

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462182

研究課題名(和文) 肺癌のエピジェネティクス異常を標的とした化学療法耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarify of chemo-resistant mechanism in lung cancer targeting to epigenetic aberration

研究代表者

鈴木 弘行 (SUZUKI, HIROYUKI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30322340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：UHRF family分子は腺癌に比べ扁平上皮癌で明らかに発現が高いことを確認した。さらに腺癌では予後との関連が示唆され、化学療法などの治療に関する耐性等に関連する可能性が示唆された。加えて網羅的遺伝子解析を用いてUHRF familyも含めたヒト肺癌組織の主要な遺伝子発現解析を行った結果、新たな分子マーカーFAM83Bを同定した。本分子は扁平上皮癌の組織診断マーカー及び予後マーカーとなることを確認した。さらに、本分子の腺癌における分子生物学的意義を検討した結果、EGFRのwild typeの肺腺癌において増殖に關与する重要な分子であり、新たな治療標的となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：UHRF family molecules were significantly highly expressed in squamous cell carcinoma as compare with that of adenocarcinoma in lung cancer. Furthermore, these molecules might be prognostic factor and involve to chemo-resistant mechanism. Novel biomarker named FAM83B were identified by our comprehensive gene expression analysis. FAM83B could be a diagnostic and prognostic biomarker in lung squamous cell cancer. Also, FAM83B was involved to cancer proliferation in EGFR wild type lung adenocarcinoma.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 分子標的

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は我が国のみならず、世界的にみても死亡率が非常に高い難治性悪性腫瘍の一つであり、その克服は、世界のがん治療における大きな課題である。肺癌における発癌のメカニズムの解明は近年目覚しく、K-RAS や EGFR signaling の異常、さらには ALK 融合遺伝子といった Driver mutation の存在が重要と考えられている。加えて近年では DNA メチル化やヒストン修飾に関わる、いわゆる Epigenetic な異常が肺癌において注目されるようになった (Wen et al. *Modern Pathol* 2011; 24:932-43)。UHRF (ubiquitin-like plant homeodomain and ring finger domains) family (UHRF1, UHRF2) は p53 とも共同し、epigenetic code の制御・干渉の中心的役割を果たす分子と考えられ (Bronner C. *Pharmacology and Therapeutics* 2007; 115: 419-34)、細胞周期に関わる分子群や癌抑制遺伝子の発現を制御することが知られている。さらに近年ではこれらの分子の発現異常が癌化と強く関連する可能性が示唆されている。当科では肺癌における Epigenetic な異常に早くから注目し、外科治療を行った肺癌症例の摘出標本を用いて UHRF family の発現異常を検討してきた。その結果、UHRF1 の発現は正常組織では認めず、癌組織において明らかに増加しており、その発現程度には組織特異性があることを明らかにした。さらに、腺癌では予後因子となることや化学療法耐性に関わる可能性についても確認されている。一方で UHRF2 の発現は UHRF1 とは異なり、癌組織で明らかに低下していることが確認された。一般に UHRF1 は各種癌において過剰発現していることが知られるが、UHRF2 の発現についてはほとんど明らかにされていない。ごく最近、我々は肺癌における UHRF2 の遺伝子座 (9p24) の microdeletion を報告し、その欠失が癌化に関連する可能性につい

て報告した (Mori et al. *Cell Cycle* 2011; 10: 3284-99) が、乳癌では逆に UHRF2 の遺伝子座 (9p24) の増幅が報告されており (Wu et al. *Oncogene* 2012;31:333-41)、UHRF2 の異常と癌化との関連については不明な点が多い。しかしながら、UHRF2 は microRNA のひとつで肺癌形成に強く関連するとされる let-7a による癌抑制遺伝子 p21WAF1 の発現に重要であることが明らかにされているように、適切な発現レベルを維持することが、細胞の癌化抑制に重要であるものと推測している。以上のように、肺癌における癌化には UHRF family が強く関連することが想定され、本研究では UHRF family の制御による癌治療の可能性を明らかにする。

## 2. 研究の目的

各種固形がんにおける発がんや進展に種々の遺伝子の Epigenetic な異常が関わることが知られる。我々は、種々の重要な細胞増殖に関連する分子 (各種サイクリンや p21, p16 等のがん抑制遺伝子など) の Epigenetic な制御因子として注目されている UHRF family (NIRF/UHRF2 および ICBP90/UHRF1) に着目し、肺癌組織および細胞株での発現を検討し報告してきた。その結果、本分子は癌の進展や化学療法耐性に関与する可能性があることを確認している。しかし一方で、これらの分子の発現異常による癌化のメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では本分子の異常による癌化および癌進展のメカニズムを解明し、新たな治療標的としての可能性を明らかにする。加えて、肺癌組織の各種分子の発現を網羅的に解析し、新しい分子標的を抽出することも目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) UHRF family の発現解析

