

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02634

研究課題名(和文) ドライバー変異に依存しない肺腺癌における細胞の分化と生存の統合的制御機構の解明

研究課題名(英文) Integrated regulatory mechanism that govern differentiation and survival of driver-mutation-independent 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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：non-TRU(terminal respiratory unit)-typeの肺腺癌はEGFRなどのドライバー変異が稀であり、形質面では1)消化管上皮への異常分化を示す群と、2)上皮形質の発現低下した群からなる。本研究ではまず前者の群におけるTFF(trefoil factor family)-1,HNF(hepatocyte nuclear factor)4のバイオマーカーとしての意義、次いでそのノックダウンが細胞の分化と増殖に与える効果を明らかにした。さらに後者の群でみられるBRMの欠失が、上皮形質の喪失の直接の原因であることをノックダウン実験により示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌は、ドライバー変異に基づいた治療が行われているが、治療標的の不明な癌が未だ30%ほど残っている。このような症例は、肺のmaster gene TTF-1が陰性で、上皮形質の異常を示すnon-TRU-type腺癌に多い。本研究は、non-TRU-type腺癌の特徴を分子レベルで明らかにしたもので、今後non-TRU-type腺癌の診断と治療戦略を考えるうえで重要な基盤となる基礎研究である。

研究成果の概要(英文)：Non-TRU (terminal respiratory unit)-type lung adenocarcinoma lacks driver mutations, such as EGFR, and consists of cases that show either 1) abnormal gastrointestinal differentiation, or 2) loss of epidermal traits. In this study, we first clarified the significance of two factors, TFF(trefoil factor family)-1 and HNF(hepatocyte nuclear factor)4, as novel biomarkers of the former non-TRU-type, and then examined the effect of their knock-down in lung adenocarcinoma with gastrointestinal differentiation. We also obtained data indicating that loss of BRM, often found in the latter non-TRU-type, is causally related to the loss of epidermal differentiation in this group of non-TRU-type lung adenocarcinoma.

研究分野：人体病理

キーワード：肺腺癌 分子標的 上皮間葉転換

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌は、EGFR, KRAS, ALK, RET, ROS1, MET, HER2, BRAF など相互排他的なドライバー変異に基づいた molecular classification (図1)が行われ、上皮成長因子受容体(EGFR), ALK 阻害剤などの分子標的薬剤が一定の効果をおよぼしている。しかしその後のゲノムの進展によってもなお治療標的となるドライバー変異の不明な肺癌が未だ30%ほど残っており、図1の“unknown”における治療標的は、EGFR, MET, HER2 などチロシンキナーゼとは性質が異なる可能性が考えられる。病理形態と分化形質の観点からみた場合、EGFR, ALK, HER2 などドライバー変異を有する肺腺癌は、肺の master gene である TTF-1 に陽性であり、かつ上皮の形質をよく保持している症例が多い (terminal respiratory unit type, TRU-type) (Yatabe et al. AJSP 2005; Inamura et al. 2008)。このような症例は患者の背景として非喫煙者が多いという特徴がある。これに対し、ドライバー変異のない肺腺癌のなかには、(1) クロマチンリモデリング因子 SWI/SNF 複合体の構成因子である BRG1/SMARCA4, BRM/SMARCA2 の失活変異ないし発現低下などの epigenetic な制御因子の異常と EMT 形質を示す症例群、(2) 肺の master gene である TTF-1 の失活変異とメチル化の異常があり消化管上皮への分化や粘液産生を伴う症例群がみられる、など興味ある事実を申請者は発見し報告してきた (Matsubara, Niki et al. Cancer Sci 2013; Matsubara, Niki et al. Cancer Sci 2017)。

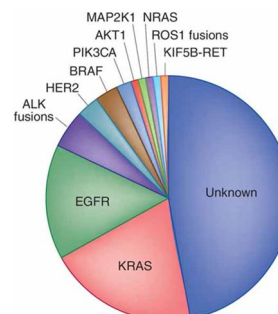


図1 ドライバー変異による肺腺癌分類 (Pao et al. Nat Med 2012)

