

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860275

研究課題名(和文)肺腺癌進展におけるnon-coding RNAの解析

研究課題名(英文) Exploration of long non-coding RNA involved in epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer.

研究代表者

吉本 多一郎 (Yoshimoto, Taichiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20634166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肺非小細胞癌(主に腺癌)の上皮間葉転換において重要なlong non-coding RNA(lnc RNA)を同定する事である。まず肺非小細胞癌株パネル(大部分が腺癌で、その多彩さをよく反映した40株からなり上皮型と間葉型に大別できる)から上皮型5株と間葉型10株を選出し、次世代シーケンサーで網羅的発現解析を行った。その結果、上皮型と間葉型で差があったlnc RNAから有望な12個に絞り、40株全てでTaqman RT-PCR法により検証した。現在、凍結手術検体からtotal RNAを抽出し同様の定量解析を行っている。今後は有望なlncRNAの機能解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to identify long non-coding RNAs (lncRNAs) that may play roles in epithelial mesenchymal transition (EMT) in non-small cell lung cancer (NSCLC). We used a panel of 40 NSCLC cell lines, whose characteristics, including driver mutations, gene expression profiles, and drug sensitivities, were extensively analyzed in our previous studies. Of these cell lines, 5 epithelial-phenotype and 10 mesenchymal-phenotype cell lines were subjected to transcriptome analysis by NGS. Candidate lncRNAs that showed differential expression pattern between epithelial vs. mesenchymal cell lines were selected, and the data was further validated in the whole panel of 40 cell lines using TaqMan RT-PCR analysis. At the time of this writing, we have identified 12 candidate lncRNAs. In ongoing research, we'll further validate the results by analysis of primary tumors and in vitro functional studies of these lncRNAs.

研究分野：病理学

キーワード：ノンコーディングRNA 上皮間葉転換 肺腺癌

### 1. 研究開始当初の背景

(1)肺癌は世界で最も致死的な癌とされている。最多の組織亜型である肺腺癌においては近年 EGFR 変異や ALK 融合遺伝子などドライバー変異を標的とした分子標的治療薬が一定の成果を上げる一方、未だにドライバー変異の見出せない肺腺癌が 30-40%ほどある。

(2)上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) とは、上皮細胞が一時的あるいは恒常的に上皮形質を失い間葉系の形質を獲得する現象である。EMT の gold standard である E-cadherin の発現が低下、消失した EMT 形質を示す低分化肺腺癌は通常予後が不良である。当研究室ではこれまで、EMT 形質に着目して肺腺癌細胞株パネル (実際のドライバー変異、分化形質、薬剤耐性の違いなど多彩さをよく反映した 40 株からなる) を用いて研究を展開してきた。その結果、EMT 形質を示す細胞株はドライバー変異が不明なものが多く、これらの進展にはエピジェネティック機構が関与しているであろうことが推測されていた。

(3)近年、多彩な non-coding RNA が様々な癌において重要な役割を果たしていることが報告されている。特に、長鎖 non-coding RNA (long non-coding RNA, 以下 lnc RNA) はヒストン修飾や、DNA メチル化によりエピジェネティックな転写制御に与ることが報告されており、上記の EMT 形質を示す低分化肺腺癌においても、重要な役割を担っている可能性がある。

### 2. 研究の目的

肺腺癌、とくに EMT 形質を示す予後不良な低分化肺腺癌の進展において、重要な役割をはたす lnc RNA を同定する。

### 3. 研究の方法

(1)肺腺癌細胞株 40 株のうち、上皮型形質を示す細胞株 5 株と間葉型 (EMT) 形質を示す 10 株から抽出した total RNA を次世代シーケンサーにより ncRNA 分画のトランスクリプトームシーケンシングを行い網羅的に発現を解析した (これは共同研究者の東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム病理分野 石川

俊平教授に依頼した)。

(2)上記(1)の結果、上皮型細胞株と間葉型細胞株において発現に差が見られた lncRNA の中から、有望な 12 個に候補を絞った。これら 12 個の lncRNA の発現定量解析を Taqman RT-PCR 法により、40 株のパネルすべてを用いて現在までに行った。