肺癌摘出標本 (手術時の腫瘍組織と正常肺組織の凍結標本の組織バンクと、すでに構築

済みの300例を超える mRNA 発現データベース)を用いてその発現を蛋白および転写レベルで解析する。これまでの少数例の検討では、UHRF family の発現は転写レベルと蛋白レベルに乖離がないことが解っているが、本検討ではさらに症例を増やし確認するとともに、前述した臨床的意義を明らかにするために、各種臨床病理学的因子や、予後因子との関連を確認する。本検討は既に我々が有しているデータベースや組織を用いるため、滞り無く完了できる見込みである。

## (2) UHRF family の機能解析

### ノックアウト細胞株を用いた機能解析

MEF由来のUHRF familyのノックアウト細胞株を用い、メチル化アレイ等を用い、親株とのEpigenetic Profileの違いを網羅的に解析する。これまでの検討では、UHRF family に関わる種々の分子が想定されているが、本検討により、Epigenetic change が強く表出された遺伝子群を抽出し、UHRF family の影響下にあり、増殖や抗癌剤耐性に関わる遺伝子をさらに明らかにする。さらにノックアウト細胞を用い、種々の細胞刺激を与え、形質転換実験を行い、癌化との関連を明らかにする。

### UHRF family の遺伝子改変実験

ヒト肺癌細胞株を用いてUHRF family のcDNAをベクターへ挿入した後に、各々遺伝子導入してUHRF1/2を過剰発現させ、細胞のphenotypeの変化を増殖能や浸潤能などの視点から検討、解析する。

同様にUHRF familyのsiRNAを用いて、細胞のphenotypeの変化を増殖能や浸潤能などの視点から検討、解析する。

UHRF familyによる抗癌剤耐性メカニズムの解明

1) (2) で述べたMEF由来UHRF familyのノックアウト細胞株を用い、マイクロアレイを用いUHRF familyの発現と各種耐性遺伝子の発現の関連を検討する。さらには、

UHRF familyの遺伝子導入もしくはsiRNAを用いた抑制実験によりこれらの感受性に関わる遺伝子群の発現の変化を確認。

2) 肺癌細胞株を用い、UHRF familyの遺伝子発現が抗癌剤感受性にどのように影響するかについて、臨床で頻用される各種化学療法剤を用いて検討する。

3) EGFR-TKIにおける薬剤耐性の問題は臨床的にも大きなトピックスであるが、UHRF familyがこの薬剤耐性にも関わる可能性があり、上記1.2.の手法を用いて、EGFR-TKIに対する感受性の変化を確認する。以上のステップにより、これまで知られていない新たな抗癌剤耐性メカニズムの解明と治療への展開を探る。

(4) UHRF familyを標的とした治療法の開発

UHRF1は肺腺癌の進展に関わる可能性があることは先述した。この知見を確認し、UHRF1を標的とした治療法の開発を検討する。

siRNAを用いた検討により、細胞増殖抑制の効果を確認する。

UHRF1高発現細胞をヌードマウスへ移植し、siRNAの全身投与により腫瘍縮小効果が得られるかどうかを明らかにする。

同様にNatural CompoundであるTQ投与によりマウスでの抗腫瘍効果が得られるかどうかを確認する。同時に、各種臓器における有害事象の発現も確認し、将来の臨床応用への展開を探索する。

## 4. 研究成果

本研究はUHRF family分子を中心とした肺癌のエピジェネティクス異常に関わる分子に着目し、肺癌の診断及び予後、或いは治療感受性に関わる分子の抽出同定を目的とするものである。本研究を契機に、肺癌における新たな治療標的分子の同定に繋がりたいと考えている。

