

令和 5 年 11 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22617

研究課題名（和文）部分的上皮間葉細胞転換（ハイブリッドEMT）の安定化因子を標的とする肺癌治療

研究課題名（英文）Development of therapeutics for lung cancer that target factors stabilizing epithelial-to-mesenchymal transition

研究代表者

佐藤 光夫（Sato, Mitsuo）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：70467281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：上皮間葉細胞転換（epithelial to mesenchymal transition, EMT）は癌細胞が上皮系から間葉系へ転換し悪性度を増強する現象である。本課題はEMTの抑制因子および安定化因子として知られるGRHL2遺伝子の肺癌における役割の解明を目的とした。GRHL2発現は肺癌細胞の上皮性性質と相関し、肺癌組織において、正常肺組織と比較すると高発現した。肺癌細胞株および不死化正常気管支上皮細胞株におけるGRHL2ノックダウン実験は増殖促進および抑制の両者を示した。これらの結果はGRHL2がEMT抑制因子として機能するにもかかわらず癌促進的な作用も併せ持つことを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間葉細胞転換（epithelial to mesenchymal transition, EMT）は癌細胞が上皮系から間葉系へ転換し悪性度を増強する現象である。EMTの制御による癌治療の実現にはEMTのさらなる機序解明が必要である。本課題はEMT抑制遺伝子として知られるGRHL2がEMT抑制因子として機能するにもかかわらず癌促進的な作用も併せ持つことを示した。EMTの機序解明における新たな知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon where cancer cells convert from the epithelial to the mesenchymal cells, leading to enhanced the malignancy. The purpose of this study was to elucidate the role of the GRHL2 gene, which is known as an EMT inhibitor and stabilizer. GRHL2 expression correlates with the epithelial properties of lung cancer cells and is highly expressed in tumor tissues of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma compared to normal lung tissue. GRHL2 knockdown by RNA interference in lung cancer cell lines and immortalized normal bronchial epithelial cell lines resulted in promotion and suppression of proliferation. These results suggest that GRHL2 functions as an EMT inhibitor but also has a cancer-promoting effect.

研究分野：肺癌

キーワード：上皮間葉細胞転換 肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌治療は近年の分子標的治療薬、免疫治療薬の登場により大きな治療成績改善を遂げた。しかし、根治は稀であり、さらなる治療標的の探索が必要である。代表者は以下の経緯から本課題を着想した。

代表者は留学中に肺癌の多段階発癌の機序解明を目的とし、不死化した正常気道上皮細胞からヒト肺癌の発癌モデル HBEC を開発した[1]。ヒト非小細胞肺癌のすべての病理像のマウス皮下における再現に世界で初めて成功し、正常気道上皮細胞の発癌の最終段階において、上皮間葉細胞転換（EMT）が必須であることも証明した[2]。

さらに、複数の EMT 誘導転写因子の中で特に、*ZEB1* が肺癌および中皮腫細胞の EMT において重要であることを見出した[3, 4]。これらの EMT 関連実験の中で興味深いデータを得た。間葉系の特徴を持つ肺癌細胞において *ZEB1* をノックダウンすると間葉系からハイブリッド EMT 状態へ変化した。しかし、予想に反しマウス皮下における移植腫瘍形成能は EMT の程度が減弱したにもかかわらず増強した。

また、他の既報論文が前述の代表者準備データと合致する知見を報告し、これらは従来までの理解とは異なりハイブリッド EMT 状態の悪性度が最も高いことを示唆する[5]。

さらに、ライス大学 Jolly らは、ハイブリッド EMT の制御機序解明を目的とし、シミュレーション解析を行い、ハイブリッド EMT 状態の細胞が容易に上皮系や間葉系に移行せず安定するためには、既知の EMT 制御分子に加えて、“形質安定化因子”の働きが必要であると推測している[6]。

