

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15009

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌における新規バイオマーカーの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers for non-small cell lung cancer

研究代表者

野口 智史 (Noguchi, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60732807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、理化学研究所により開発されたCAGE法による遺伝子発現解析により、肺癌の新規バイオマーカーを探索した。actin cytoskeletonと相互作用するアダプター分子として機能するCRIP1に注目し、細胞増殖やcolony formationに寄与することを見出した。組織マイクロアレイの解析ではCRIP1高発現群で予後が不良な傾向にあった。

次にTCGAデータベースを用いて、肺腺癌の転移に関わる新規遺伝子探索を行い、Rhoファミリー低分子G蛋白RhoVを見出した。肺癌検体の解析でRhoVが高発現だと予後が有意に不良になること、RhoVが増殖能・遊走能に寄与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、理化学研究所により開発されたCAGE法による遺伝子発現解析やTCGAデータベースを用いた解析により、肺癌の進展や転移に関わる新規バイオマーカーであるCRIP1とRhoVを見出すことができた。いずれも正常気道/肺上皮と比較し一部の非小細胞肺癌に特異的に発現すること、高発現が予後不良因子となりえること、細胞増殖や遊走に寄与することが判明し、肺がんの新規治療標的になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We explored novel biomarkers for non-small cell lung cancer using gene expression analysis technique, CAGE (Cap Analysis of Gene Expression). CRIP1, an actin cytoskeleton-interacting LIM-domain protein, was found to be involved in proliferation and colony formation of lung cancer cells. The analysis of a large cohort of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients revealed that NSCLC patients with higher tumor CRIP1 expression levels tend to have an unfavorable prognosis.

In addition, the analysis of the TCGA database identified RhoV, which is a member of the Rho family of GTPases, to be involved in cancer metastasis. High expression of RhoV was associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. In vitro, knockdown of RhoV led to decreased cell proliferation and migration.

研究分野：肺癌

キーワード：非小細胞肺癌 バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は EGFR 遺伝子変異などの発見により、劇的な効果を示す分子標的治療が主流となっているが、その適応となるのは一部である。その他の多くが細胞障害性抗癌剤によって治療されることが多いが治療成績は芳しくなく、肺癌発症・進展の他の分子生物学的な機序の解明が重要な課題である。

次世代シーケンサーを中心としたゲノミクス技術の進歩により、癌研究は近年著しい発展を遂げている。CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法は理化学研究所により開発され、CAP 修飾された mRNA 分子の 5' 末端から約 20 塩基をタグとして切り出す技術で、高速シーケンシング技術との組み合わせによりゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルが得られる。CAGE 法による遺伝子発現解析が肺癌を含む癌のバイオマーカー研究に用いられたことはなく、肺癌の未知のバイオマーカーを発見できる可能性が考えられ、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

理化学研究所が提供する CAGE データや公共 cDNA マイクロアレイデータを活用して、肺癌細胞株と正常肺胞 / 気道上皮細胞における遺伝子の発現比較を行い、肺癌の新規バイオマーカーとなりうる遺伝子を同定し、その遺伝子の機能解析、予後解析を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肺癌の新規バイオマーカー候補の検索 (in silico 解析)

17 種類の NSCLC 細胞株と 16 種類の正常気道・肺胞上皮細胞の CAGE データを抽出した。R/Bioconductor のパッケージである edgeR のアルゴリズムを用いて発現比較を行った。同様に GEO データベースから 118 種類の NSCLC 細胞株と 59 種類の正常気道・肺胞上皮細胞の cDNA マイクロアレイデータ (GSE32036) を抽出し、R/Bioconductor の SAM アルゴリズムを用いて発現比較を行った。両者のデータセットを統合し NSCLC のバイオマーカー候補をリストアップした。

さらに TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースを用いて、遠隔転移に関連する遺伝子候補を edgeR のアルゴリズムを用いて検索した。

