

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号:32409

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2009~2011

課題番号:21591001

研究課題名(和文) 肺癌予後診断マーカー探索と個別化医療へのゲノムワイドなアプローチ

研究課題名(英文) Exploration of a prognostic biomarker for lung cancer as personalized medicine using a genome-wide approach

研究代表者

小山 信之(KOYAMA NOBUYUKI)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号:30353460

研究成果の概要(和文):

I 期非小細胞肺癌外科切除検体を用いた EZH2 蛋白に対する免疫組織化学から、EZH2 発現症例群は非発現症例群に比して有意に生存期間が短いことが判明した。Cox 比例ハザードモデルでは、EZH2 非発現が単独で生存期間延長に関連する因子だった。以上から EZH2 が I 期非小細胞肺癌術後に対する予後予測因子となる可能性が示された。さらに shRNA による EZH2 発現抑制後に In vitro cell growth assay および Matrigel invasion assay を行い、EZH2 発現抑制により有意に肺癌細胞の増殖抑制と浸潤能・転移能低下が見られた。これらの結果から、EZH2 が肺癌において、癌遺伝子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

Using immunohistochemistry for EZH2, we showed that the EZH2-expressing group reduced survival of stage I NSCLC compared with the non-EZH2-expressing group. In COX proportional hazard models, the non-EZH2-expressing group was independently associated with prolonged survival. These results suggest that EZH2 can be a novel predictive factor for prognosis in postsurgical NSCLC at stage I. Furthermore, using shRNA-mediated knockdown of EZH2 expression, in vitro cell growth assay and matrigel invasion assay showed that the suppression of EZH2 expression inhibited cellular proliferation and reduced invasion and metastatic potentials. Thus, EZH2 may function as an oncogene.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：EZH2 非小細胞肺癌 予後予測因子 ゲノムワイド 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

肺癌は様々な治療法の開発にも関わらず年間死亡者数が世界で130万人以上、日本で6万人以上と全癌中最多である。そのため新たな治療法や早期診断、早期治療に結びつくマーカー等の新たな診断法の開発が最も望まれている癌であるが、いまだ途上段階であり十分とはいえない。

Polycomb 遺伝子群 (PcG) はクロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現を抑制する遺伝子の総称であり、PcG に属する複数の蛋白質によって複合体、Polycomb repressor complex (PRC) を形成し、機能を発揮する。Enhancer of zeste homolog (EZH2) は PRC2 の構成分子であり、ヒストン H3 の Lysine 9 と 27 に対するメチル化を促進し、さまざまな遺伝子発現を抑制することがわかっている (Laible G et al. *EMBO J.* 1997. 16, 3219-32.). EZH2 に関する研究は発生学、幹細胞および癌増殖経路に関する分野において盛んであり、EZH2 は幹細胞において重要であることがわかっているが、最近 EZH2 の過剰発現が前立腺癌の転移に関与している可能性があると報告された (Varambally S et al. *Nature.* 2002. 419, 624-9.). さらに前立腺癌のほか、乳癌、肝細胞癌、膀胱癌、悪性リンパ腫、胃癌でも発現と臨床病理学的特徴との関係が報告されてきており、EZH2 が癌の生物学的特性に関与している可能性が示唆されている (Kleer CG et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003. 100, 11606-11; Sudo T et al. *Br J Cancer.* 2005. 92, 1754-8; Weikert S et al. *Int J Mol Med.* 2005. 16,

349-53; Raaphorst FM et al. *Am J Pathol.* 2000. 157, 709-15; Matsukawa Y et al. *Cancer Sci.* 2006. 97, 484-91.). しかしながらこれまでに肺癌と EZH2 の関係についての報告は少なく、肺癌の臨床病理学的特徴や生物学的特性、分子病態と EZH2 の関係はよくわかっていない。肺癌、特に非小細胞肺癌は治療反応性や予後を規定、予測する臨床上有用なマーカーに乏しく、以上のことから EZH2 がマーカーとしての候補となることが期待される。

2. 研究の目的

我々は以前、20 種類の肺癌細胞株における EZH2 mRNA の発現を realtime PCR を用いて解析し、60% 以上の細胞株で発現が有意に亢進していることを確認した。さらに EZH2 mRNA の発現亢進がみられている細胞株に対して抗 EZH2 抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、EZH2 蛋白質の著しい発現が認められていた。多くの肺癌細胞株において、EZH2 が mRNA と蛋白レベルともに発現亢進していることが確認されたことから、EZH2 が肺癌の病態に対して影響を及ぼしている可能性が示唆された。これら肺癌細胞株での実験結果をもとに、臨床検体を用いての EZH2 発現に関する研究を計画し、埼玉医科大学倫理委員会にて審査を受けて研究の承認を得た。

今回の研究の目的は、EZH2 の肺癌における発現頻度を調べ、発現と肺癌の臨床病理学的特徴、特に予後・生存期間との相関を解析することである。患者同意を得て一部の非小細胞肺癌切除検体 (50 例) に対して解析したところ、EZH2 の非発現群が低発現、高発現群に比し、有意に生存期間の延長がみられている

ことがわかった(第48回日本呼吸器学会学術総会等の学会にて発表)。更に解析数を増やし、最終的に100-120例を解析してEZH2が予後診断マーカーとなるか否かを最終的に評価する。

