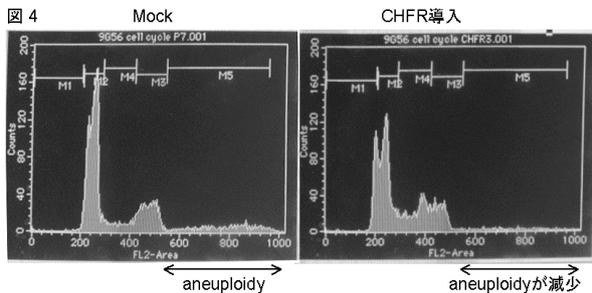
とり、結合性に乏しく、多核、あるいは巨大な核を持った細胞が散在性に出現したが、



CHFR 遺伝子導入細胞株はこれらの核異常を示す細胞は有意に減少し、細胞間の結合も回復しコロニーを形成する傾向にあった。(図3)。



フローサイトメトリーによる解析で、CHFR 導入により異数体が減少した (図4)。



以上の結果より、CHFR 導入により肺扁平上皮癌細胞の悪性形質が低下することが示唆され、CHFR 発現異常が治療対象となり得ることが示された。遺伝子治療の観点から CHFR 以外の CHFR と

連動して発現変動する関連遺伝子の検索のために、CHFR 発現回復株と非発現株の発現遺伝子を DNA マイクロアレイ (イルミナ社 BeadArray-Reader) を用いて網羅的に解析した。CHFR 導入細胞とベクターのみの細胞のそれぞれ6コロニーをDNA マイクロアレイで解析した。約47000の遺伝子のうち、4500の遺伝子に発現変動の有意差を得た。CHFR はアポトーシス、細胞増殖、細胞周期に関与する多くの遺伝子と関連していた (図5)。

発現値の分散が低いこと、発現変動比が2程度以上あることを条件に、解析対象を50の遺伝子に絞り込んだ (図6)。CHFR の遺伝子導入により発現が抑制される遺伝子に、MIPEP、METRNL、NR2F2、GAS6などが含まれていた。分泌タンパクの GAS6 は、新規の細胞増殖因子とされ、Ax1 のリガンドであるとされる。発現が上昇する遺伝子に、SLC2A9、Fbxw7、TXNIP などがあるが、Fbxw7 は E3 ユビキチンリガーゼであり c-myc の分解に中心的な役割を演じる。また TXNIP はがんにおいて増殖抑制的に作用することが示唆されている。これらの遺伝子は潜在的に非小細胞肺癌の悪性度に関係する可能性があり、各候補遺伝子においてヒト標本での蛋白発現解析、臨床病理学的因子との関連、分子生物学的解析を継続して施行している。また CHFR のシグナル伝達経路への関与の有無についても引き続き検索する。

図5

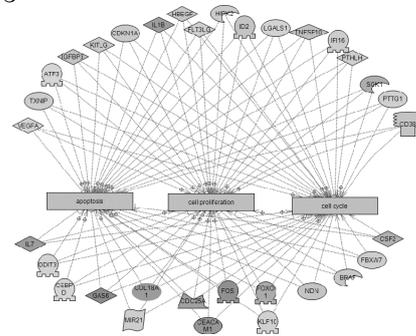


図6 (抜粋)

遺伝子	F値(p)	p値(E-05)	モンテカルロ法	変動比
SLC2A9	0.279	1.35616	0.00394	3.45
FEZ1	0.205	3.52878	0.00394	2.62
MIPEP	0.222	5.23006	0.00394	-2.27
CCDC3	0.976	4.99566	0.00394	4.12
METRNL	0.404	1.25101	0.00394	-2.51
PALLD	0.053	6.50726	0.00394	2.72
NR2F2	0.142	2.35931	0.00394	-2.11
SNORA79	0.188	6.68015	0.00394	3.01
ANXA2P1	0.242	1.72039	0.00394	-1.43
PLG1	0.551	4.38031	0.00394	1.96
BTG1	0.911	3.79447	0.00394	2.08
PMEPA1	0.228	1.55415	0.00394	-1.75
MIR205	0.121	2.78196	0.00394	2.41
RILPL2	0.872	2.35279	0.00394	1.74
TXNP1	0.798	6.87139	0.00394	1.82
CD1D	0.552	4.17013	0.00394	3.77
FBXW7	0.541	7.82202	0.00394	1.82
GAS6	0.938	2.47865	0.00394	-2.08