これらの解析で得られたバイオマーカー候補遺伝子の中から、機能が未知の遺伝子をピックアップし、その発現と臨床情報との相関や予後解析を行った。

#### (2) in vitro 解析

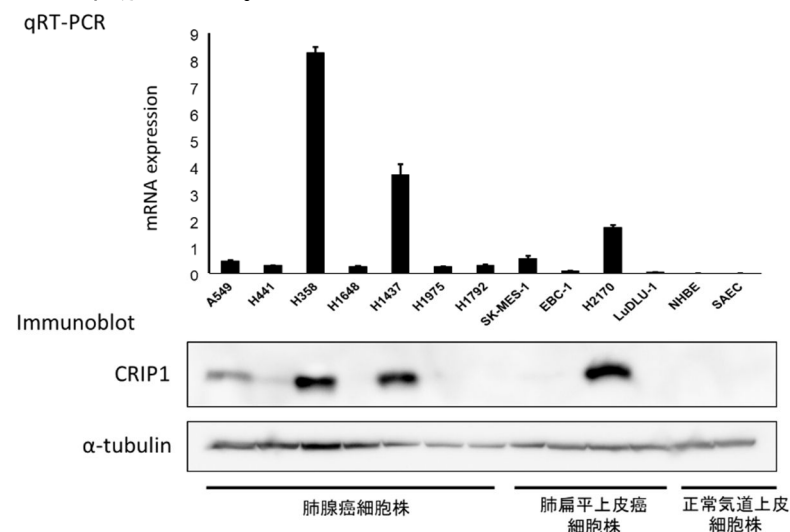
in silico 解析で得られたバイオマーカー候補遺伝子に関して、肺癌細胞株を用いて、増殖能、生存能、遊走能などを解析した。具体的には、siRNA や miRNA 発現ベクターを用いた遺伝子ノックダウン法により、細胞数カウント、コロニーフォーメーションアッセイ、アポトーシスアッセイ、セルサイクルアッセイを行った。

#### (3) 臨床検体を用いた解析

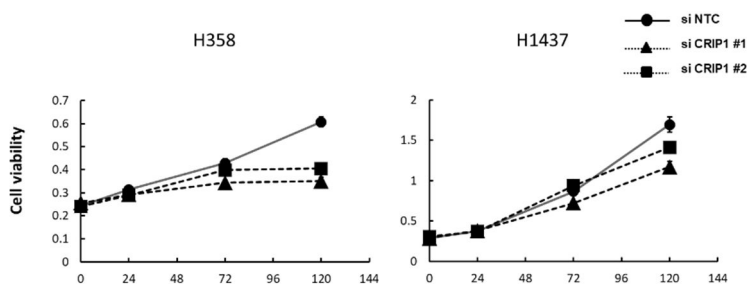
肺癌の臨床検体 (組織マイクロアレイ) を用いて免疫染色を行い、肺癌患者の予後や臨床病理学的パラメーターとの関連を解析した。

### 4. 研究成果

上述した in silico 解析 (CAGE データベースと GSE32036 の統合) により、20 個の遺伝子がリストアップされた。その中で CRIP1 (Cysteine-Rich Intestinal Protein 1) に注目した。CRIP1 は LIM/double-zinc finger タンパクファミリーに属するタンパクであり、actin cytoskeleton と相互作用するアダプター分子として機能する。これまでの報告で乳癌や前立腺癌などいくつかの癌種で過剰発現やメチル化の異常が報告されているが、肺癌での CRIP1 の発現や機能に関しては不明であった。

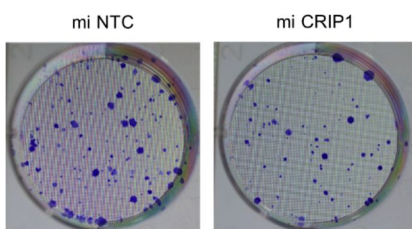


qRT-PCR 及び immunoblot にて7種類の肺腺癌細胞株、4種類の肺扁平上皮癌細胞株、2種類の正常気道上皮細胞にて発現レベルを調べたところ、一部の非小細胞肺癌細胞株にて CRIP1 の発現上昇を認めた(上図)。さらに CRIP1 の内因性発現レベルが高いヒト肺腺癌細胞株 H358、H1437 において、siRNA により CRIP1 発現をノックダウンすると、細胞増殖が抑制された。

