

機関番号：13901

研究種目：基盤 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590919

研究課題名 (和文) 肺がん治療標的としての上皮間葉系細胞転換 (EMT) 関連分子同定の研究

研究課題名 (英文) Identification of Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Associated Genes as Therapeutic Targets for Lung Cancer

研究代表者 佐藤光夫 (SATO MITSUO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：70467281

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は肺がんの新規治療標的としての上皮間葉系細胞転換 (EMT) 関連分子の同定である。複数の EMT 転写因子遺伝子が発見されているがそれらの中でどの転写因子が優位に作用しているかは十分に明らかとなっていなかった。我々は、4 つの EMT 転写因子 (ZEB1, TWIST, SLUG, SIP1) の中で ZEB1 が最も優位性をもって肺がんの EMT に寄与していることを発見した。さらに、ZEB1 のノックダウンが肺がん細胞の足場非依存性増殖を強く抑制することを発見した。また、悪性胸膜中皮腫の増殖においても ZEB1 が重要な働きをしていることを示した。以上の研究成果は ZEB1 が肺がんおよび悪性胸膜中皮腫における有望な治療標的であることを示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

The aim of this study is to identify epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-associated genes as novel therapeutic targets for lung cancer. While several EMT-inducing genes have been discovered, which of these have the dominant role in EMT of lung cancer was not clear. We found that among four EMT-inducing genes (ZEB1, TWIST, SLUG, SIP1) ZEB1 plays the dominant role in EMT of lung cancer. Furthermore, we found that ZEB1 knockdown suppresses the growth of lung cancer cells. In addition, we also showed ZEB1 knockdown suppresses the growth of malignant pleural mesothelioma cells. These results suggest that ZEB1 may be a promising therapeutic target for lung cancer and malignant pleural mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：上皮間葉系細胞転換、非閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉系細胞転換 (EMT) は上皮系細胞が上皮系細胞の形態的特徴を失い間葉系細胞の性質 (運動能、浸潤能) を獲得するプロセスである。本研究を開始した平成 20 年

当時は EMT は胎生期の発生において重要な役割を果たすことが知られていた。さらにがん化の過程においても EMT が重要な役割を果たし、また、がん幹細胞の性質とも関係することを示唆する報告がなされた。この

ような背景に基づいて本研究を着想した。

2. 研究の目的

肺癌治療標的としての上皮間葉系細胞転換(EMT)関連分子同定

3. 研究の方法

細胞株、臨床腫瘍検体

肺癌細胞株、肺癌腫瘍検体、悪性胸膜中皮腫、正常中皮細胞株を対象とした。

発現解析

代表的な既知の EMT 誘導遺伝子の発現をリアルタイム PCR 及びウエスタンブロットにて解析した。また、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析も行った。

ノックダウン実験

RNA 干渉にてノックダウン実験をおこなった

細胞増殖実験

バイアビリティアッセイ、軟寒天中におけるコロニー形成能、ヌードマウス皮下における腫瘍形成能の評価を行った

4. 研究成果

(1)4 つの EMT 誘導転写因子(ZEB1, TWIST, SLUG, SIP1) の中で ZEB1 が最も優位性をもって肺癌における EMT に寄与していることを発見した (図 1)。

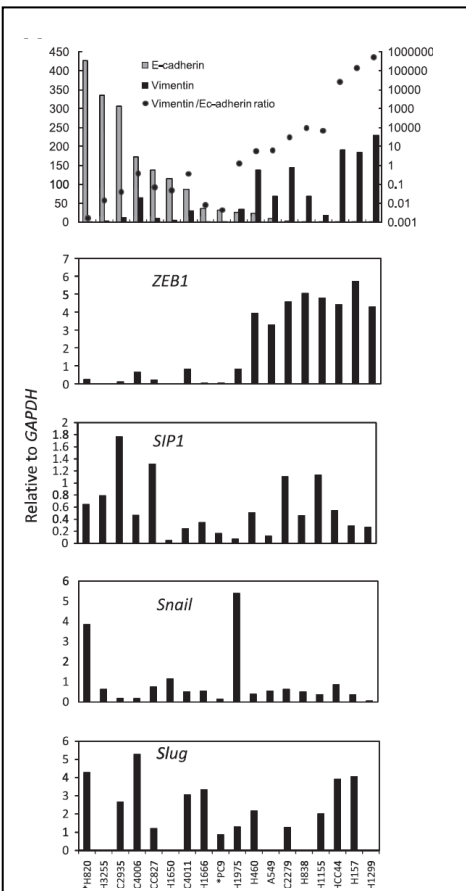


図 1 肺癌細胞における EMT 誘導遺伝子の発現 (Takeyama Y. Cancer Letters 2010)