(3)今後は(2)の結果、有望と思われる lncRNA について、実際の肺癌手術例 (凍結サンプル) から total RNA を抽出し定量発現解析を行う予定である。

(4)上記(2)および(3)の結果をふまえ、有望な lnc RNA については細胞株を用いた機能解析 (RNAi による knock down、あるいはベクターを用いた強制発現) により、細胞形態や発現形質、細胞増殖能、apoptosis、浸潤能、EMT 関連分子の発現などに変化が出るか検証を行う予定である。

### 4. 研究成果

(1)次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析

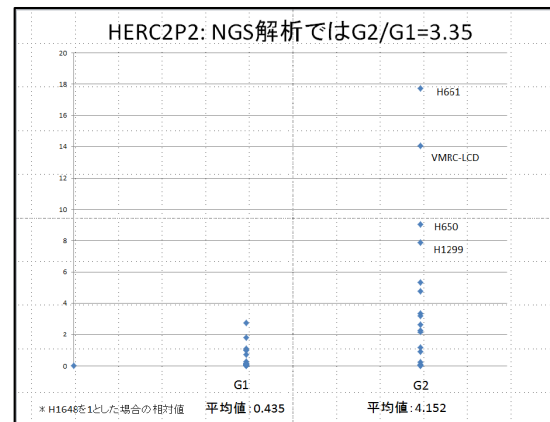
今回の解析に使用した次世代シーケンサーは、全 21473 リード中、2686 個の ncRNA 分画が含まれていた。

このうち、上皮型細胞株 5 株と間葉型細胞株 10 株それぞれの算術平均を求め、その差が大きく、かつ発現量が高いものを優先して有望な lncRNA を絞り込んだ。その結果、上皮型細胞株で有意に発現が高い 7 個 (AFAP1-AS1 など) および間葉型細胞株で有意に発現が高い 5 個 (HERC2P2 など) の合計 12 個の候補 lncRNA を選出した。

(2)Taqman Real Time PCR 法による定量的発現解析

12 個の lncRNA に対して肺腺癌細胞株 40 株 (上皮型 22 株、間葉型 18 株) のパネルを用いて Taqman Real Time PCR 法により、定量的発現解析を行った。

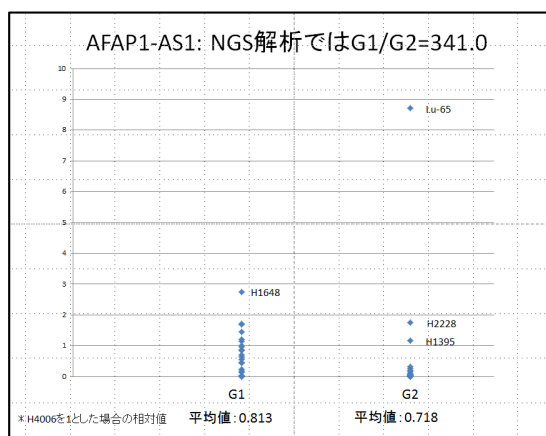
その結果、網羅的解析において間葉型細胞株で発現が高かった 5 個の lncRNA においては、Real Time PCR 法でも同様の傾向が見られた (図 1)。



(図 1: HERC2P2 の発現定量解析結果)

これに対して、(1)の網羅的発現解析において上皮型細胞株で発現が高かった 7 個の

lncRNA については、Real Time PCR 法でも同様の傾向がみられたのは 4 個にとどまった (図 2)。



(図 2 : AFAP1-AS1 の発現定量解析結果)

この原因としては、網羅的発現解析と Real Time PCR 法では認識している塩基配列が異なることが挙げられる。また細胞株数を増やした事が影響している可能性がある。ただし、個々のデータを詳細にみると、AFAP1-AS1 は、Lu65 で高く発現しており、これが間葉型細胞株の算術平均を上げている事がわかる。しかし、これまでの我々の解析で (Matsubara et al Am J Pathol. 2010) Lu65 は間葉型細胞株の群に分類したものの、その中でも上皮型に比較的近い、いわゆる中間的性質を有している細胞であることが分かっている。よって、この結果はこれまでの解析結果と必ずしも矛盾するものではない事が分かる。