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 12件)

- ① Okamura K, Harada T, Wang S, Ijichi K, Furuyama K, Koga T, Okamoto T, Takayama K, Yano T, Nakanishi Y. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 78:100-106, 2012, 査読有  
DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.07.011
- ② Kubo N, Harada T, Anai S, Otsubo K, Yoneshima Y, Ijichi K, Koga T, Takayama K, Nakanishi Y. Carboplatin plus paclitaxel in the successful treatment of advanced inflammatory myofibroblastic tumor. *Intern Med* 51:2399-401, 2012, 査読有  
DOI: 10.2169/internalmedicine.51.7599
- ③ Koga T, Takeshita M, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Sueishi K. CHFR aberrant methylation involves a subset of human lung adenocarcinoma associated with poor clinical outcome, 査読有, *Human Pathol Epub ahead of print*, 2013, 査読有  
DOI: 10.1016/j.humpath.2012.11.008
- ④ Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K. Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 80:2013, 85-90, 査読有  
DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.12.018
- ⑤ Yoshiya S, Maruyama R, Koga T, Shikada Y, Yano T, Maehara Y. Localized pleural amyloidosis: report of a case. *Surg Today* 42:597-600, 2012, 査読有  
DOI: 10.1007/s00595-012-0122-z
- ⑥ Suzuki H, Onimaru M, Koga T, Takeshita M, Yano T, Maehara Y, Nakamura S, Sueishi K. High podoplanin expression in cancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 207:597-600, 2011, 査読有  
DOI: 10.1016/j.prp.2010.11.006
- ⑦ Koga T, Takeshita M, Yano T, Maehara Y, Sueishi K. CHFR hypermethylation and EGFR mutation are mutually exclusive and exhibit contrastive clinical backgrounds and outcomes in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 128:1009-17, 2011, 査読有  
DOI: 10.1002/ijc.25447
- ⑧ Takeshita M, Koga T, Takayama K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K. Alternative efficacy-predicting markers for paclitaxel instead of CHFR in non-small-cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* 10:933-941, 2010, 査読有  
DOI: 10.4161/cbt.10.9.13320
- ⑨ Yano T, Morodomi Y, Ito K, Yoshida T, Haro A, Shoji F, Koga T, Maehara Y. Verification of the newly proposed T category (seventh edition of the tumor, node, and metastasis classification) from a clinicopathological viewpoint in non-small cell lung cancer-special reference to tumor size. *J Thorac Oncol* 5:45-48, 2010, 査読有  
DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181c0996c
- ⑩ Harada T, Yatabe Y, Takeshita M, Koga T, Yano T, Wang Y, Giaccone G. Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:2638-2645, 2011, 査読有  
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3034
- ⑪ Ono M, Koga T, Ueo H and Nakano S. Effects of Dietary Genistein on Hormone-Dependent Rat Mammary Carcinogenesis Induced by Ethyl Methanesulphonate. *Nutrition and Cancer* 64:1204-1210, 2012, 査読有,  
DOI: 10.1080/01635581.2012.718035
- ⑫ Haro A, Yano T, Kohno M, Yoshida T, Koga T, Okamoto T, Takenoyama M, Maehara Y. Expression of Brachyury Gene Is a Significant Prognostic Factor for Primary Lung Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology [Epub ahead of print]*, 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-013-2914-9

[学会発表] (計 1件)

- ① 古賀孝臣、EGFR変異型肺腺癌と、CHFRメチル化陽性肺腺癌の病理学的比較検討、日本病理学会、2010年4月27日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)

- 取得状況 (計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 孝臣 (KOGA TAKAOMI)  
九州大学病院・講師  
研究者番号：70380615

(2) 研究分担者

中川 和憲 (NAKAGAWA KAZUNORI)  
九州大学・医学研究院・講師  
研究者番号：50217668  
鬼丸 満穂 (ONIMARU MIZUHO)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：00380626  
岡野 慎士 (OKANO SHINJI)  
九州大学病院・臨床助教  
研究者番号：10380429

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：