

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07414

研究課題名(和文)オルガノイド培養法を用いた肺腺癌組織亜型評価モデルの確立と形成メカニズム解明

研究課題名(英文) Establishment of for evaluation model of pathological subtypes in lung adenocarcinoma using organoid culture and investigation of formation mechanism

研究代表者

坂部 友彦 (SAKABE, Tomohiko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50639747

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、浸潤性肺腺癌における組織亜型の形成機序解明を目指した検討を行った。腺房型増殖部と充実型増殖部における遺伝子発現比較によって、充実型増殖部における発現変動遺伝子を1272個同定した。増加遺伝子には、細胞増殖に関わる遺伝子が多数含まれており、これらの発現プロファイルは充実型増殖部の病理所見と一致していた。さらに、in silico解析によって充実型増殖部の制御への関与が推定される10種の転写因子を抽出した。このうち、4種類の転写因子は肺腺癌細胞株の細胞増殖を有意に増加させ、これらの転写因子が充実型増殖部の形成・維持に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤性肺腺癌において、充実型増殖部を含む一部の病理学的組織亜型の存在は患者予後不良と相関を示すことが報告されているが、その形成機序は未だ不明であり、特異的な治療も存在していない。本研究で明らかにした充実型増殖部の病理所見と一致する遺伝子発現プロファイルは、新たな観点に基づいた肺腺癌治療法開発の基盤になると考えている。さらに、実際に同定した転写因子が肺腺癌の増殖能を増加させたことから、治療標的として有用であると推測でき、今後さらなる研究を重ねることで新規治療法開発へと応用できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of pathological subtype formation in invasive lung adenocarcinoma (LUAD). Comparison of gene expression profiles between acinar component and solid component identified 1,272 differentially expressed genes in solid component. Genes involved in cell proliferation were abundant among the upregulated genes, and their expression profiles were consistent with the pathological findings in solid component. Additionally, 10 transcription factors were extracted by in silico analysis that seem to be involved in the regulation of solid component. Among them, four transcription factors significantly increased cell proliferation in LUAD cell lines, suggesting that these transcription factors are involved in the formation and maintenance of solid component in LUAD.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：浸潤性肺腺癌 充実型増殖部 RNA-Seq 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌は多数の癌腫の中でも特に腫瘍内不均一性が大きいのが特徴であり、病理診断においてもこの多様性に対応するための組織亜型分類である IASLC/ATS/ERS 分類が 2011 年に報告 (*J Thorac Oncol* 6:244-85:2011)され、本邦の「肺癌取扱い規約」にも採用されている。この分類では、組織内に混在する浸潤性肺腺癌はその増殖形態に応じて肺胞上皮置換型、腺房型、乳頭型、微小乳頭型、充実型の 5 亜型に分類され、このうち肺胞上皮置換型は low grade、腺房型、乳頭型は intermediate grade、微小乳頭型、充実型は high grade に大別されており、腫瘍を占める割合が最も多い組織亜型に基づいて優勢組織亜型が決定される。肺腺癌患者においてこれらの亜型は生命予後に密接に関連しており、特に優勢組織亜型が high grade の患者は予後不良であることが明らかになっている (*Ann Thorac Surg* 98:453-8:2014)。さらに、我々の検討では腫瘍内に 1%以上の割合で high grade 亜型が存在する患者でも有意に予後不良であることを明らかにしている (*Anticancer Res* 36:4923-30:2016)。そのため、high grade 亜型を有する浸潤性肺腺癌に対応する治療法が必要であると推測されるが、現在のところ特異的な治療法や外科切除後の補助療法を行う手段は開発されていない。さらに、治療法開発のためには標的分子探索などの基礎研究が必要であるが、各亜型の分子生物学的プロファイルを検討した研究は乏しく、これらの亜型の発生メカニズムやその分子標的は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、予後不良な high grade 亜型を有する浸潤性肺腺癌患者の長期予後改善のために、組織亜型ごとの分子生物学的プロファイルの解析によって high grade 亜型の形成に関与する分子を特定し、さらに三次元培養による in vitro 発癌モデルを用いた評価モデルを樹立することで、特定した分子の関与を実証するとともに浸潤性肺腺癌における high grade 亜型の形成メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現プロファイル解析