以上より、ハイブリッド EMT を安定化する未知の因子の存在が推測され、これは癌の悪性形質を決定する有望な治療標的の可能性がある。そこで、肺癌研究において実績のある HBEC 細胞を使用して、肺癌治療標的としての“形質安定化因子”の発見およびその機能評価を目的とする本研究を着想した。本課題では形質安定化因子”としての報告がある *GRHL2* に焦点を当てた[6]。

2. 研究の目的

EMT における“形質安定化因子”として報告された *GRHL2* の肺癌における役割解明を目的とする。

3. 研究の方法

3.1 細胞培養

肺癌細胞株の培養は 10% ウシ胎児血清(FCS)を添加した RPMI-1640 (富士フィルム和光純薬株式会社, Cat#189-02025) を使用し、5% CO₂ インキュベーター内で実施した。HBEC4 は EGF (gibco, Cat#10450-013) と BPE (gibco, Cat#13028-014) を添加した KSFМ (gibco, Cat#17005042) を使用した。

3.2 遺伝子ノックダウン実験

siRNA (最終濃度 6.67nM) をトランスフェクション試薬 (Lipofectamine RNAiMAX, Life Technologies Corp., Cat#13778-150) を用いて一時的に導入し、ノックダウンを行った。*GRHL2* のノックダウンは配列の異なる 2 種類の siRNA (GRHL2 Silencer Select Pre-designed siRNA, Ambion, Cat#4427037) を使用し、それぞれを siGRHL2-①(ID: s36754)、siGRHL2-②(ID: s36755) とした。また、陰性コントロールを siNC (Silencer Select Negative Control#1 siRNA, Ambion, Cat# 4390843) とした。

3.3 細胞増殖アッセイ

WST-1 試薬 (Roche, Cat#11644807001) を用いた吸光度の測定により、細胞の増殖を定量した。ノックダウン細胞を 10,000/well で 96well プレートにプレートし、2~3 日培養した後、

WST-1 試薬を加え吸光度を測定した。対照細胞とノックダウン細胞間で t 検定を行うことで増殖を評価した。

3.4. 液体コロニーアッセイ

ノックダウン細胞を 500/well ずつ 6 well プレートにプレートし、14 日培養後、メチレンブルーで染色を行った。染色されたコロニーの数をカウントし、対照細胞とノックダウン細胞間で t 検定を行った。

3.5. ウェスタンブロット

各肺癌細胞株における *GRHL2* タンパクの発現を調べ、使用する細胞株を決定し、それらの細胞株における *GRHL2* 遺伝子の効率的なノックダウンを確認した。1 次抗体として *GRHL2* 抗体 (abcam, Cat#ab88631)、Actin 抗体 (SIGMA, Cat#A2228)、Vimentin 抗体 (BD Biosciences, Cat#550513)、E-cadherin 抗体 (BD Biosciences, Cat#610181) の 4 種類を用いた。Actin はタンパクローディングのコントロール、Vimentin は間葉系のマーカー、E-cadherin は上皮系のマーカーとして使用した。2 次抗体としてマウスモノクローナル抗体 (GE Healthcare, Cat#NA931-1ML) を使用した。

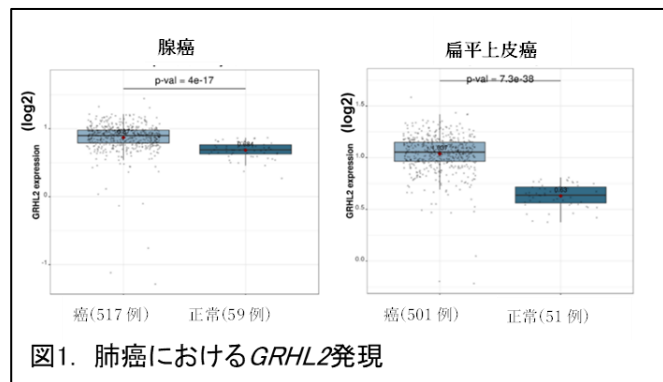
3.6. 統計

2 群間の統計学的比較には、マイクロソフトエクセルを用いたスチューデントの t テストを実施した。遺伝子発現量解析でのクロス表の独立検定には、fisher's の正確確率検定を用いた。Cox 回帰分析の適合度検定には Wald 検定を用いた。