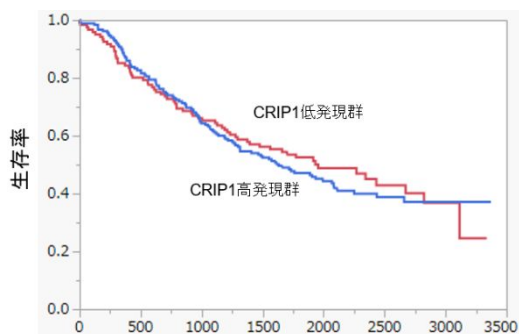
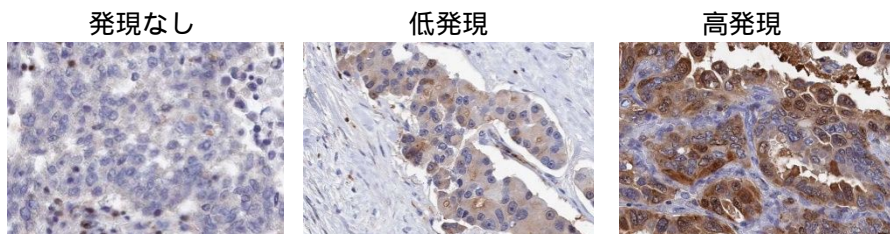


細胞周期解析およびアポトーシスアッセイでは、ノックダウン群とコントロール群とで有意差は認められなかった。

次に CRIP1 miRNA 発現ベクターを作成し、恒常的にノックダウンする系を確立し、colony formation assay を行ったところ、ノックダウン群でコロニー形成が抑制される傾向があった(有意差は認めず)。



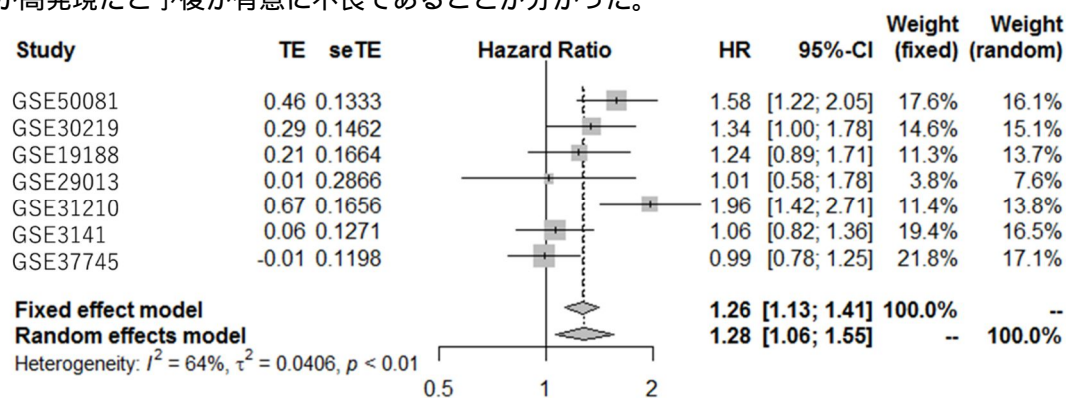
The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて、肺腺癌組織における CRIP1 mRNA 発現量と予後との関連を解析したところ、CRIP1 発現レベルが高いと有意に予後不良であった。さらに非小細胞肺癌の組織マイクロアレイ(306例)で免疫染色を行い、CRIP1 の肺癌組織での蛋白発現を解析したところ、肺癌細胞の細胞質において、低発現から高発現まで様々な発現パターンを示した。組織型では扁平上皮癌や大細胞癌よりも腺癌で発現が有意に高かった。正常肺の肺胞上皮では発現を認めなかった。喫煙歴や肺癌のステージごとの発現差はなかった。生存解析では、高発現群は低発現群と比較し、やや予後は不良であったが、有意差は認めなかった。



以上より CRIP1 は肺癌特異的に発現するバイオマーカーとなりえることが分かった。また、細胞増殖、足場非依存的増殖に関与する可能性が示唆されたが、強い oncogenic function は有していないと考えられた。

