

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26293080

研究課題名(和文) 肺腺癌の上皮間葉転換におけるエピジェネティクス異常とリプログラミング機構の解析

研究課題名(英文) Epigenetic abnormalities and reprogramming in epithelial-mesenchymal transition of lung adenocarcinoma

研究代表者

仁木 利郎 (Niki, Toshiro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90198424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺分化のマスター遺伝子TTF-1 (thyroid-specific transcription factor-1)陰性の肺腺癌(肺腺癌全体の20-30%を占める)では、肺本来の分化形質の発現が低下した粘液腺癌や充実性の低分化腺癌の形態を示すことが多く、また治療標的となるドライバー変異が見つかる頻度が低い。本研究では、このような肺腺癌にみられる分化異常が、1)ヒストン修飾因子の発現異常、2)クロマチンリモデリング因子BRM, BRG1の発現低下・喪失、3)TTF-1遺伝子自体の変異あるいはDNAのメチル化による失活など、さまざまなエピジェネティクス異常により誘導される可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム解析の進歩にも拘わらず、肺腺癌の20-30%では、治療標的となるドライバー変異がまだ見出せていない。本研究によってもたらされた知見により、このような一群の肺腺癌におけるエピジェネティクス異常の重要性が認識され、今後の診断・治療開発に向けた研究が促進されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：About 20-30% of lung adenocarcinoma show loss of expression of TTF-1 (thyroid-specific transcription factor-1), a master regulator of lung development and differentiation. These adenocarcinomas frequently present with either mucinous or poorly differentiated solid morphology, features of epithelial-mesenchymal transition, and lack targetable driver mutations, such as EGFR and ALK. In this study, we have revealed that these characteristics of this subset of lung cancer may be causally related with 1) abnormalities of histone modifier expression, 2) loss of expression of chromatin remodelers BRG1/BRM, and inactivation of TTF-1 gene itself by gene mutation or methylation.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺腺癌 上皮間葉転換 エピジェネティクス



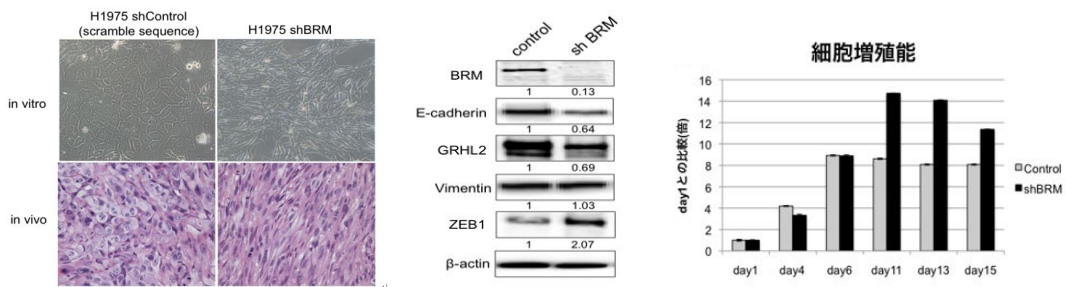
図1 肺腺癌細胞株における PRMT5 の発現は EMT 形質を示す肺腺癌で高い。

(2) クロマチンリモデリング因子 BRM の機能解析

これまでの研究により、クロマチンリモデリング因子 BRG1/BRM の発現低下が EMT 形質を示す肺腺癌で起きていることを報告してきた (Matsubara D. et al. Cancer Sci 2013, PMID: 23163725)。今回、その因果関係を明らかにするため、BRM のノックダウン (KD) 実験を行った。レンチウイルスベクターにより BRM をノックダウンしたところ、肺腺癌細胞 H1975 の細胞形態が紡錘形へと変化するとともに、E-cadherin の発現低下など EMT 形質が誘導された (図2)。細胞増殖については、通常の培養条件では差はなかったが、高密度の状態では confluency に到達後も BRM-KD 細胞ではしばらく増殖が継続した。

また CHIP (chromatin immunoprecipitation)-sequence により、全ゲノム上で BRM が結合する遺伝子領域を約 1000 箇所同定し、その中には E-cadherin をコードする *CDH1* 遺伝子、claudin-4 をコードする *CLDN4* などが含まれることも突き止めた。クロマチンリモデリング因子 BRG1/BRM がダイレクトに上皮分化の遺伝子プログラムを制御することを示したデータと考えている。