(2)肺癌細胞株において RNA 干渉による ZEB1 遺伝子のノックダウンを行った (図 2)。H460 細胞においては ZEB1 遺伝子のノックダウンは上皮性マーカーである E-cadherin の発現上昇を導いた。

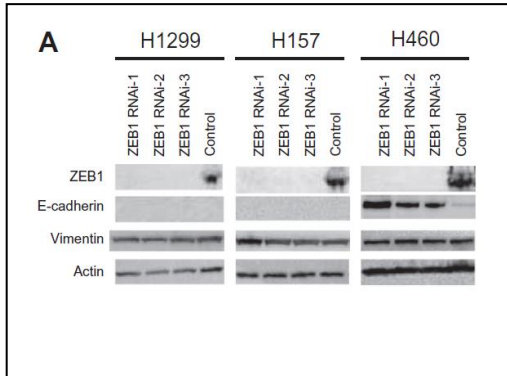


図 2 肺癌細胞における EMT 誘導遺伝子 ZEB1 のノックダウン (Takeyama Y. Cancer Letters 2010)

(3) ZEB1 のノックダウンは肺癌細胞の増殖、足場非依存性コロニー形成 (図 3) を抑制した。

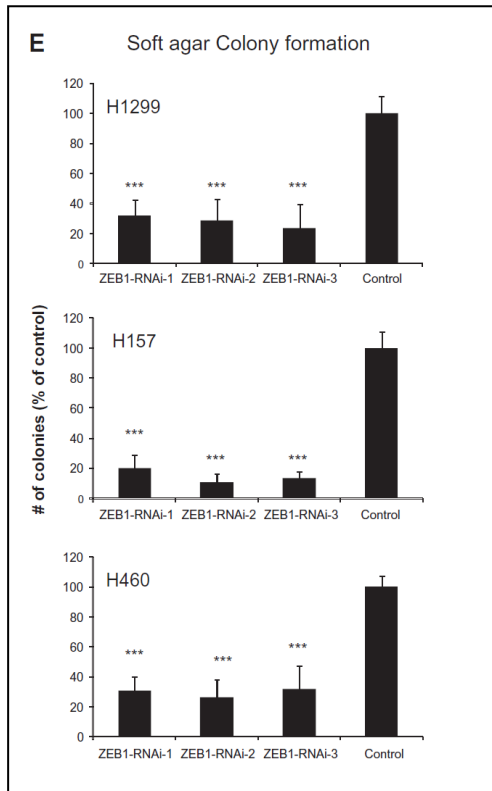


図 3 肺癌細胞における EMT 誘導遺伝子 ZEB1 のノックダウンは足場非依存性コロニー形成 (図 3) を抑制する (Takeyama Y. Cancer Letters 2010)

(4) ZEB1 のノックダウンによる増殖抑制のメカニズムを解明するために、アポトーシスアッセイ、細胞周期アッセイ、細胞老化アッセイを行った。細胞周期アッセイ、細胞老化アッセイでは比較対照と比べ変化を認めなかった。アポトーシスアッセイでは ZEB1 のノックダウンは H460 肺癌細胞のアポトーシスを誘導した (図 4)。一方 H1299, H157 細胞ではアポトーシスは認められず、それらの細胞における増殖抑制のメカニズムは不明であった。

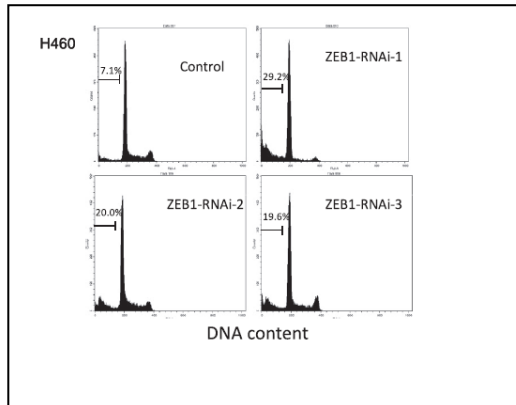


図 4 肺癌細胞 H460 における ZEB1 のノックダウンはアポトーシスを誘導する。

(Takeyama Y. Cancer Letters 2010)