2. 研究の目的

腺癌の70-80%を占める TRU-type の肺腺癌は、もともと末梢気管支上皮や肺胞上皮の分化、生存再生を担うためにプログラムされた転写因子 TTF-1, チロシンキナーゼ EGFR, MET, HER2 などが中核をなす遺伝子ネットワークにより制御されていると考えられる。これに対し、ドライバー変異に依存しない肺腺癌では、どのような転写とシグナル伝達系のネットワークにより、その分化と生存が統合的に制御されているのか、その分子機構を解明し、肺癌の診断と治療へ応用することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 細胞株を用いた解析

細胞株：非小細胞肺癌40株（腺癌35株，大細胞癌4株，腺扁平上皮癌1株から構成される）を検討に用いた (Matsubara D, et al. Am J Pathol 2010)。

細胞増殖アッセイ：Dojindo の Cell Count Assay kit-8 を用いて解析した。

タンパク発現の解析：Western Blot 法による。

(2) 肺癌組織を用いた解析

自治医科大学付属病院にて外科切除され、検体の研究使用への同意を得られた肺腺癌238例を解析に用いた。RNA-sequence 解析は、国立がん研究センターの間野博行研究所長に依頼した。遺伝子変異解析は、研究分担者の自治医科大学呼吸器内科の萩原教授に依頼し、MINtS 法 (Inoue, Hagiwara et al. PLOS One 2017) による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肺腺癌組織検体の組織型の内訳：

対象の肺腺癌症例群の組織型の内訳は、上皮内腺癌～微小浸潤癌9例，肺胞置換型23例，乳頭型120例，微小乳頭型1例，腺房型24例，充実型43例，浸潤性粘液癌15例，腸型2例，コロイド癌1例であった。免疫染色による解析にて、TTF-1 陽性を示す TRU 型が191例 (80%)，TTF-1 陰性の non-TRU 型が47例 (20%) であった。TTF-1 陰性例の組織型の内訳は、浸潤性粘液癌15例，腸型2例，コロイド癌1例，乳頭型2例，腺房型5例，充実型22例であり，non-TRU 型の肺腺癌の大多数は、粘液産生あるいは消化管上皮への分化を示す腺癌，あるいは低分化な充実腺癌で構成されることが再確認された。この症例群を用いて、以下の解析に用いた。

(2) TTF-1 (trefoil factor family-1) の発現と機能解析：

Non-TRU 型の肺腺癌を特徴となる形質を明らかにするため、肺癌細胞40株中、TRU 型の肺腺癌11株と比較して、non-TRU 型の肺腺癌株、そのなかでも上皮形質を保持した細胞8株において高い発現を示す遺伝子の抽出を行った。抽出された遺伝子の中で、消化管上皮の修復因子である分泌タンパク TFF-1 (Trefoil Factor Family 1) に着目し、以下の解析を行った。

まず肺腺癌における TFF-1 の発現を免疫染色にて検討した。肺腺癌238例中、TFF-1 陽性の症例は31例 (13%) に認められた。組織型ごとの TFF-1 陽性頻度は、浸潤性粘液癌 (14/15, 93%)，腸型腺癌 (2/2, 100%)，コロイド腺癌 (1/1, 100%) で高率であるのに対し、一般的な組織型である腺房型 (5/24, 21%)，乳頭型 (7/120, 6%)，充実型 (2/43, 5%) では低率であり、さら

に微小乳頭型 (0/1, 0%), 肺胞置換性増殖型 (0/23, 0%), 微小浸潤腺癌および上皮内腺癌 (0/9, 0%)では全例陰性であった。TFF-1 の発現は, 他の消化管上皮のマーカーである MUC5AC と相関し ($P < .0001$), TFF-1/NKX2-1 とは逆相関の関係にあった ($P < .0001$)。ドライバー変異を検索した症例中, TFF-1 陽性例は KRAS 変異の頻度が高く (12/24, 50%), EGFR, ALK 変異を示す例は 1 例もなかった。TFF-1 の発現は STAS (spread through air space) と相関し, 進行期において予後不良因子であった。Publicly available dataset (Shedden et al. Nat Med 2008; TCGA) においても同様の結果が確認された (図 2, 3)。non-TRU 型の肺腺癌における TFF-1 の発現の意義を解析するため, TFF-1 陽性の肺腺癌細胞 A549 を用いて TFF-1 のノックダウン実験を行った。その結果, TFF-1 のノックダウンにより, 細胞増殖, コロニー形成が抑制され, アポトーシスの増加も認められた (図 4)。