4. 研究成果

4.1. *GRHL2* 遺伝子は肺癌において高発現

Bioinformatics 解析を online ツールである、Lung Cancer Explorer (LCE) を用いて行った。癌ゲノムプロジェクトとして公開されている TCGA コホートを使用して、肺癌と正常肺における *GRHL2* 発現を解析した。腺癌および扁平上皮癌において、正常肺組織と比較すると *GRHL2* が高く発現していることが確認された (腺癌 : $p=4e-17$ 、扁平上皮癌 : $p=7.3e-38$) (図 1) [7]。



腺癌

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
Sex						
Female	Reference			Reference		
Male	0.9058	0.632-1.298	0.5903	0.8083	0.5362-1.219	0.3097
Age, years						
>65	Reference			Reference		
≤65	0.7696	0.5353-1.107	0.1575	0.6787	0.4589-1.004	0.0522
Smoking status						
Never	Reference			Reference		
Former	0.9214	0.5095-1.666	0.7864	1.2300	0.6490-2.332	0.5255
Current	0.7176	0.3668-1.404	0.3324	0.7643	0.3741-1.561	0.4609
Stage						
I	Reference			Reference		
II	2.516	1.582-4.002	<0.0001*	3.0790	1.8620-5.091	<0.0001*
III	4.426	2.774-7.062	<0.0001*	4.8250	2.9390-7.922	<0.0001*
IV	3.266	1.665-6.407	0.0006*	4.4210	2.1770-8.981	<0.0001*
GRHL2 mRNA						
Low	Reference			Reference		
High	0.9162	0.6413-1.309	0.1575	0.9025	0.6140-1.327	0.6018

*P<0.05. GRHL2 expression levels were classified as high and low with median as the cut-off value. HR, hazard ratio; GRHL2, grainy-head-like 2; CI, confidence interval.

扁平上皮癌

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
Sex						
Female	Reference			Reference		
Male	1.038	0.7188-1.498	0.8434	1.0120	0.6924-1.478	0.9528
Age, years						
>65 years	Reference			Reference		
≤65 years	0.767	0.5447-1.080	0.1286	0.6727	0.4708-0.9611	0.0294
Smoking status						
Never	Reference			Reference		
Former	0.4628	0.1695-1.264	0.1327	0.4100	0.1462-1.150	0.0903
Current	0.5929	0.2114-1.663	0.3205	0.5453	0.1894-1.570	0.2611
Stage						
I	Reference			Reference		
II	1.202	0.8161-1.771	0.3514	1.1420	0.7654-1.704	0.5150
III	1.499	0.9979-2.251	0.0512	1.6030	1.060-2.424	0.0254
IV	2.042	0.6373-6.542	0.2295	1.8550	0.5745-5.992	0.3014
GRHL2 mRNA						
Low	Reference			Reference		
High	1.008	0.7317-1.387	0.963	0.9540	0.6845-1.330	0.7812

GRHL2 expression levels were classified as high and low with median as the cut-off value. HR, hazard ratio; CI, confidence interval; GRHL2, grainy-head-like 2.