(5) ZEB1 のノックダウンは H460 肺癌細胞のヌードマウス皮下における増殖を抑制した。

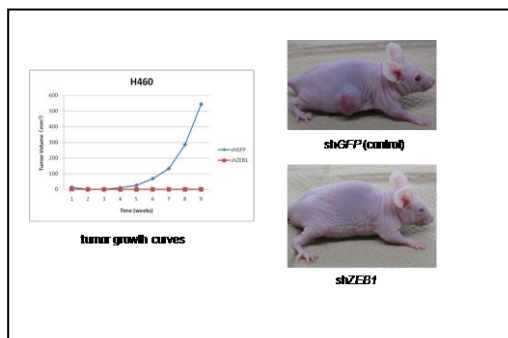


図 5 肺癌細胞 H460 における ZEB1 のノックダウンはヌードマウス皮下における腫瘍形成を抑制する。

(6) ZEB1 のノックダウンは悪性胸膜中皮腫細胞の増殖、足場依存性コロニー形成 (図 6)、足場非依存性増殖を抑制した。

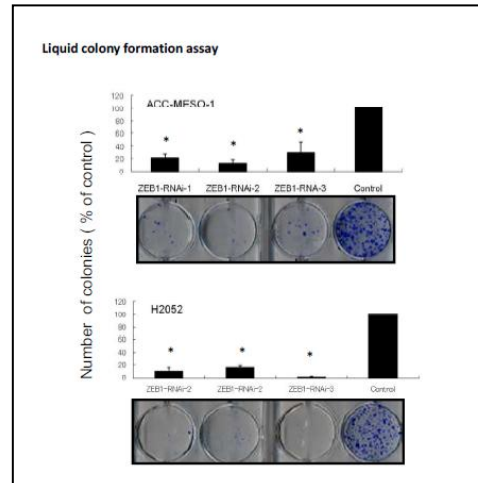


図 6 悪性胸膜中皮腫細胞における ZEB1 のノックダウンは足場依存性増殖を抑制する。(Horio et al 投稿中)

(7) 悪性胸膜中皮腫細胞における ZEB1 の安定ノックダウンは細胞形態の間葉系から上皮系への変化を導いた (図 7)

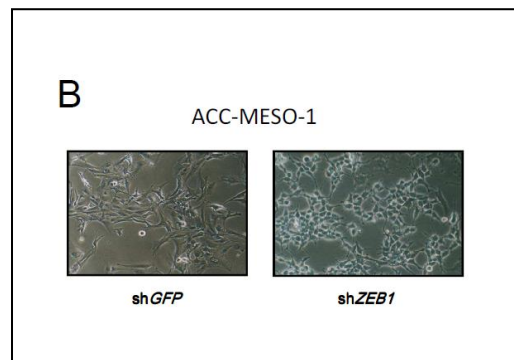


図 7 悪性胸膜中皮腫細胞 ACC-MESO-1 における ZEB1 の安定ノックダウンは細胞形態の間葉系から上皮系への変化を導いた。

(Horio et al 投稿中)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Sunaga N, Sato M et al. Knockdown of Oncogenic KRAS in Non-Small Cell Lung Cancers Suppresses Tumor Growth and Sensitizes Tumor Cells to Targeted Therapy. Mol Cancer Ther 2011; 10: 336-46. 査読あり

2. Takeyama Y, Sato M, Horio M, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses

anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer Lett* 2010; 296: 216-24. 査読あり

3. Inada M, Sato M, Morita S, et al. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2010; 48: 729-34. 査読あり

4. Yamamoto H, Sato M, et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res* 2008; 68: 6913-21. 査読あり

5. Kwei KA, Sato M, et al. Genomic profiling identifies TITF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene* 2008; 27: 3635-40. 査読あり

6. Iwanaga K, Sato M, et al. Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 1119-27. 査読あり

7. Guha U, Sato M, et al. Comparisons of tyrosine phosphorylated proteins in cells expressing lung cancer-specific alleles of EGFR and KRAS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14112-7. 査読あり

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Mitsuo Sato et al. 第 101 回アメリカ癌学会総会、2010 年 4 月、ワシントン D C, アメリカ合衆国、Knockdown of ZEB1, a master EMT gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. ポスター発表、平成 22 年 4 月 19 日発表
- ② Mihoko Horio, Mitsuo Sato et al. 第 101 回アメリカ癌学会総会、2010 年 4 月、ワシントン D C, アメリカ合衆国、Knockdown of ZEB1, a master EMT gene, suppresses growth of pleural mesothelioma cell lines. ポスター発表、平成 22 年 4 月 19 日発表
- ③ 佐藤光夫ら、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 大阪、5 つの遺伝子変化と血清による EMT 誘導は正常気管支上皮細胞を完全にがん化させる、口頭発表、平成 22 年 9 月 22 日発表

〔図書〕（計 1 件）

抗癌性腫瘍薬コンサルトブック、南江堂、2010 年 2 月、分担執筆（263-277page 担当）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 光夫 (SATO MITSUO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任助教・

研究者番号：70467281

(2) 研究分担者

長谷川 好規 (HASEGAWA YOSHINORI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20270986

安藤 雄一 (ANDO YICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20270986

澤木 正孝 (SAWAKI MASATAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：20402597

満間 綾子 (MITSUMA AYAKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：10467326

河田 健司 (KAWADA KENJI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助手

研究者番号：30418743

(3) 連携研究者

なし