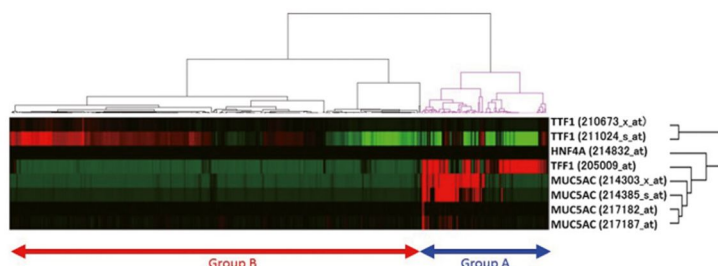


図 2 . Shedden らの dataset を用いたクラスター解析。TFF-1 の発現は, MUC5AC と相関し, TFF-1 と逆相関した。

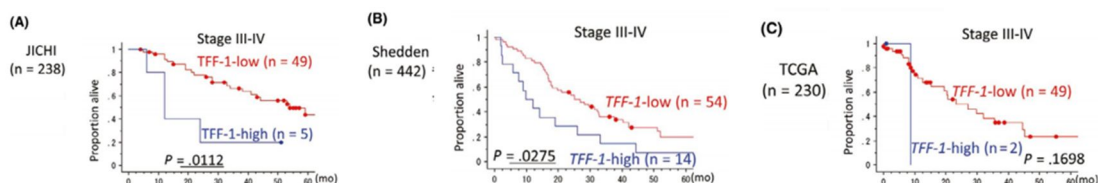


図 3 . TFF-1 の発現と予後。自治医大症例, Shedden dataset, TCGA dataset のいずれの cohort においても, 進行期症例において TFF-1 の高発現は予後不良因子であった。

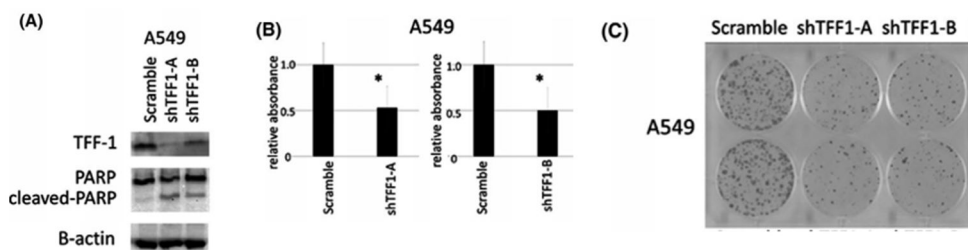


図 4 . TFF-1 のノックダウンにより, cleaved PARP の増加 (アポトーシスの増加) (A), 細胞増殖の抑制 (B), コロニー形成の抑制 (C) が認められた。

以上より, TFF-1 は消化管上皮への分化を示す肺腺癌のバイオマーカーであり, かつ治療標的ともなりうる可能性をもった分子であることが判明した。

(3) HNF4α (hepatocyte nuclear factor-4 α) の発現と機能解析

HNF4α は, HNF1α/β, FOXA1/2/3, HNF4γ などとともに HNF family を構成する転写因子である (Lau HH, et al. J Hepatol 2018)。もともとは肝細胞の分化を制御する因子として発見されたが, 膵, 消化管, などでも発現することが明らかになっている。肺では, 間質性肺炎での粘液性化生上皮, あるいは粘液性腺癌での発現がいくつか報告されているが (Kunii et al. Histopathology 2011; Sugano et al. Am J Surg Pathol 2013; Kojima et al. Histopathology 2017; Nakajima et al. Histopathology 2018; Koh et al. Histopathology 2020), 肺腺癌の組織型との詳細な検討は十分には行われていない。