表1. 肺癌における臨床病理学的項目と生命予後の関連(TCGA コホート)

4.2. *GRHL2*発現は肺腺癌における生命予後良好因子である

TCGA コホートでの腺癌、扁平上皮癌における cox 回帰分析の単変量解析、多変量解析を示す。*GRHL2*発現量は中央値をカットオフとして、低発現 (Low) と高発現 (High) に分類した。腺癌、扁平上皮癌のいずれにおいても、単変量解析、多変量解析の両者において、*GRHL2*発現と予後との関連はなかった (表1) [7]。

4.3. *GRHL2*発現は大部分のマスターEMT 誘導転写因子と逆相関する

*GRHL2*遺伝子の発現と EMT 関連遺伝子である *CDH1*(*E-cadherin*)、*VIM*、*ZEB1*、*ZEB2*、*SNAI1*、*SNAI2*の発現との相関解析を行った。2つの遺伝子における発現の相関程度の強弱を赤紫と青の度合いで表示している。最も濃い紫が相関 1.0、最も濃い青が相関-1.0を示す。*GRHL2*発現は *CDH1*発現と正相関し、その他の EMT 関連遺伝子の発現とは逆相関を示した。扁平上皮癌では、腫瘍例で *GRHL2*発現と *SNAI2*発現が正相関を示した (図2) [7]。

4.4. *GRHL2*遺伝子のノックダウンは肺癌細胞株においてリン酸化 AKT, リン酸化 ERK の発現を増強したが増殖への影響は一定しなかった

不死化正常気管支上皮細胞株 HBEC4 および肺癌細胞株 H1975, H2009 において *GRHL2*のノックダウン実験を実施した。いずれの細胞においても増殖促進因子であるリン酸化 AKT, リン酸化 ERK の発現を増強した (図3) [7]。しかし、増殖への影響は不変、促進、抑制とさまざまであった (図4) [7]。

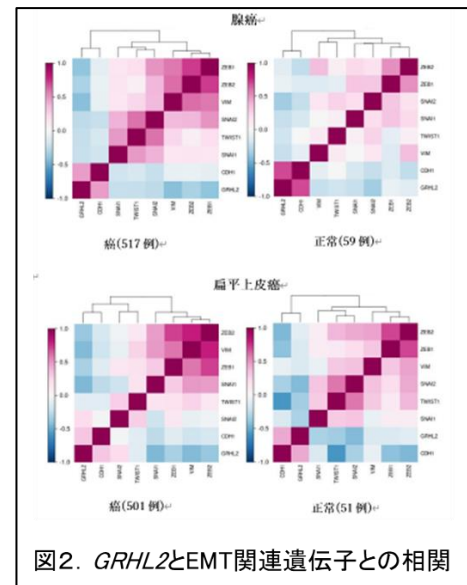
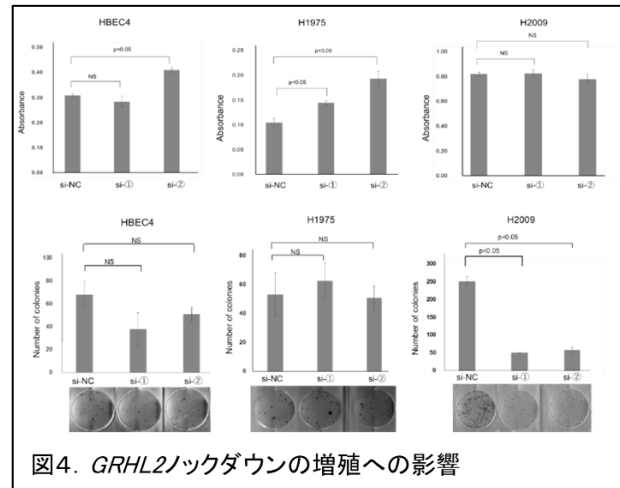
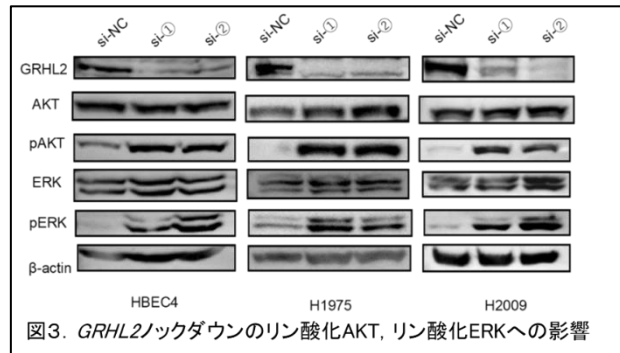


