

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461195

研究課題名(和文) 網羅的miRNA解析による非小細胞肺癌浸潤転移規定因子同定と治療への応用

研究課題名(英文) Identification of a factor determining invasion and metastasis in non-small cell lung cancer and its therapeutic application based on comprehensive microRNA analysis

研究代表者

小山 信之 (NOBUYUKI, KOYAMA)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30353460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの小細胞肺癌外科切除検体でEZH2の高発現と上皮間葉転換(EMT)誘導がみられたため、EZH2高発現小細胞肺癌細胞株のSBC3とSBC5へEZH2 siRNAを導入しEMTの抑制を確認した上、網羅的マイクロRNA(miRNA)発現解析を行った。EZH2 siRNAを導入した両細胞株で発現が変化した複数のmiRNAを検出し、最も有意に発現が亢進したmiR-4448を候補miRNAとした。miR-4448のmimicを両細胞株に導入することでEMT、細胞増殖・浸潤・転移能が抑制されることを確認した。EZH2はmiR-4448発現抑制によるEMT誘導を介して癌遺伝子の機能を発揮すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：High protein expressions of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) and the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) were observed in most cases of small cell lung cancer (SCLC). EZH2 siRNA was transfected into SCLC cell lines, SBC3 and SBC5 cells with high EZH2 expression, consequently leading to the repression of EMT. Comprehensive microRNA (miRNA) expression analysis detected increased or decreased expressions of multiple miRNAs in SBC3 and SBC5 cells transfected with EZH2 siRNA. Of these miRNAs, miR-4448 that showed the most significant increase of expression was defined as a candidate miRNA for the target of EZH2. Functional analyses for miR-4448 showed that along with EMT, cellular proliferative, invasive, and metastatic potentials were significantly repressed in SBC3 and SBC5 cells transfected with mimics of miR-4448, compared to those transfected with negative controls. EZH2 may serve as an oncogene that induces EMT through repressing miR-4448 expression and its function.

研究分野：呼吸器腫瘍学

キーワード：肺癌 EZH2 siRNA マイクロRNA 網羅的発現解析 miR-4448

1. 研究開始当初の背景

Enhancer of zeste homolog 2 (以下 EZH2) はポリコムタンパク質という遺伝子発現調節タンパク複合体の構成因子として、主にエピジェネティックな遺伝子発現調節に関与している。EZH2 はヒストン H3 コアタンパク質にある 27 番目のリジンをメチル化してその領域にある遺伝子の転写を抑制し、結果として細胞の分化・増殖などを制御していると考えられている。EZH2 はまた、様々な分子との相互作用により上皮間葉転換(以下 EMT)にも深く関与していることが報告されている。さらに EZH2 が複数の癌において増殖・浸潤などと強く関連し、その発現が予後と関連することがこれまでに報告されてきた。我々は以前、EZH2 蛋白の発現が 1 期非小細胞肺癌の予後と有意に相関し、invitro の研究においても EZH2 が肺癌の増殖、浸潤、転移を促進していることを報告した。他の癌腫も含めた過去の報告においても、EZH2 の高発現が予後不良と関連していることが示されている。以上から EZH2 は腫瘍の増殖、浸潤、転移を促す癌遺伝子と考えられているが、これまでの報告から、その機能発現には EMT の制御を介している可能性が示唆されている。一方、EMT が癌の増殖、浸潤、転移に関与しているのは広く知られており、その機構の少なくとも一部はマイクロ RNA (以下 miRNA) により制御されていることも報告されている。これまでに肺癌の 10-20% を占め、特に著しい増殖能・浸潤能・転移能を有し、EMT がその機能に強く関与していることが示唆されている小細胞肺癌(以下 SCLC)においては、EZH2 の病態への関係を示唆する過去の報告は散見されるものの、予後、臨床病理学的特徴との関連に一定の見解はない。さらに SCLC の発症、進展、転移等における分子病態に対する EZH2 の関与も不明である。

2. 研究の目的

SCLC において、その臨床病理学的特徴および生物学的特徴と EZH2 との関連性を明らかにするとともに、SCLC の病態における EZH2 の意義を検証して、EZH2 の癌遺伝子としての機能発現のメカニズムを解明する。特に SCLC における EZH2 の EMT 制御をはじめとする機能発現に際しての miRNA の状態および機能に注目してその関与を探索するとともに、EZH2 と EMT、miRNA との関係についても解析・調査する。

