

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17231

研究課題名(和文)非小細胞肺癌におけるEPPK1を標的とした病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文)A mechanism and novel targeted therapy for EPPK1 in non-small cell lung cancer

研究代表者

有村 健 (Arimura, Ken)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60771269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙暴露実験によりEPPK1は喫煙により上昇し、また、初期肺腺がんではEPPK1は喫煙と関連し高発現群で予後不良因子である事を示した。肺腺がん細胞株に対するEPPK1ノックアウト(KO)により野生株と比較して間葉上皮転換をきたし、増殖能、浸潤能が低下する事を証明した。RNA seqによりKO株は野生株と比較して11のがん遺伝子発現が上昇し、8つのがん抑制遺伝子発現が低下した。KOによりMYC発現の低下とp53発現の上昇する事をRNA seq、ウエスタンブロットで確認した。EPPK1は肺腺がんにおいてMYC/p53 pathwayに関連し発がん重要な役割を果たし、治療標的になる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌、特に肺腺がんにおけるEPPK1が果たす病態解明を明らかにした。また、喫煙とtumorigenesisに関連している可能性を示した。このため、肺腺がんにおいてEPPK1標的とした治療法開発につながるため社会的意義のある研究であった。

研究成果の概要(英文)：EPPK1 expression is associated with smoking and poor prognosis in early-stage lung cancer. We used CRISPR-Cas9 to knockout of EPPK1 and observed that cancer cells underwent a transition from a mesenchymal to epithelial state, leading to decreased cell proliferation and invasion. Furthermore, RNA seq showed that the knockout of EPPK1 caused the downregulation of 11 oncogenes, and the upregulation of 8 tumor suppressor genes. We also observed downregulation of MYC and upregulation of p53 expressions at both the protein and RNA levels after the knockout of EPPK1. Similarly, gene ontology enrichment analysis of molecular function revealed that EPPK1 mRNA was associated with the function of the regulation of mesenchymal cell proliferation, mesenchymal differentiation, and cell growth. Our findings suggest that EPPK1 is associated with smoking and plays a role in regulating cancer progression and tumorigenesis. Therefore, EPPK1 is a potential therapeutic target for lung adenocarcinoma.

研究分野：胸部腫瘍

キーワード：EPPK1 CRISPR-Cas9 MYC/p53 pathway

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

応募者は米国国立がん研究所のデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータを用いた解析によりエピプラキン 1 (EPPK1) mRNA は正常肺組織と比較して肺腺がん (ADC)、肺扁平上皮がん (SCC) において上昇していること ($P < 0.001$) を明らかにしている。自施設検体を用いて免疫染色 (IHC) を行った。EPPK1 蛋白質は stage1, stage1,2 では EPPK1 高発現群で予後が悪い事を示した。また、ADC の全生存期間 (OS) に関して 1 日の箱数 × 年数である喫煙指数、性別を考慮して multivariable Cox regression model を用いた多変量解析を行った。stage1,2 の早期 ADC は stage3,4 と比較して OS に関連する事 ($P < 0.001$) を明らかにした。EPPK1 は ADC の発がんに関わる可能性と喫煙に関連して重要な役割を果たしている可能性が高いことが考えられた。本研究で EPPK1 と喫煙、肺がんの関係を明らかにすることで、肺がんの危険因子、早期診断、早期治療、分子標的薬の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

肺がんにおける喫煙と EPPK1 の関係を証明し、EPPK1 は治療ターゲットとなりうる可能性を *in vitro* で明らかにする。本研究は喫煙によって EPPK1 発現が促進した結果、肺がん発症のリスクが高まり、その予後に影響を与えると想定している。創薬ターゲットとなりうる可能性と併せて病態生理を解明する。

3. 研究の方法

smoking machineにより正常気管支上皮細胞に4カ月(16w)喫煙曝露を計3回行う。

実際の人間の肺環境に近い状態を再現するために 6well の Air Liquid Interface (ALI) を用いて正常気管支上皮細胞株である BEAS2B に対して喫煙曝露を行い喫煙 (+) 群と喫煙 (-) 群を用意する。Western Blot (WB) による喫煙 (+) 群と喫煙 (-) 群の EPPK1 蛋白質の比較と喫煙が正しく行われていること確認するため DNA 二重鎖らせん構造損傷マーカーである H2AX を蛍光免疫染色 (IF) と WB により定量比較を行う。

非小細胞肺がん細胞株 A549 に対して CRISPR-Cas9 を用いて EPPK1 ノックアウト (KO) を行い WB、RNA seq で EPPK1 が KO されていることを確認する。

KO 群と wild type (WT) 群の細胞増殖能と細胞浸潤能比較を行う。WB で上皮間葉転換 (EMT) とその逆の間葉上皮転換 (MET) マーカーである E-cadherin、Vimentin、血管新生能マーカーである VEGF-A を比較確認する。

15282 遺伝子の変化に関して網羅的 RNA seq による WT 群と KO 群の比較を行う。その結果より特徴的ながん遺伝子に関して WB 定量比較を行う。また、細胞増殖能、MET に関して gene ontology (GO) enrichment 解析を行う。

4. 研究成果

気管支上皮細胞株 BEAS2B に 4 カ月喫煙曝露し control 群と EPPK1 蛋白質発現比較を行い、肺腺がん細胞株 A549 に対して CRISPR-Cas9 を用いた EPPK1 遺伝子 KO 後、野生株と比較した。4 カ月煙草曝露後、WB と IF で EPPK1 が増加することを示した。また、EPPK1 遺伝子 KO 後、WT と比較して WB で MET が起きる事、機能テストで細胞浸潤能、細胞増殖能低下をきたす事を示した。EPPK1 KO 後は WT と比較して網羅的 RNA seq によりがん遺伝子、転写因子 C-MYC、MYCN 低下、ア

ポトース抑制がん遺伝子 BCL2 低下、がん抑制遺伝子 p53 上昇する事、Western Blot で同様に C-MYC 低下、p53 上昇する事を明らかにした。

Go enrichment 解析では EPPK1 遺伝子は WT 群では細胞増殖、間葉系細胞増殖、血管新生能に関わる事を示した。このため EPPK1 は非小細胞肺癌において喫煙と tumorigenesis に関連している可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 有村健
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるEPPK1遺伝子を標的とする治療法の可能性
3. 学会等名 日本呼吸器学会2022
4. 発表年 2022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
---------	---------