肺腺癌における HNF4α の発現を免疫染色にて検討したところ, 肺腺癌 238 例中, HNF4α 陽性の症例は 28 例 (12%) に認められた。組織型ごとの HNF4α 陽性頻度は, 既報にあるように浸潤性粘液癌では全例 (15/15) において陽性を示したが, 腸型腺癌 (2/2, 100%), コロイド腺癌 (1/1, 100%) においても全例 HNF4α 陽性であった。さらに一般的な組織型である腺房型 (4/24, 17%), 乳頭型 (2/120, 2%), 充実性 (6/43, 14%) においても, HNF4α 陽性所見を認めた。微小乳頭型 (0/1, 0%), 肺胞置換性増殖型 (0/23, 0%), 微小浸潤腺癌および上皮内腺癌 (0/9, 0%) では

全例陰性であった。HNF4- α の発現は、他の消化管上皮のマーカーである TFF-1 と MUC5AC と相関し (ともに $P < .0001$) , TTF-1/NKX2-1 とは逆相関の関係にあった ($P < .0001$)。HNF4 α は、単に浸潤性粘液癌に発現するマーカーであるだけでなく、non-TRU 型肺腺癌全般の優れたマーカーであることを示す結果と考えられる。

non-TRU 型の肺腺癌における HNF4 α 発現の意義を解析するため、HNF4 α 陽性を示す肺腺癌細胞 A549 を用いて HNF4 α のノックダウン実験を行った。TTF-1 の場合とは異なり、HNF4 α をノックダウンによる細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導は確認できなかった。大腸癌の細胞では、HNF4 α のノックダウン実験による細胞増殖の抑制が報告されており (Pan et al. Cancer Res 2020) , 今回の結果との違いの原因についてはさらなる検討が必要と考えられた。HNF4 α のノックダウンが遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を検討したところ、腸上皮の分化マーカーである Villin1 , チロシン型受容体 ERBB3 などの発現抑制が認められた。また、HNF4 α のノックダウンにより、HNF family のなかでも特に HNF1A の発現が抑制された。HNF family のなかで、cross-regulatory network が働いている可能性を示唆する結果と考えられる。

(4) BRM ノックダウン細胞の解析

Non-TRU 型の肺腺癌には、消化器上皮への分化を示す症例群に加えて、EMT 形質を示す低分化な症例群がある。我々は、後者の肺腺癌において、クロマチンリモデリング因子 BRG1/BRM の欠失あるいは発現低下がみられることを報告してきた (Matsubara D. et al. Cancer Sci 2013) 。今回、その因果関係、分子機構を明らかにするため、BRM のノックダウン実験を行った。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 の細胞形態が上皮様から紡錘形へと細胞形態の変化がみられた。形態変化に加えて、E-cadherin の発現低下など EMT 形質が誘導されるとともに、TRU 型の肺腺癌で高発現を示す MET の発現の低下、リン酸化レベルの低下も認められた (図 5 , 6) 。

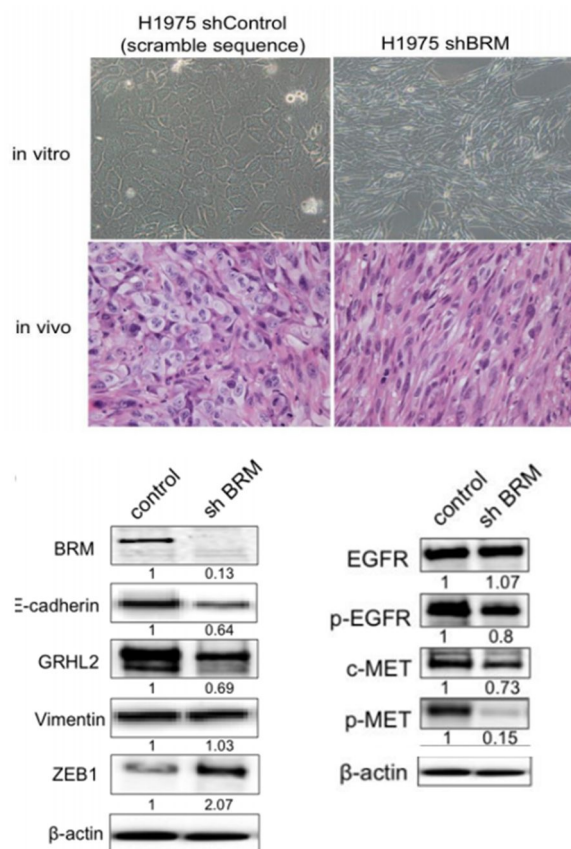


図 5 BRM のノックダウンによる細胞形態の変化。上段は培養細胞、下段はそのゼノグラフト。BRM のノックダウンにより、上皮様から紡錘形へと細胞形態の変化がみられた。