3. 研究の方法

本研究は、本学遺伝子倫理委員会承認後に開始した。

免疫組織化学：SCLC における EZH2 蛋白発現を評価するために、当院で外科的生検・切除により小細胞肺癌と病理診断された 34 例の

病理組織検体を用いた。また対照として、当院で外科的生検・切除にて非小細胞肺癌(腺癌、扁平上皮癌)と病理診断された症例で SCLC と病期を一致させた病理組織検体も用いた。パラフィン包埋された検体の薄切切片(各 5-10 枚程度)に対して、抗ヒト EZH2 モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。EZH2 蛋白発現の評価としては過去の報告に従い、染色強度を 0(negative)、1(weak)、2(moderate)、3(strong)に分類した。さらに染色陽性細胞の割合を 0(negative)、1(<10%)、2(11-50%)、3(51-80%)、4(>80%)に分類し、染色強度と染色陽性細胞の割合を乗じた数値(The immunoreactive score; IRS)から、最終的に 0(無発現群)、1-3(低発現群)、4、6(中発現群)、8、9、12(高発現群)に EZH2 発現レベルを分類した。各症例の臨床情報、病理学的特徴を EZH2 発現レベルで分類した各群間で比較解析し、EZH2 発現との関係を調査した。

細胞株：小細胞肺癌細胞株(SBC1、SBC3、SBC5)および非小細胞肺癌細胞株(RERF-LCAd2、H1975、H1650、H2228、PC-3、RERF-LC-Sq1、RERF-LC-A1、LC2/ad、NCI-H1299、A549)を用いた。規定した条件下における対象細胞株から Total RNA と蛋白を抽出した後、転写発現解析として、QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System を用いたりアルタイム PCR により各遺伝子の発現レベルを解析した。また後述のように網羅的 miRNA 解析も行った。さらに蛋白発現解析として、目的とする蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

標的 miRNA 同定：EZH2 の高発現がみられ、EMT の誘導が著明な SCLC 細胞株である SBC3 と SBC5 に対して、EZH2 siRNA または陰性コントロールとなる siRNA を導入した後、各細胞株から Total RNA を抽出して GeneChip® miRNA Array を用いた網羅的 miRNA 発現解析を行った。EZH2 siRNA を導入した細胞株において、共通して有意に発現の亢進または低下がみられた miRNA を候補 miRNA とした。

EMT 評価：対象となる各細胞株から Total RNA と蛋白を抽出し、リアルタイム PCR とウエスタンブロットを用いて上皮系マーカーである E-カドヘリンと間葉系マーカーであるビメンチンの発現変化を確認することにより、EMT の誘導または抑制を評価した。

Cell growth assay：対象となる細胞株の増殖、生存状態を経時的に Cell Counting Kit-8

を用いて測定した。

Matrigel invasion assay: Matrigel Invasion Chamber 上に対象となる細胞株を播き、浸潤した細胞の割合を測定して、浸潤・転移能を評価した。

4. 研究成果

34 例の SCLC 全例で EZH2 発現が認められ、平均 IRS 9.56 と、対照として解析した腺癌(IRS 4.45)、扁平上皮癌(3.82)と比較して有意に高発現を示した($p < 0.0001$)。また EMT における上皮系マーカーである E-カドヘリン発現は SCLC (IRS 6.32) で有意に低下していた(腺癌 IRS 10.91; 扁平上皮癌 IRS 9.56)。以上から多くの SCLC では、EZH2 高発現と EMT 誘導が高率にみられることが示された。また細胞株においても同様の所見がみられることを、複数の SCLC 細胞株を用いて確認した。多くの SCLC では EZH2 が高発現しているとともに EMT 誘導に伴う細胞増殖・浸潤・転移機能が著明である一方、EZH2 は EMT を誘導することが知られており、さらにその機構には miRNA が関与していることがこれまでに報告されている。そのため EZH2 の miRNA を介した EMT 誘導が SCLC の分子病態において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで EZH2 高発現 SCLC 細胞株である SBC3 と SBC5 を用いて、各細胞株に EZH2 siRNA と陰性コントロール siRNA を導入した。リアルタイム PCR およびウエスタンプロットを用い、EZH2 siRNA 導入細胞株において EZH2 発現が抑制されていることを確認するとともに、E-カドヘリン発現の亢進と EMT における間葉系マーカーであるビメンチン発現の低下が認められ、EMT が抑制されていることも示した。その後 EZH2 siRNA と陰性コントロール siRNA を各々導入した SBC3、SBC5 の各細胞株から抽出した Total RNA を用いて、網羅的 miRNA 発現解析を行った。網羅的 miRNA 発現解析の結果から、EZH2 siRNA 導入細胞株にて複数の miRNA の発現が亢進または低下していることが判明し、その中で最も有意に発現の