病理病期 I 期の浸潤性肺腺癌患者 7 症例の病理標本から腺房型増殖部、充実型増殖部をレーザーマイクロダイセクションによって切り出した後、Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific)を用いて total RNA を抽出し、Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression (Thermo Fisher Scientific)および Ion Proton system (Thermo Fisher Scientific)を用いた targeted RNA-seq を実施した。1,000,000 リード以上のデータを取得できた 6 症例について、リファレンス配列 (human genome hg19)へのマッピング後に pairwise likelihood ratio test を用いて腺房型増殖部と充実型増殖部の遺伝子発現比較を実施した。False discovery rate (FDR)が 0.05 未満の遺伝子を抽出して発現変動遺伝子 (DEGs)として、Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov>)を用いた gene ontology (GO)解析、Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析を実施した。また、タンパク質ネットワーク解析には Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database および Cytoscape software を用いた。

(2) In silico 解析による遺伝子絞り込み

充実型増殖部における DEGs からの転写因子抽出には ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org>)を使用した。発現プロファイル解析によって抽出した DEGs を用いた Enrichment Analysis によって発現増加遺伝子のプロモーター領域に共通して結合し、転写因子として機能する DEGs を絞り込んだ。絞り込んだ遺伝子の肺腺癌患者癌部、非癌部での発現比較には The Cancer Genome Atlas (TCGA)および Gene Expression Omnibus (GEO)に登録されている病理病期 I 期の肺腺癌患者組織を用いた RNA-Seq、cDNA microarray データ (TCGA-LUAD, GSE32863, GSE40419)を使用した。さらに、TCGA-LUAD データについては遺伝子発現をもとにした高発現郡、低発現郡での無再発生存期間の比較解析にも使用した。

(3) 安定発現株の樹立

抽出した 10 種の転写因子について、肺腺癌細胞株 A549 を用いた安定発現株を樹立した。それぞれの転写因子を組み込んだレンチウイルスベクターを A549 細胞に MOI=50 で感染させ、10 μ g/mL プラストサイジンによる薬剤セレクションを行い、生存細胞をプールして以降の実験に使用した。また、LacZ 遺伝子を組み込んだレンチウイルスを A549 細胞に同条件で感染させてセレクションを行うことでコントロール株を樹立した。樹立した安定発現株については、ウエスタンブロットによって各転写因子の発現増加を確認した。

(4) 細胞増殖アッセイ

細胞増殖アッセイは、Cell Counting Kit-8 (Dojin Kagaku)を用いて実施した。細胞を96ウェルプレートに播種したあと、37℃、5% CO₂存在下でインキュベートし、播種後6、24、48、72時間の時点における吸光度(450 nm)をInfinite M Nano (TECAN)で測定することで細胞増殖能を検討した。

(5) タンパク発現解析 (ウエスタンブロット)

RIPA bufferを用いて抽出したタンパクは、SDS-PAGEによる泳動後にPVDFメンブレン(0.45 μm)へ転写して、5% ECL Prime Blocking Reagent (Cytiva)によるブロッキング処理を行った。その後、各タンパクによる特異的二次抗体、HRP標識二次抗体を反応させて、ECL Prime Detection Reagentを用いて目的タンパクの検出を行った。

(6) スフェロイドアッセイ

スフェロイドアッセイはCell-able 96ウェルプレート (Toyo Gosei Kogyo)を用いた三次元培養によって実施した。細胞(5×10⁴ cells/well)をプレートに播種し、37℃、5% CO₂存在下でインキュベートし、播種後1,2,3日の時点における形成スフェロイドの経時的な形態観察を行うことで、スフェロイド形成における各転写因子の機能解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 腺房型増殖部、充実型増殖部における遺伝子発現プロファイル解析