図2. *GRHL2*とEMT関連遺伝子との相関

まとめ

- EMT 安定化因子 GRHL2 は肺癌組織において高発現していた。
- 肺腺癌において、GRHL2 発現は独立した予後良好因子であった。
- 肺癌細胞株における *GRHL2* ノックダウンの増殖への影響は不変、促進、抑制とさまざまであった。
- 以上の結果は、肺癌において *GRHL2* が増殖促進および抑制の両者の機能を併せ持つことを示唆した。



参考文献

- [1] M. Sato, M.B. Vaughan, L. Girard, M. Peyton, W. Lee, D.S. Shames, R.D. Ramirez, N. Sunaga, A.F. Gazdar, J.W. Shay, J.D. Minna, Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells, *Cancer Res* 66 (2006) 2116-2128.
- [2] M. Sato, J.E. Larsen, W. Lee, H. Sun, D.S. Shames, M.P. Dalvi, R.D. Ramirez, H. Tang, J.M. DiMaio, B. Gao, Y. Xie, Wistuba, II, A.F. Gazdar, J.W. Shay, J.D. Minna, Human lung epithelial cells progressed to malignancy through specific oncogenic manipulations, *Mol Cancer Res* 11 (2013) 638-650.
- [3] M. Horio, M. Sato, Y. Takeyama, M. Elshazley, R. Yamashita, T. Hase, K. Yoshida, N. Usami, K. Yokoi, Y. Sekido, M. Kondo, S. Toyokuni, A.F. Gazdar, J.D. Minna, Y. Hasegawa, Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells, *Ann Surg Oncol* 19 Suppl 3 (2012) S634-645.
- [4] Y. Takeyama, M. Sato, M. Horio, T. Hase, K. Yoshida, T. Yokoyama, H. Nakashima, N. Hashimoto, Y. Sekido, A.F. Gazdar, J.D. Minna, M. Kondo, Y. Hasegawa, Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells, *Cancer Lett* 296 (2010) 216-224.
- [5] T. Celia-Terrassa, O. Meca-Cortes, F. Mateo, A. Martinez de Paz, N. Rubio, A. Arnal-Estape, B.J. Ell, R. Bermudo, A. Diaz, M. Guerra-Rebollo, J.J. Lozano, C. Estaras, C. Ulloa, D. Alvarez-Simon, J. Mila, R. Vilella, R. Paciucci, M. Martinez-Balbas, A.G. de Herreros, R.R. Gomis, Y. Kang, J. Blanco, P.L. Fernandez, T.M. Thomson, Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells, *J Clin Invest* 122 (2012) 1849-1868.
- [6] M.K. Jolly, S.C. Tripathi, D. Jia, S.M. Mooney, M. Celik, S.M. Hanash, S.A. Mani, K.J. Pienta, E. Ben-Jacob, H. Levine, Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype, *Oncotarget* 7 (2016) 27067-27084.
- [7] N. KAWABE, K. MATSUOKA, K. KOMEDA, N. MURAKI, M. TAKABA, Y. TOGAMI, Y. ITO, M. YAMADA, N. SUNAGA, L. GIRARD, J.D. MINNA, L. CAI, Y. XIE, I. TANAKA, M. MORISE, M. SATO, Silencing of GRHL2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cell lines with different effects on proliferation and clonogenic growth, *Oncology Letters* In press (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato M, Shay JW, Minna JD.	4. 巻 58(5)
2. 論文標題 Immortalized normal human lung epithelial cell models for studying lung cancer biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respir Investig .	6. 最初と最後の頁 344-354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Sato M.	4. 巻 11(Suppl 9)
2. 論文標題 Chemotherapy Induced Changes to Fibrin Clots Properties in Lung Cancer: Is It Favorable?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 S1126-S1128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd.2019.04.103	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 Goto Daiki, Komeda Kazuki, Uwatoko Natsuki, Nakashima Moeka, Koike Mayu, Kawai Kaho, Kodama Yuta, Miyazawa Ayako, Tanaka Ichidai, Hase Tetsunari, Morise Masahiro, Hasegawa Yoshinori, Kawabe Tsutomu, Sato Mitsuo	4. 巻 38