亢進がみられた miR-4448 を、EZH2 の新たな標的 miRNA の候補とした。なお miR-4448 を含め発現に有意な変化がみられた miRNA については、EZH2 発現ベクターの導入により EZH2 を過剰発現させた SBC3 と SBC5 において、EZH2 siRNA を導入した細胞株とは逆の発現パターンを示すことを確認した。

miR-4448 を本研究の目的とする miRNA の候補とし、miR-4448 に対する機能解析を行うため、miR-4448 に対する mimic (標的の miRNA と同様の機能を示す 2 本鎖 RNA ヌクレオチド) を作製し、SBC3、SBC5 の各小細胞肺癌細胞株に導入した。リアルタイム PCR を用いて mimic の導入により miR-4448 が過剰発現していることを確認する一方、陰性コントロールとなる 2 本鎖 RNA ヌクレオチドを導入することにより、miR-4448 の発現が変化しないことも確認した。その後 mimic を導入した細胞株においてリアルタイム PCR とウエスタンプロットを用い、E-カドヘリンの発現亢進とビメンチンの発現低下を確認し、miR-4448 が EMT を抑制することを示した。さらに SBC3、SBC5 の各細胞株に対して、mimic 導入、陰性コントロール 2 本鎖 RNA ヌクレオチド導入、無処理、の各条件下で Cell growth assay と Matrigel invasion assay を行った。その結果 miR-4448 に対する mimic を導入した SBC3、SBC5 では、他の条件の SBC3、SBC5 と比較して増殖・浸潤・転移能が有意に低下していることを確認した。

以上から SCLC における EZH2 の癌遺伝子としての機能は、miR-4448 の発現を抑制することによる EMT の制御を介した細胞増殖・浸潤・転移であることが示唆された。

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 8 件)