図2 BRM のノックダウンによる EMT 形質の誘導と高密度での細胞増殖の亢進



(3) マスター遺伝子 TTF-1 の失活とその分子機構の解析

Non-TRU-type の形態を示す肺腺癌 43 症例の包括的な遺伝子解析を次世代シーケンサにより行った (現、国立がん研究センター研究所長の間野博之博士との共同研究)。その結果、肺のマスター遺伝子 *TTF-1* の失活変異が 7/43 (16.3%) に認められた (図3)。*TTF-1* 陰性の肺腺癌では、*TTF-1* 遺伝子の変異だけでなく、*TTF-1* 遺伝子領域のメチル化が広範に起きていることも明らかになった。*TTF-1* 陰性の肺腺癌では、消化管上皮の分化マーカーである、MUC5AC, CK20, HNF4A などの異常な発現が高頻度にみられた。以上の結果より、*TTF-1* 遺伝子の変異が DNA のメチル化とともに *TTF-1* の失活、発現消失に関与し、消化管上皮への異常な分化の原因となっている可能性が示唆された。従来より肺腺癌は多様な形態と分化形質を示すことが知られていたが、今回の検討によりその原因となる分子機構の一端が明らかになったと考えられた。

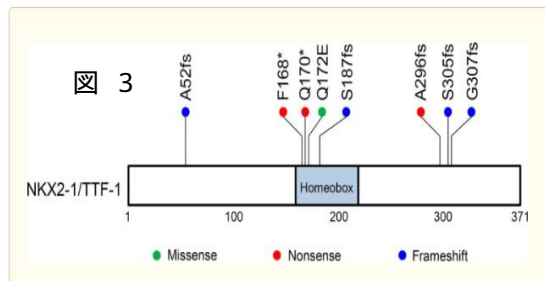


図3 TTF-1 遺伝子の変異部位のマッピング

(4) EGFR ならびに KRAS の変異株を用いた薬剤耐性機構の解析

EGFR 変異株のなかには、EMT 形質を示すとともに EGFR 阻害剤に耐性を示す癌細胞があることが指摘されている。KRAS 変異株は未だに有効な分子標的薬がない。研究分担者の佐久間らは、オートファジーと PIN1 (prolyl isomerase-1) 活性が EMT による薬剤耐性に関わっており、これらの阻害剤が EGFR 阻害剤の耐性克服に有用である可能性を示した (図4)。また上皮型の KRAS 変異株 H358, H441 において、MEK 阻害に加えて、bcl-2 と survivin を、あるいは MCL1 を阻害することによって効果的にアポトーシスを誘導できることを明らかにした。

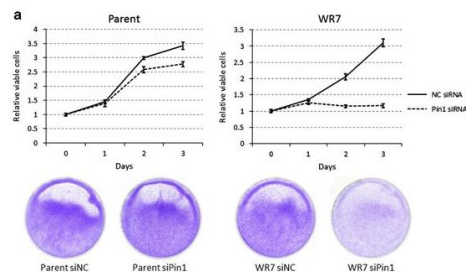


図4 PIN1 siRNA による細胞増殖の抑制

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] (計 12 件)