発現解析の結果、充実型増殖部で変動が認められる1,272遺伝子を発現変動遺伝子(DEGs)として同定した。これらのDEGsのうち、677遺伝子は充実型増殖部における発現増加、595遺伝子は発現低下が認められた。677遺伝子を用いたGO解析では、biological processに含まれる137個のGOタームがこれらの遺伝子にエンリッチされており、特に“mitotic nuclear division”や“DNA replication”のような細胞増殖に関連するタームが有意にエンリッチされていることを明らかにした。また、KEGG pathway解析においても、“DNA replication”、“RNA degradation”、“Cell cycle”などのシグナル経路に関連する遺伝子が濃縮されており、GO解析と同様に細胞増殖に関連する遺伝子群が発現増加していることが明らかになった。これらの結果は、充実性に増殖する充実型増殖部の病理所見と一致しており、病理学的組織亜型の表現型を反映した遺伝子発現プロファイルの検出が可能であることが示唆された。さらに、充実型増殖部では低酸素に対する適応応答で中心的な役割を果たすHIF1Aや抗腫瘍免疫応答からの回避に関わるPD-L1の発現が増加していることが明らかとなり、充実型増殖部の癌細胞が様々なストレスに対して抵抗性を有していることが示唆された。

(2) 充実型増殖部のキーレギュレーター探索

ChIP-AtlasにおけるEnrichment Analysisを実施することで、充実型増殖部における677個の発現増加遺伝子の中でこれらの遺伝子発現を制御している23種の転写因子を抽出した。また、TCGA-LUADおよびGSE32863、GSE40419に登録されている病理病期I期の肺腺癌患者癌部、および非癌部における遺伝子発現データを用いた発現解析を行うことで、非癌部に比べて癌部で発現が増加している転写因子を23種から12種に絞り込んだ。さらに、これらの12種の転写因子について、TCGAの予後データを用いた無再発生存期間分析を実施することで、高発現群で有意に予後不良であった10種を抽出した。この10種の転写因子は、充実型増殖部で発現が増加しているだけでなく、肺腺癌患者の予後に影響を与えることが推測されることから、肺腺癌充実型増殖部のキーレギュレーターであり、治療標的となり得る可能性が高いため、肺腺癌細胞株を用いたさらなる機能解析を実施した。

(3) 細胞増殖能に対するSaTFs発現の影響

充実型増殖部の形成・維持に関わることが推測される10種の転写因子が、充実型増殖部の最も特徴的な表現型である細胞増殖の促進に関与しているかを検討するために、各転写因子を安定導入した肺腺癌細胞株を樹立し、細胞増殖能を比較した。その結果、10種の安定発現株のうち4種類の転写因子の発現増加がそれぞれ有意に細胞増殖を促進することが明らかとなった。さらに、これらの細胞株を用いたスフェロイドアッセイでは、2種類の転写因子の発現増加によって、コントロール株と異なる形態を示すスフェロイドを形成(rough surface, grape-like)することが明らかとなった。今後、スフェロイド形態の変化が細胞の表現型にどのような影響を与えるかを検討する予定である。

(4) SaTFsによる免疫チェックポイント分子への影響

安定発現株において細胞増殖能の増加が認められた4種の転写因子について、免疫チェックポイント分子であるPD-L1発現に対する影響を検討した。PD-L1発現を誘導することが報告されているIFN-γ(10 ng/mL)による処理後24時間の時点におけるPD-L1発現をウエスタンブロットで検討したところ、コントロール株と比較してこれら4種の転写因子の安定発現株ではPD-L1発現が増加しており、IFN-γによる発現誘導能が促進されていることが明らかとなった。これらの結果から、4種の転写因子の発現増加が癌細胞におけるIFN-γ感受性を促進してPD-L1発現

を増加させることで抗腫瘍免疫応答からの回避に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kidokoro Yoshiteru, Sakabe Tomohiko, Haruki Tomohiro, Kadonaga Taichi, Nosaka Kanae, Nakamura Hiroshige, Umekita Yoshihisa	4. 巻 147
2. 論文標題 Gene expression profiling by targeted RNA sequencing in pathological stage I lung adenocarcinoma with a solid component	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2020.06.035	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城所嘉輝、坂部友彦、春木朋広、門永太一、野坂加苗、中村廣繁、梅北善久
2. 発表標題 病理病期I期肺腺癌における充実型増殖の遺伝子発現解析 ~同一腫瘍内の腺房型増殖と比較して~
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会（Web）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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