図 6 . BRM のノックダウンによるタンパク発現の変化。BRM のノックダウンにより、上皮形質を示す E-cadherin , GRHL2 の低下に加えて、MET の発現の低下、リン酸化レベルの低下が認められた。

BRG1/BRM が肺腺癌の上皮形質を制御する分子機構を明らかにするため、CHIP (chromatin immunoprecipitation)-sequence 解析を行い、全ゲノム上で BRM が結合する遺伝子領域を約 1000 箇所同定した。BRM の結合部位のなかには、*CDH1* (E-cadherin) 遺伝子、*MET*、*EGFR* など、上皮形質や上皮細胞の生存、増殖に関与する多くの遺伝子が含まれていることが判明した (図 7) 。クロマチンリモデリング因子 BRG1/BRM が上皮の分化、生存、増殖の遺伝子プログラムをダイレクトに制御していることを示したデータと考えている。BRG1/BRM はクロマチン構造を開く作用はあるが、特定の遺伝子配列を認識する訳ではない。なぜ BRG1/BRM のように ubiquitous に発現する分子が様々な細胞で異なる機能を果たすのか？その疑問に対する手がかりとして、例えば表皮細胞では、BRG1 が p63 を介して上皮分化に関わる様々な遺伝子の制御

領域に結合することが報告されている(Yi et al. Cell Mol Life Sci 2020; Smirnov et al. Int J Mol Sci 2019) (図8)。肺腺癌において p63 は発現していないため、腺癌では p63 に代わる何らかの転写因子の存在が推定されるが、今後はその転写因子の同定が課題と考えられる。

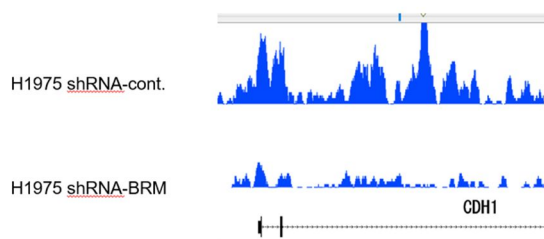


図7 . CHIP-Sequence による解析 . *CDH1* 遺伝子領域に BRM の結合を示すピークが検出され、BRM のノックダウンによりそのピークの低下が認められた。