- Tada M, Niki T (7<sup>th</sup> of 10), Sakuma Y (10<sup>th</sup> of 10). MCL1 inhibition enhances the therapeutic effect of MEK inhibitors KRAS mutant lung adenocarcinoma cells. Lung Cancer (accepted). ( 査読あり )
- Ito T, Niki T (10<sup>th</sup> of 12), Matsubara D (11<sup>th</sup> of 12). CADM1 associates with Hippo pathway core kinases; membranous coexpression of CADM1 & LATS2 in lung tumors predicts good prognosis. Cancer Sci. 2019 May 8. doi:10.1111/cas.14040. ( 査読あり )
- Kunita A, Niki T (5<sup>th</sup> of 8). MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports lung adenocarcinoma progression. Sci Rep. 2018;8(1):8838. doi: 10.1038/s41598-018-27128-3. ( 査読あり )
- Sumi T, Niki T (6<sup>th</sup> of 8), Sakuma Y (8<sup>th</sup> of 8). Trametinib downregulates survivin expression in RB1-positive KRAS-mutant lung adenocarcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2018 501(1):253-258. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.230. ( 査読あり )
- Sumi T, Niki T (9<sup>th</sup> of 12), Sakuma Y (12<sup>th</sup> of 12). Survivin knockdown induces senescence in TTF-1-expressing, KRAS-mutant lung adenocarcinomas. Int J Oncol. 2018;53:33-46. doi: 10.3892/ijo.2018.4365. ( 査読あり )
- Matsubara D (1<sup>st</sup> of 18), Yoshimoto T (3<sup>rd</sup> of 18), Sakuma Y (5<sup>th</sup> of 18), Niki T (18<sup>th</sup> of 18). Inactivating mutations and hypermethylation of the NKX2-1/TTF-1 gene in non-terminal respiratory unit-type lung adenocarcinomas. Cancer Sci. 2017; 108:1888-1896. doi: 10.1111/cas.13313. ( 査読あり )
- Nakano T, Yoshimoto T (4<sup>th</sup> of 15), Matsubara D (5<sup>th</sup> of 15), Niki T (15<sup>th</sup> of 15). Establishment of highly metastatic KRAS mutant lung cancer cell sublines in long-term three-dimensional low attachment cultures. PLoS One. 2017;12:e0181342. doi: 10.1371/journal.pone.0181342. eCollection 2017. ( 査読あり )
- Ito T, Matsubara D (2<sup>nd</sup> of 25), Niki T (24<sup>th</sup> of 25). Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumors. Cancer Sci 2016, 107:1527-1538. doi: 10.1111/cas.13013. ( 査読あり )
- Sakuma Y (1<sup>st</sup> of 10), Niki T (9<sup>th</sup> of 10). Prolyl isomerase Pin1 promotes survival in EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells with an epithelial-mesenchymal transition phenotype. Lab Invest 2016, 96:391-398. doi: 10.1038/labinvest.2015.155. ( 査読あり )
- Yoshimoto T (1<sup>st</sup> of 7), Matsubara D (2<sup>nd</sup> of 7), Niki T (7<sup>th</sup> of 7). Frequent loss of the expression of multiple subunits of the SWI/SNF complex in large cell carcinoma and pleomorphic carcinoma of the lung. Pathol Int 2015, 65:595-602. doi: 10.1111/pin.12350. ( 査読あり )
- Matsubara D (1<sup>st</sup> of 10), Yoshimoto T (3<sup>rd</sup> of 10), Sakuma Y (4<sup>th</sup> of 10), Niki T (10<sup>th</sup> of 10). Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. Pathol Int 2014; 64:560-568. doi: 10.1111/pin.12214. ( 査読あり )
- Ibrahim R, Matsubara D (2<sup>nd</sup> of 13), Niki T (12<sup>th</sup> of 13). Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial mesenchymal transition. Hum Pathol 2014;45:1397-1405. doi: 10.1016/j.humpath.2014.02.013. ( 査読あり )

### [ 学会発表 ] (計 20 件)

- Yoshimoto T (1<sup>st</sup> of 13), Matsubara D (2<sup>nd</sup> of 13), Niki T (13<sup>th</sup> of 13). MUC21 is a candidate key molecule involved in the incohesive growth pattern of lung adenocarcinoma. 6th JCA-AACR Special Joint Conference "The latest advances in lung cancer research: from basic science to therapeutics", Kyoto, July 10-12, 2018.
- Shibano T (1<sup>st</sup> of 9), Yoshimoto T (4<sup>th</sup> of 9), Matsubara D (6<sup>th</sup> of 9), Niki T (9<sup>th</sup> of 9). Long-term, 3-dimensional spheroid culture: a putative model to study evolution of detached cancer cells in tumor metastasis. 17th Biennial Congress of Metastatic Research Society, Princeton, August 1-5, 2018.
- Matsubara D (1<sup>st</sup> of 11), Yoshimoto T (3<sup>rd</sup> of 11), Niki T (11<sup>th</sup> of 11). Reciprocal expressions of TFF-1 and TTF-1 in lung adenocarcinomas. Annual Meeting of American Association for Cancer Research (poster presentation), Chicago, April 14-18, 2018.
- Nakano T, Yoshimoto T (2<sup>nd</sup> of 7), Matsubara D (5<sup>th</sup> of 9), Niki T (9<sup>th</sup> of 9). 3D Low-Attachment Culture: A Putative Model for STAS and "Floating" Cancer Cells. 18th World Conference of Lung Cancer (Oral), Yokohama, Oct 15-18, 2017.
- Yoshimoto T, Matsubara D, Niki T. Mutation of SWI/SNF Complex Genes Is Frequent in Poorly Differentiated, Mesenchymal-Like Lung Cancer without Major Driver Mutation. 18th World Conference of Lung Cancer (poster presentation), Yokohama, Oct 15-18,

2017.

Nakano T, Yoshimoto T (4<sup>th</sup> of 8), Matsubara D (5<sup>th</sup> of 8), Niki T. Establishment of Highly Metastatic Lung Cancer Cell Sublines in Long-term Three-dimensional Low Attachment Cultures. 18th World Conference of Lung Cancer (poster presentation), Yokohama, Oct 15-18, 2017.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 9), 松原大祐 (7<sup>th</sup> of 9), 仁木利郎 (9<sup>th</sup> of 9). 肺腺癌における Glucose transporter (Glut) の発現解析. 第 58 回日本肺癌学会学術集会, 横浜, 2017 年 10 月 14 日-15 日.