2. 論文標題 UHRF1, a Regulator of Methylation, as a Diagnostic and Prognostic Marker for Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 240 ~ 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07357907.2020.1747483	査読の有無 有
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 Sato Mitsuo	4. 巻 19
2. 論文標題 Phenotypic screening using large-scale genomic libraries to identify drug targets for the treatment of cancer (Review)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3617-3626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11512	査読の有無 有
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 Kodama Yuta, Tanaka Ichidai, Sato Tatsuhiro, Hori Kazumi, Gen Soei, Morise Masahiro, Matsubara Daisuke, Sato Mitsuo, Sekido Yoshitaka, Hashimoto Naozumi	4. 巻 112
2. 論文標題 Oxytocin receptor is a promising therapeutic target of malignant mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3520 ~ 3532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15025	査読の有無 有
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 Muraki Nao, Yamada Mizuki, Doki Hinako, Nakai Riho, Komeda Kazuki, Goto Daiki, Kawabe Nozomi, Matsuoka Kohei, Matsushima Miyoko, Kawabe Tsutomu, Tanaka Ichidai, Morise Masahiro, Shay Jerry W., Minna John D., Sato Mitsuo	4. 巻 414
2. 論文標題 Resistance to mutant KRAS-induced senescence in an hTERT/Cdk4-immortalized normal human bronchial epithelial cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113053 ~ 113053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113053	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 KAWABE, NOZOMI MATSUOKA, KOHEI KOMEDA, KAZUKI MURAKI, NAO TAKABA, MIHO TOGAMI, YASUHA ITO, YUMENO YAMADA, MIZUKI SUNAGA, NORIAKI GIRARD, LUC MINNA, JOHN D. CAI, LING XIE, YANG TANAKA, ICHIDAI MORISE, MASAHIRO SATO, MITSUO	4. 巻 -
2. 論文標題 Silencing of GRHL2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cell lines with different effects on proliferation and clonogenic growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤 光夫、後藤 大輝、上床 菜月、中嶋 萌夏、小池 眞由、川合 花穂、米田一樹、小玉 勇太、宮沢 亜矢子、田中一大、長谷 哲成、森 瀬 昌宏、関戸 好孝、川部 勤、長谷川 好規
2. 発表標題 UHRF1, a regulator of methylation, as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Nao Muraki, Hinako Doki, Riho Nakai, Mizuki Yamada, Kazuki Komeda, Nozomi Kawabe, Kouhei Matsuoka, Miyoko Matsushima, Tsutomu Kawabe, Ichidai Tanaka, Masahiro Morise and Mitsuo Sato
2 . 発表標題 An hTERT/CDK4-immortalized normal human bronchial epithelial cell line is highly resistant to mutant KRAS-induced senescence
3 . 学会等名 第25回 アジア太平洋呼吸器学会学術集会 APSR 2021 Kyoto (国際学会)
4 . 発表年 2021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
研究 分担者	長谷 哲成 (Hase Tetsunari) (30621635)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究 分担者	湯川 博 (Yukawa Hiroshi) (30634646)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授 (13901)	
研究 分担者	田中 一大 (Tanaka Ichidai) (40809810)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究 分担者	川井 久美 (kawai Kumi) (50362231)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授 (13901)	
研究 分担者	川口 晃司 (Kawaguchi Koji) (10402611)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	

6．研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ジョリー モヒート (Jolly Mohit)		
研究協力者	レバイン ハーバート (Levine Herbert)		

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
---------	---------