これまで，UHRF family 分子の発現について，ヒト肺癌組織を対象として，mRNA レベルでその発現を検討した．その結果，肺癌組織では非癌部と比べ，UHRF1 の発現が有意に高いことを明らかにした．また，発現レベルは腺癌に比較して扁平上皮癌や小細胞肺癌では有意に高いことが確認された．これはヒト肺癌細胞株を用いた検討でも全く同様の結果が得られた（A549 腺癌細胞株 < RERF 扁平上皮癌細胞株 < Lu99 大細胞癌細胞株 < MS-1 小細胞癌細胞株の順に高発現）．さらにこれらの結果を踏まえ，ヒト肺癌組織 30 例に対し，免疫組織学的検討を加えた結果，同様に腺癌に比べ扁平上皮癌で明らかに発現が高いことが確認された．さらに腺癌では予後との関連が示唆され，化学療法などの治療に関する耐性等に関連する可能性も示唆された．加えて網羅的遺伝子解析を用いて UHRF family も含めたヒト肺癌組織の主要な遺伝子発現解析を行った結果，新たな分子マーカー FAM83B を既に同定した．本分子は肺扁平上皮癌の組織診断マーカーおよび予後マーカーとなる可能性があることを確認しており，その結果について紙上で発表した．さらに，本分子が肺癌の治療標的となり得るかどうかについて検討を行った．その結果，本分子が EGFR の wild type の肺腺癌で高発現しており，細胞株を用いた検討で本分子が肺腺癌の増殖に関与するという全く新たな知見を得るに至った．現在その下流の分子の抽出同定を始めとしたメカニズム解析を行っており，すでに国際学会において発表も行った（2016 年 4 月，米国癌学会）．

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Muto S, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Yamaura T, Fukuhara M, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Suzuki H,

Gotoh M, Clinical significance of expanded Foxp3+ Helios- regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer, *Int J Oncol*, 査読有, 47, 6, 2082-2090, 2015.

DOI: 10.3892/ijo.2015.3196

Okabe N, Ezaki J, Yamaura T, Muto S, Osugi J, Tamura H, Imai J, Ito E, Yanagisawa Y, Honma R, Gotoh M, Watanabe S, Waguri S, Suzuki H, FAM83B is a novel biomarker for diagnosis and prognosis of lung squamous cell carcinoma, *Int J Oncol*, 査読有, 46, 3, 999-1006, 2015.

DOI: 10.3892/ijo.2015.2817

Osugi J, Yamaura T, Muto S, Okabe N, Matsumura Y, Hoshino M, Higuchi M, Suzuki H, Gotoh M, Prognostic impact of the combination of glucose transporter 1 and ATP citrate lyase in node-negative patients with non-small lung cancer, *Lung Cancer*, 査読有, 88, 3, 310-318, 2015.

DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.03.004

Osugi J, Kimura Y, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Yamaura T, Fukuhara M, Muto S, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Yonechi A, Hoshino M, Higuchi M, Shio Y, Suzuki H, Gotoh M, Prognostic Impact of Hypoxia-Inducible miRNA-210 in Patients with Lung Adenocarcinoma, *Journal of Oncology*, 査読有, 316745, 2015. DOI: 10.1155/2015/316745

Suzuki H, Owada Y, Watanabe Y, Inoue T, Fukuhara M, Yamaura T, Muto S, Okabe N, Yaginuma H, Hasegawa T, Yonechi A, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Shio Y, Gotoh M, Recent advances in immunotherapy for non-small-cell lung cancer, *Hum Vaccin Immunother*, 査読有, 10, 2, 352-357, 2014.

DOI: 10.4161/hv.26919

Higuchi M, Honjo H, Shigihara T, Shishido F, Suzuki H, Gotoh M, A phase II study of radiofrequency ablation therapy for thoracic malignancies with evaluation by FDG-PET, *J Cancer Res Clin Oncol*, 査読有, 140, 11, 1957-1963, 2014.

DOI: 10.1007/s00432-014-1743-y

Higuchi M, Hasegawa T, Osugi J, Suzuki H, Gotoh M, Prognostic Impact of FDG-PET in Surgically Treated Pathological Stage I Lung Adenocarcinoma, *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 査読有, 20, 185-191, 2014. DOI: 10.5761/atcs.0a.12.02219

Higuchi M, Yaginuma H, Yonechi A, Kanno R, Ohishi A, Suzuki H, Gotoh M, Long-term outcomes after video-assisted thoracic surgery (VATS) lobectomy versus lobectomy via open thoracotomy for clinical stage IA non-small cell lung cancer, *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 査読有, 9, 88, 2014. DOI: 10.1186/1749-8090-9-88

Hasegawa T, Suzuki H, Yamaura T, Muto S, Okabe N, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Ise K, Gotoh M, Prognostic value of peripheral and local forkhead box P3+ regulatory T cells in patients with non-small-cell lung cancer, *Mol Clin Oncol*, 査読有, 2, 5, 685-694, 2014.