1. Koyama N, Watanabe Y, Iwai Y, Kawamura R, Miwa C, Nagai Y, Hagiwara K, Koyama

- S. Distinct benefit of overall survival between patients with non-small cell lung cancer harboring *EGFR* exon 19 deletion and exon 21 L858R substitution. *Chemotherapy*. 62; 151–8: 2017. DOI: 10.1159/000454944.
2. Watanabe Y, Koyama N, Iwai Y, Kawamura R, Miwa C, Nagai Y, Koyama S. Successful alectinib treatment for a mechanically ventilated patient with *ALK*-positive non-small cell lung cancer. *Ann Cancer Res Ther*. 24; 47–51: 2016.
 3. Yamane Y, Shiono A, Ishii Y, Isobe K, Miyauchi E, Kishi K, Nishino M, Sugawara S, Ko R, Koyama N, Yabuki Y, Kobayashi K. Treatment and outcomes of advanced/recurrent non-small cell lung cancer harboring the *EGFR* T790M mutation: a retrospective observational study of 141 patients in Japan. *Jpn J Clin Oncol*. 46; 1135–42: 2016.
 4. 伊藤祥子, 白石守, 岩井悠希, 三輪千尋, 渡辺恭孝, 小山信之, 野首光弘, 賀古真一, 小山信一郎; メトトレキサート関連リンパ腫様肉芽腫症の一部検例・自治医科大学紀要 38; 65–9: 2016.
 5. 小山信之 *EGFR* 遺伝子変異陽性進行非小細胞肺癌に対する治療戦略 東京医科大学雑誌 74; 256–67: 2016.
 6. Koyama N, Suzuki M. Clinical and biological significance of erlotinib therapy after pemetrexed in non-small cell lung cancer with wild-type *EGFR*. *Neoplasma*. 62; 996–1004: 2015.
 7. 川村留美, 渡辺恭孝, 岩井悠希, 白石守, 三輪千尋, 小山信之, 小山信一郎; 一過性肺浸潤を認めた血管内悪性リンパ腫の1例・気管支学 37; 649–55: 2015.
 8. Koyama N. Adverse cardiovascular events predict survival benefit in non-small lung cancer patients treated with bevacizumab. *Cancer Biomark*. 14; 259–265: 2014.
- 〔学会発表〕(計 22 件)(総会のみ)
1. 岩井悠希、渡辺恭孝、工藤史明、三輪千尋、長井良昭、太田洋充、小山信一郎、萩原弘一、小山信之 当院の進展型肺小細胞癌における間質性肺炎の有無の影響および予後因子の検討 *肺癌* 56; 836: 2016 (第 57 回日本肺癌学会学術集会 P-3-282 2016/12/21)
 2. 小山信之、渡辺恭孝、長井良昭、岩井悠希、川村留美、三輪千尋、工藤史明、萩原弘一、小山信一郎 *EGFR* 遺伝子変異非小細胞肺癌における Exon19 欠失の全生存期間延長 *肺癌* 56; 658: 2016 (第 57 回日本肺癌学会学術集会 P-1-406 2016/12/19)
 3. 笠井尚、森清志、小山信之、星永進、中山光男、小林国彦 進行肺扁平上皮癌に対する nedaplatin+nab-paclitaxel 併用第 I/II 相試験 KRSG (関東呼吸器研究会) 1302 study *肺癌* 56; 510: 2016 (第 57 回日本肺癌学会学術集会 O-1-24 2016/12/19)
 4. Iwai Y, Koyama N, Watanabe Y, Miwa C, Nagai Y, Koyama S. Effectiveness of nab-paclitaxel for malignant effusion in non-small cell lung cancer. *ESMO Asia 2016 Congress* 472P 2016/12/18)
 5. 石川裕子、小山信之、後藤哲宏、佐々木健志、天谷圭吾、矢野正雄 町田市と南町田病院における乳癌検診の現状 *J Jpn. Assoc. Breast Cancer Screen*. 24; 307: 2015 (第 26 回日本乳癌検診学会学術総会 O-071 2016/11/4)
 6. 石川裕子、小山信之、高坂聡、天谷圭吾、柴崎ゆかり、森田春菜、吉元公一、奥山清、三坂武温、林光弘 乳癌化学療法におけるベグフィルグラスチム使用に対する後ろ向き検討・

- 2016/10/21 (第54回日本癌治療学会学術集会 P29-1)
7. Watanabe Y, Hagiwara K, Koyama N. Overall survival benefit in non-small cell lung cancer harboring EGFR exon 19 deletion. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Program 191: 2016 (第75回日本癌学会学術総会 P-2342 216/10/7)
 8. 岩井悠希、渡辺恭孝、川村留美、三輪千尋、長井良昭、萩原弘一、小山信一郎、小山信之 進行非小細胞肺癌胸腹水貯留例のnab-PTXの効果の検討 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会プログラム 130: 2016 (第14回日本臨床腫瘍学会学術集会 P-1-121 2016/7/28)
 9. 岩井悠希、渡辺恭孝、川村留美、三輪千尋、長井良昭、小山信之、小山信一郎、野首光弘 経気管支肺生検で診断された血管内大細胞型リンパ腫の2例・気管支支 38 Supplement; S369: 2016 (第39回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 P-55-5 2016/6/24)
 10. Okuma Y, Ko R, Shukuya T, Tateishi K, Imai H, Miyauchi E, Fujiwara A, Sugiyama T, Azuma K, Muraki K, Yamasaki M, Tanaka H, Takashima Y, Soda S, Ishimoto O, Koyama N, Kuyama S, Murase K, Morita S, Takahashi K. Prognostic factors in patients with advanced thymic carcinoma treated with chemotherapy: a retrospective analysis of 289 patients from NEJ023 Study. J Clin Oncol 34: 2016 (supple; abstr 8567 2016/6/3) Proceedings of the 2016 Annual Meeting of the American Society of Clinical OncologyA; 2016 June 3-7; Chicago, IL.
 11. 岩井悠希、小山信之、渡辺恭孝、三輪千尋、長井良昭、萩原弘一、小山信一郎 間質性肺炎合併小細胞肺癌における治療の検討・日本呼吸器学会誌 5; 211: 2016 (第56回日本呼吸器学会学術講演会 PP236 2016/4/9)
 12. 岩井悠希、小山信之、川村留美、三輪千尋、渡辺恭孝、長井良昭、萩原弘一、小山信一郎、鈴木栄 当院における短時間少量補液(short hydration [SH])を用いたシスプラチン併用化学療法的安全性・有効性の検討・肺癌 2015 (第56回日本肺癌学会総会)
 13. 長井良昭、渡辺恭孝、岩井悠希、野村基子、川村留美、三輪千尋、小山信之、萩原弘一、小山信一郎 EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対しEGFR-TKI 投与後の再燃部位の検討・肺癌 2015 (第56回日本肺癌学会総会)
 14. 渡辺恭孝、小山信之、岩井悠希、川村留美、三輪千尋、長井良昭、萩原弘一、小山信一郎 人工呼吸器管理中にアレクチニブを開始し著効した ALK 陽性肺腺癌の1例・肺癌 2015 (第56回日本肺癌学会総会)
 15. Watanabe Y, Koyama N, Muto Y, Suzuki K, Ishikawa Y, Hagiwara K. Relationship between expression of enhancer of EZH2 and EMT in small cell lung cancer. 2015 (第74回日本癌学会学術総会)
 16. 鈴木栄、新津京介、北弥生、小山信之、堀口久光 エルロチニブによる皮膚障害対策に対する予防効果の検討・2015 (第45回日本病院薬剤師会学術大会)
 17. 渡辺恭孝、小山信之、岩井悠希、野村基子、川村留美、三輪千尋、長井良昭、小山信一郎 EGFR-TKI が投与されたEGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の再燃の検討・2015 (第13回日本臨床腫瘍学会学術集会)