次に TCGA データベースを用いて、肺腺癌の転移に関わる新規遺伝子探索を行った。転移(+)群(TNM分類でN1以上またはM1以上)と転移(-)群間での発現変動遺伝子群と、正常肺と肺癌組織間での発現変動遺伝子群とを統合した。両群に重複する遺伝子の中で、Rhoファミリー低分子G蛋白 RhoVに着目した。Rhoの活性化はアクチン重合促進とミオシン軽鎖活性化によるアクトミオシン束の形成を誘導することで、細胞骨格制御に関与する。

公共データベースを用いて、RhoV mRNA 発現量と予後に関するメタ解析を行ったところ、RhoV が高発現だと予後が有意に不良であることが分かった。



次に当研究室が有している多数の非小細胞肺癌細胞株を用いて qRT-PCR を行った結果、正常気道/肺胞上皮細胞株にはその遺伝子はほとんど発現していないものの、一部の肺癌細胞株では高発現であることが分かった。2種類の肺癌細胞株 A549、H23 を用いて、siRNA で遺伝子発現をノックダウンし、細胞増殖能を調べた結果、ノックダウン群で増殖能が低下する傾向にあった。また、スクラッチアッセイにて遊走能を評価したところ、ノックダウン群で遊走能が低下する傾向にあった。一方、レンチウイルスベクターで正常気管支上皮細胞 BEAS2B に同遺伝子を強制発現させ、増殖能、遊走能を調べたが、コントロール群、強制発現群との間で有意差は認めなかった。他の細胞株や異なるアッセイで今後さらに増殖、遊走、浸潤能などに関して、機能解析を行う予定である。また、mRNA レベルだけではなく蛋白レベルでも発現量と予後が相関するか肺癌検体の免疫組織染色で評価したいと考えている。

## 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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito M, Mitani A, Ishimori T, Miyashita N, Isago H, Mikami Y, Noguchi S, Tarui M, Nagase T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Active mTOR in Lung Epithelium Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Enhances Lung Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	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） 10.1165/rcmb.2019-02550C	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 Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, Kokuho N, Endo Y, Terasaki M, Kunugi S, Makita K, Isago H, Hosoki K, Souma K, Ishii T, Matsuzaki H, Hiraishi Y, Mikami Y, Noguchi S, Tamiya H, Mitani A, Yamauchi Y, Shimizu A, Nagase T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Naftopidil reduced the proliferation of lung fibroblasts and bleomycin induced lung fibrosis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 3563 ~ 3571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.14255	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 Takeshima H, Horie M, Mikami Y, Makita K, Miyashita N, Matsuzaki H, Noguchi S, Urushiyama H, Hiraishi Y, Mitani A, Borok Z, Nagase T, Yamauchi Y.	4. 巻 68
2. 論文標題 CISH is a negative regulator of IL-13-induced CCL26 production in lung fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 101 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2018.08.005	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 Noguchi S, Saito A, Nagase T.	4. 巻 19
2. 論文標題 YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3674 ~ 3674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19113674	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 Makita K, Mikami Y, Matsuzaki H, Miyashita N, Takeshima H, Noguchi S, Horie M, Urushiyama H, Iikura M, Hojo M, Nagase T, Yamauchi Y.	4. 巻 175
2. 論文標題 Mechanism of Periostin Production in Human Bronchial Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000485892	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 Horie M, Miyashita N, Mikami Y, Noguchi S, Yamauchi Y, Suzukawa M, Fukami T, Ohta K, Asano Y, Sato S, Yamaguchi Y, Ohshima M, Suzuki HI, Saito A, Nagase T.	4. 巻 314
2. 論文標題 TBX4 is involved in the super-enhancer-driven transcriptional programs underlying features specific to lung fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L177 ~ L191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00193.2017	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 Horie M, Kaczowski B, Ohshima M, Matsuzaki H, Noguchi S, Mikami Y, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest ARR, Takai D, Yamaguchi Y, Micke P, Saito A, Nagase T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Integrative CAGE and DNA Methylation Profiling Identify Epigenetically Regulated Genes in NSCLC	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-17-0191	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----