DOI: 10.3892/mco.2014.299

Yonechi A, Suzuki H, Sakuma H, Higuchi M, Ohsugi J, Okabe N, Muto S, Teranishi Y, Gotoh M, Prediction of recurrence for non-small cell lung cancer by combined analysis of molecular markers and 18f 2-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography, *Fukushima J Med Sci*, 査読有, 60, 1, 47-56, 2014.

DOI: 10.5387/fms.2010-20

Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, Mutoh

S, Okabe N, Yaginuma H, Hasegawa T, Yonechi A, Osugi J, Hoshino M, Kimura T, Higuchi M, Shio Y, Ise K, Takeda K, Gotoh M, Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer, *J Transl Med*, 査読有, 11, 1, 97, 2013.

DOI: 10.1186/1479-5876-11-97

Suzuki H, Ohsugi J, Hasegawa T, Yaginuma H, Okabe N, Muto S, Owada Y, Gotoh M, Predictive value of serum nitric oxide for bevacizumab response in patients with non-small cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 査読有, 31, 213, suppl, e19162, 2013.

<http://meetinglibrary.asco.org/content/111260-132>

Kanno R, Yamaura T, Higuchi M, Suzuki H, Ohishi A, Gotoh M, Well-differentiated fetal adenocarcinoma of the lung in a 20-year-old woman, *Fukushima J Med Sci*, 査読有, 59, 2, 89-92, 2013.

DOI: 10.5387/fms.59.89

Suzuki H, Current status of peptide vaccine for lung cancer, *Gan to Kagaku Ryoho*, 査読無, 40, 8, 1009-1014, 2013

[学会発表](計7件)

Higuchi M, Takagi H, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Fukuhara M, Yamaura T, Muto S, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Yonechi A, Osugi J, Hoshino M, Shio Y, Fujii K, Kanno R, Ohishi A, Suzuki H. Efficiency and tolerability of nanoparticle albumin bound paclitaxel as a late phase chemotherapy for non-small cell lung cancer. The 16th World Conference on Lung Cancer 2015.9.6-9 Denver, CO, USA

Muto S, Owada Y, Inoue T, Watanabe Y, Yamaura T, Fukuhara M, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Suzuki H, Gotoh M. Clinical feature of transcriptional factor Helios expression on regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015 2015.4.18-22 Philadelphia, PA, USA

Muto S, Suzuki H, Higuchi M, Osugi J, Hasegawa T, Yaginuma H, Okabe N, Yamaura T, Watanabe Y, Owada Y, Serum nitric oxide could be a predictor for the response of bevacizumab in patients with non-small cell lung cancer, The 15th World Conference on Lung Cancer, 2013 2013.10.27-30 Sydney, Australia.

Okabe N, Suzuki H, Higuchi M, Osugi J, Hasegawa T, Muto S, Yamaura T, Watanabe Y, Waguri S, Watanabe S, Gotoh M, FAM83B, a novel molecular target for lung squamous cell carcinoma, 1st International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology, 2013 2013.9.26 Xiamen, China

Okabe N, Suzuki H, Higuchi M, Osugi J, Hasegawa T, Muto S, Yamaura T, Watanabe Y, Owada Y, Waguri S, Watanabe S, Gotoh M, FAM83B, a novel molecular target for lung squamous cell carcinoma, The 15th World Conference on Lung Cancer, 2013 2013.10.27-30 Sydney, Australia

Higuchi M, Endo G, Konno O, Kanno

R, Ohishi A, Suzuki H. Long-term outcome and current problems of VATS versus open lobectomy for clinical stage IA non-small cell lung cancer, The 15th World Conference on Lung Cancer, 2013 2013.10.27-31 Sydney, Australia.

Suzuki H. Predictive value of serum nitric oxide for bevacizumab response in patients with non-small cell lung cancer, American Society of Clinical Oncology, 2013 2013.5.31-6.4 Chicago, IL USA.

〔図書〕(計1件)

Suzuki H, et al. Immunotherapy for cancer. Springer Japan, pp337-346, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 弘行 (SUZUKI, Hiroyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30322340

### (2) 研究分担者

森 努 (MORI, Tsutomu)

福島県立医科大学・看護学部・准教授

研究者番号：60244373

### (3) 連携研究者

大杉 純 (OSUGI, Jun)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40532528

長谷川 剛生 (HASEGAWA, Takeo)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80532530

後藤 満一 (GOTOH, Mitsukazu)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50162160