18. 岩井悠希、渡辺恭孝、野村基子、川村留美、三輪千尋、長井良昭、小山信之、小山信一郎 当院における高齢者非小細胞肺癌に対する EGFR-TKI 使用症例の検討・日本呼吸器学会誌 2015 (第 55 回日本呼吸器学会学術講演会)
19. Watanabe Y, Koyama N, Iwai Y, Miwa C, Koyama S. Abundant expression of enhancer of zeste homolog 2 in small cell lung cancer. The 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015
20. 渡辺恭孝、小山信之、岩井悠希、白石守、川村留美、三輪千尋、坪地宏嘉、遠藤俊輔、小山信一郎 小細胞肺癌切除 34 症例の臨床的検討・日本呼吸器学会誌 2014 (第 55 回日本肺癌学会総会)
21. 渡辺恭孝、小山信之、岩井悠希、白石守、三輪千尋、坪地宏嘉、遠藤俊輔、小山信一郎 小細胞肺癌切除 27 症例の臨床的検討・日本呼吸器学会誌 2014 (第 54 回日本呼吸器学会学術講演会)
22. 白石守、小山信之、岩井悠希、三輪千尋、渡辺恭孝、矢部寛樹、寺井千尋、野首光弘、土橋洋、小山信一郎 当院の MPO-ANCA 陽性症例における肺病変の検討・日本呼吸器学会誌 2014(第 54 回日本呼吸器学会学術講演会)

〔図書〕(計 3 件)

1. Koyama N. Drug-Induced Lung Injury Induced by Molecular Target Antineoplastic Drug. *Drug-Induced Lung Injury*. In Press.
2. 長井良昭、小山信之；肺癌薬物療法の進歩と支持療法 呼吸と循環 医学書院 64; 193-7: 2016.
3. Koyama N ; Chapter 14 Common pathways in IPF and lung cancer. Idiopathic Pulmonary Fibrosis - Advances in Diagnostic Tools and Disease Management

Nakamura H and Aoshiba K. 217-47: 2015.

4. 小山信之；間質性肺炎合併肺癌の治療 呼吸と循環 医学書院 62; 1102-8: 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別： 国内

〔その他〕
 ホームページ等
 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 信之 (KOYAMA, Nobuyuki)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30353460

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

遠藤俊輔 (ENDOU, Shunsuke)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10245037

石川 雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)

癌研究会・病理部・部長

研究者番号：80222975

坪地 宏嘉 (TSUBOCHI, Hiroyoshi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50406055

(4) 研究協力者

渡辺 恭孝 (WATANABE, Yasutaka)