柴野智毅, 吉本多一郎 (3<sup>rd</sup> of 5), 松原大祐 (4<sup>th</sup> of 5), 仁木利郎 (5<sup>th</sup> of 5). 低接着培養下における肺癌細胞のシグナル伝達と細胞周期制御分子の解析. 第 26 回日本がん転移学会学術集会, 大阪, 2017 年 7 月 27-28 日.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 4), 松原大祐 (3<sup>rd</sup> of 4), 仁木利郎 (4<sup>th</sup> of 4). 肺腺癌における低接着状態と Glucose transporter (Glut) の発現解析. 第 14 回病理学会カンファレンス, 名古屋, 7 月 28-29 日.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 5), 松原大祐 (2<sup>nd</sup> of 5), 仁木利郎 (5<sup>th</sup> of 5). 肺非小細胞癌の上皮間葉転換に関わる長鎖ノンコーディング RNA の探索. 第 76 回日本癌学会総会, 横浜, 2017 年 9 月 28 日-30 日.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 5), 松原大祐 (4<sup>th</sup> of 5), 仁木利郎 (5<sup>th</sup> of 5). 低接着培養における浮遊癌細胞集塊の in vitro モデルの作成. 106 回日本病理学会総会, 東京, 2017 年 4 月 27 日-29 日.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 5), 松原大祐 (2<sup>nd</sup> of 5), 仁木利郎 (5<sup>th</sup> of 5). 系統的肺腺癌ゼノグラフトを用いた癌間質相互作用の解析. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 福岡, 2016 年 12 月 19 日-21 日.

松原大祐 (1<sup>st</sup> of 8), 吉本多一郎 (3<sup>rd</sup> of 8), 仁木利郎 (8<sup>th</sup> of 8). 形態学的アプローチに基づく Non-TRU type 肺腺癌の解析: TFF-1 と TTF-1 の相互排他的な関係性について. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 福岡, 2016 年 12 月 19 日-21 日.

松原大祐 (1<sup>st</sup> of 8), 吉本多一郎 (3<sup>rd</sup> of 8), 仁木利郎 (8<sup>th</sup> of 8). 病理組織学的アプローチによる Non-TRU タイプ肺腺癌の NKX2-1 遺伝子変異の同定. 第 75 回日本癌学会総会, 横浜, 2016 年 10 月 6 日-8 日.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 5), 松原大祐 (2<sup>nd</sup> of 5), 仁木利郎 (3<sup>rd</sup> of 5). 肺腺癌 Xenograft モデルにおける癌間質相互作用の包括的解析. 第 75 回日本癌学会総会, 横浜, 2016 年 10 月 6 日-8 日.

佐久間裕司, 長谷川匡, 仁木利郎. 異性化酵素 Pin1 は EMT を起こした EGFR 変異陽性肺腺癌の生存を促進する. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台, 2016 年 5 月 12 日-14 日.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 5), 松原大祐 (2<sup>nd</sup> of 5), 仁木利郎 (5<sup>th</sup> of 5). 肺癌の上皮間葉転換におけるクロマチンリンモデリング因子異常の解析. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台, 2016 年 5 月 12 日-14 日.

Yoshimoto T, Matsubara D, Niki T. Altered expressions of multiple subunits of the switch/sucrose non-fermenting (SWI/SNF) complex in Non-small cell lung cancer. AACR special meeting, Atlanta, September 24-27, 2015.

Matsubara D (1<sup>st</sup> of 11), Niki T (10<sup>th</sup> of 11). Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. Annual Meeting of American Association for Cancer Research (poster presentation), San Diego, April 5-9, 2014.

吉本多一郎 (1<sup>st</sup> of 5), 松原大祐 (2<sup>nd</sup> of 5), 仁木利郎 (5<sup>th</sup> of 5). 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 回日本癌学会総会, 横浜, 2014 年 9 月 25 日-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: <http://www.jichi.ac.jp/pathol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松原大祐

ローマ字氏名: Matsubara Daisuke

所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：病理学講座統合病理学部門  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：80415554

(2)研究分担者

研究分担者氏名：吉本多一郎  
ローマ字氏名：Yoshimoto Taichiro  
所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：病理学講座統合病理学部門  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：20634166

(3)研究分担者

研究分担者氏名：佐久間裕司  
ローマ字氏名：Sakuma Yuji  
所属研究機関名：札幌医科大学  
部局名：医学部附属フロンティア医学研究所分子医学部門  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：10364514

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。