よって、算術平均のみからこれらの候補 lncRNA を除外せず、これまでの我々の解析で判明している個々の細胞株の性質やコピー数変異領域との対比など多角的に評価することによって有望な lncRNA を検証する予定である。

現在、自治医科大学付属病院で外科的に切除された肺腺癌手術症例を用いて、組織形態や免疫染色結果から、上皮型肺腺癌 (30 例程度) と間葉型肺腺癌 (10 例程度) を選定している最中である。これらの凍結検体から total RNA を抽出し、上記の候補 lnc RNA について Taqman Real Time PCR 法で定量的発現解析を近日中に行う予定である。

さらに、細胞株を用いた種々の機能解析についても今年度中には終了させ、EMT に重要な lnc RNA を同定する予定である。

## 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 1 件)

Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung.

Taichiro Yoshimoto, Daisuke Matsubara, Tomoyuki Nakano, Tomoko Tamura, Shunsuke Endo, Yukihiko Sugiyama and Toshiro Niki. 査読有。

Pathol Int. 2015 Nov;65(11):595-602.

〔学会発表〕(計 9 件)  
(海外)

Altered expressions of multiple subunits of the switch/sucrose non-fermenting (SWI/SNF) complex in Non-small cell lung cancer

American Association for Cancer Research, Atlanta, September 25-27, 2015.

Taichiro Yoshimoto, Daisuke Matsubara, Toshiro Niki.

(国内)

(1) 吉本多一郎, 松原大祐, 佐久間裕司, 仁木利郎。「肺癌における上皮間葉転換 (EMT) の分子機構: クロマチンリモデリング因子ならびに EGFR 変異との関連性の検討」

第 10 回日本病理学会カンファレンス  
2013 年 8 月 2~3 日, 六甲山ホテル(兵庫県神戸市)

(2) 吉本多一郎, 松原大祐, 佐久間裕司, 仁木利郎。「肺癌における上皮間葉転換の分子機構」

第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3~5 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(3) 吉本多一郎, 松原大祐, 坂谷貴司, 福嶋敬宜, 仁木利郎。「非小細胞肺癌におけるクロマチンリモデリング因子(BRG1, BRM, ARID1A, ARID1B, BAF47) の発現異常について」

第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25~27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(4) 吉本多一郎, 松原大祐, 中野智之, 天野雄介, 福嶋敬宜, 仁木利郎。「Xenograft モデルを用いた肺腺癌における癌・間質相互作用の検討」

第 12 回日本病理学会カンファレンス  
2015 年 7 月 24~25 日, 六甲山ホテル(兵庫県神戸市)

(5) 吉本多一郎, 松原大祐, 仁木利郎。「肺腺癌進展における non coding RNA の解析」

第 14 回自治医大シンポジウム  
2015 年 9 月 2~3 日, 自治医科大学 (栃木県下野市)

(6) 吉本多一郎、松原大祐、福嶋敬宜、仁木利郎。「Frequent mutation of SWI/SNF complex genes in lung cancer cell lines with EMT-phenotype」

第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 12 ~ 14 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

(7) 吉本多一郎、松原大祐、河村大輔、石川俊平、仁木利郎。「肺腺癌 Xenograft model における癌間質相互作用の包括的解析」

第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 ~ 7 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(8) 吉本多一郎、松原大祐、河村大輔、石川俊平、仁木利郎。「系統的肺腺癌 Xenograft model を用いた癌間質相互作用の解析（インターラクトーム解析）」

第 57 回日本肺癌学会総会 2016 年 12 月 19 ~ 21 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

〔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

<http://www.jichi.ac.jp/pathol/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 多一郎 (YOSHIMOTO, Taichiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20634166