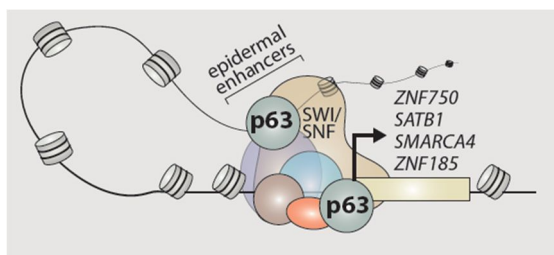


図8 . SWI/SNF と p63 を含む転写複合体が、表皮分化の遺伝子プログラムを制御していることを示す . Smirnov et al. Int J Mol Sci 2019 より .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsubara D, Yoshimoto T, Soda M, Amano Y, Kihara A, Funaki T, Ito T, Sakuma Y, Shibano T, Endo S, Hagiwara K, Ishikawa S, Fukayama M, Murakami Y, Mano H, Niki T.	4. 巻 111
2. 論文標題 Reciprocal Expression of Trefoil factor-1 and Thyroid Transcription factor-1 in Lung Adenocarcinomas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2183-2195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14403	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 Hirai S, Tada M, Yamaguchi M, Niki T, Sakuma Y.	4. 巻 526
2. 論文標題 EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells depend on Bcl-xL and MCL1 for survival.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 417-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.116.	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 Yoshimoto T, Matsubara D, Soda M, Ueno T, Amano Y, Kihara A, Sakatani T, Nakano T, Shibano T, Endo S, Hagiwara K, Fukayama M, Denda-Nagai K, Irimura T, Mano H, Niki T.	4. 巻 110
2. 論文標題 Mucin 21 is a key molecule involved in the incohesive growth pattern in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3006-3011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14129.	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 Ito T, Nakamura A, Tanaka I, Tsuboi Y, Morikawa T, Nakajima J, Takai D, Fukayama M, Sekido Y, Niki T, Matsubara D, Murakami Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 CADM1 associates with Hippo pathway core kinases; membranous co-expression of CADM1 and LATS2 in lung tumors predicts good prognosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2284-2295.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14040.	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 Tada M, Sumi T, Tanaka Y, Hirai S, Yamaguchi M, Miyajima M, Niki T, Takahashi H, Watanabe A, Sakuma Y.	4. 巻 133
2. 論文標題 MCL1 inhibition enhances the therapeutic effect of MEK inhibitors in KRAS-mutant lung adenocarcinoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2019.05.014.	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 Kunita A, Morita S, Iriya TU, Goto A, Niki T, Takai D, Nakajima J, Fukayama M.	4. 巻 8
2. 論文標題 MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports lung adenocarcinoma progression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27128-3.	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 Sumi T, Hirai S, Yamaguchi M, Tanaka Y, Tada M, Yamada G, Hasegawa T, Miyagi Y, Niki T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y.	4. 巻 53
2. 論文標題 Survivin knockdown induces senescence in TTF1-expressing, KRAS-mutant lung adenocarcinomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 33-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4365.	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 Sumi T, Hirai S, Yamaguchi M, Tanaka Y, Tada M, Niki T, Takahashi H, Sakuma Y.	4. 巻 501
2. 論文標題 Trametinib downregulates survivin expression in RB1-positive KRAS-mutant lung adenocarcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 253-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.230.	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松原大祐
2. 発表標題 CADM1 associates with Hippo pathway core kinases; membranous co-expression of CADM1 & LATS2 in lung tumors predicts good prognosis.
3. 学会等名 第65回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsubara D, Yoshimoto T (3rd of 11), Sakuma Y (5th of 11), Endo S (7th of 11), Hagiwara K (8th of 11), Niki T (11th of 11).
2. 発表標題 Reciprocal expressions of TFF-1 and TTF-1 in lung adenocarcinomas.
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shibano T, Yoshimoto T (4th of 9), Matsubara D (6th of 9), Endo S (8th of 9), Niki T (9th of 9).
2. 発表標題 Long-term, 3-dimensional spheroid culture: a putative model to study evolution of detached cancer cells in tumor metastasis.
3. 学会等名 17th Biennial Congress of Metastatic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshimoto T, Matsubara D (2nd of 13), Endo S (8th of 13), Hagiwara K (9th of 13), Niki T (13th of 13).
2. 発表標題 MUC21 is a candidate key molecule involved in the incohesive growth pattern of lung adenocarcinoma.
3. 学会等名 6th JCA-AACR Special Joint Conference "The latest advances in lung cancer research: from basic science to therapeutics" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shibano T, Yoshimoto T (4th of 9), Matsubara D (6th of 9), Endo S (8th of 9), Niki T (9th of 9)
2. 発表標題 Long-term, 3-dimentional spheroid culture: a putative model to study evolution of detached cancer cells in tumor metastasis.
3. 学会等名 2nd Annual Meeting of Research Society for Cancer 3-D Culture
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsubara D, Soda M, Yoshimoto T, Amano Y, Kihara A, Sakuma Y, Endo S, Hagiwara K, Fukayama M, Mano H, Niki T.
2. 発表標題 Reciprocal expressions of TFF-1 and TTF-1 in lung adenocarcinomas.
3. 学会等名 Annual Meeting of American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>自治医科大学統合病理学部門ホームページ http://www.jichi.ac.jp/pathol/</p>

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	松原 大祐 (Matsubara Daisuke) (80415554)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

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
研究分担者	吉本 多一郎 (Yoshimoto Taichiro) (20634166)	自治医科大学・医学部・非常勤講師 (32202)	
研究分担者	佐久間 裕司 (Sakuma Yuji) (10364514)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	萩原 弘一 (Hagiwara Koichi) (00240705)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	遠藤 俊輔 (Endo Shunsuke) (10245037)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

	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	石川 俊平 (Ishikawa Shunpei) (50418638)	東京大学 (12601)	

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