本研究では肺癌の80%以上を占める非小細胞肺癌のうち、長期の予後調査が可能な一方で早期にもかかわらず他癌腫と比較して再発の多いI期非小細胞肺癌の症例を対象として、基礎と臨床の両面からアプローチを行う。これらからEZH2と非小細胞肺癌との関係について評価するが、これまでの成果からEZH2非発現症例が有意に生存期間の延長を示す可能性が高く、EZH2が新たな予後診断マーカーの一つとなることが予想される。また本研究ではさらに*in vitro*解析を用いて、EZH2が非小細胞肺癌細胞増殖・浸潤・転移に重要な役割を果たしているのか否かを明らかにする。以上からEZH2が非小細胞肺癌における予後予測因子となる裏付けが可能となり、EZH2を予後診断マーカーとして用いることで、今後I期非小細胞肺癌外科切除症例については、術後化学療法を含めた術後の治療方法がEZH2発現により決定することになる可能性もあり、肺癌個別化医療へ寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 検体：患者(死亡例は遺族)同意を得た後、2000年から2007年に埼玉医科大学病院および埼玉医科大学国際医療センターにおいて施行されたI期非小細胞肺癌外科切除症例の切除検体のパラフィン標本(解析目標106例)に対し匿名化を行った後、その後の解析に用いる。なおEZH2発現解析については、すでに埼玉医科大学倫理委員会の審査にて承認されている。

(2) 免疫組織化学：病理診断科にて保存パラフィン標本から薄切片を作製する。その

後呼吸器内科研究室にて薄切片に対して抗ヒトマウスEZH2モノクローナル抗体を一次抗体として用いた免疫染色を行い、肺癌組織におけるEZH2蛋白の発現を半定量的に解析する。発現の程度は、過去の報告(Matsukawa Y et al. Cancer Sci. 2006. 97, 484-91.)をもとに非発現群と発現群に分類し、生存期間に対する解析においては、発現群をさらに低発現(50% $>$)、高発現(50% $<$)の2段階に細分類することとする。各群における男女比、年齢、組織型、組織分化度、病期、腫瘍径、生存期間等の臨床病理学的特徴、特に生存期間を中心に解析し、発現状態との相関を調べる。

(3) EZH2の機能解析：EZH2の肺癌に対する機能を解析するため、EZH2に対するsiRNAまたはEZH2抗体を用いて非小細胞肺癌細胞におけるEZH2発現を抑制することにより、細胞の増殖、浸潤能に変化が生じるか否かを確認する。細胞増殖能に関しては*in vitro* cell growth assayを用い、細胞浸潤能、転移能を評価するためにMatrigelを用いた細胞遊走/浸潤アッセイ(Matrigel invasion assay)を用いる。

(4) 統計解析：EZH2発現と臨床病理学的特徴との関係については、生存期間に対してKaplan-Meier生存曲線とlog-rank検定を行った以外は、t検定または χ^2 検定にて解析する。生存期間とEZH2発現に有意差を生じた因子については、Cox比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行う。*in vitro* cell growth assayおよびMatrigel invasion assayにおいては、median検定にて有意差を評価する。

4. 研究成果

Realtime-PCRを用いて20種類の肺癌細胞株

におけるEZH2 mRNA発現を確認したところ、ヒト肺におけるEZH2 mRNA発現に比して20種類中11種類の細胞株で有意(2.0)に発現亢進が認められた。この結果から肺癌においてEZH2が何らかの働きを有している可能性が示唆されたため、I期非小細胞肺癌計106例に対して外科切除標本を用いて免疫組織化学によるEZH2発現解析を行い、EZH2非発現群とEZH2発現群に分類し、後者はさらにEZH2低発現群とEZH2高発現群に分類した。EZH2非発現群と発現群の2群において、性別、年齢、組織型、組織分化度、病期、腫瘍径、病理学的因子等の臨床病理学特徴について比較を行ったところ、EZH2発現群で腫瘍径が有意に大きいことが判明した。生存期間とEZH2発現に関する解析では、EZH2非発現群において有意に生存期間延長を認めた。さらに生存期間に寄与する因子を調査するために行ったCox比例ハザードモデルでは、EZH2発現と腫瘍径が生存期間に単独で寄与する因子であることが判明した。以上からEZH2発現が肺癌の予後に対して負に關与している可能性が示された。

次にIn vitroに関する解析を用いて、肺癌に対するEZH2の機能を解析した。EZH2発現肺癌細胞株であるA549細胞とEZH2低発現肺癌細胞株であるNCI-H1299細胞に対してEZH2に対するShort-hairpin RNA (shRNA)を用いたEZH2 mRNAノックダウンによるEZH2発現抑制を行った。その後EZH2発現抑制による肺癌細胞増殖変化を確認するためにIn vitro cell growth assayを行うとともに、肺癌細胞浸潤能・転移能変化を評価するためにMatrigel invasion assayを行った。EZH2に対するshRNAの塩基配列をランダムに配列したスクランブルshRNA (Mock)を導入した細胞およびshRNAを行って

いない細胞とEZH2に対するshRNAを導入したEZH2発現抑制細胞を比較したところ、In vitro cell growth assayでは、EZH2発現抑制細胞において有意に増殖抑制が見られ、Matrigel invasion assayにおいても、EZH2発現抑制細胞において浸潤能・転移能低下が見られた。以上から、EZH2が非小細胞肺癌細胞の増殖および浸潤・転移を促進することが判明した。以上の成果から、EZH2がI期非小細胞肺癌術後の予後因子となる可能性が強く示されたため論文の作成を行い、Cancerに平成23年8月に電子版掲載、更に平成24年3月雑誌掲載となった。

一方、研究をさらに発展させるために、EZH2による肺癌増殖機構を更に解明することを目的とし、そのためにはEZH2のeffectorを同定する必要があると考え、ChIP-on-chipを用いてEZH2の結合するDNA部位の同定を試みることにした。前段階としてEZH2抗体またはH3K27抗体を用いたChIP解析を行い、これらの抗体に対応する蛋白(EZH2、H3K27)が結合するDNA部位を抽出することから開始した。これまでにEZH2、H3K27が細胞周期、Wnt/カテニンに対するシグナル伝達系など関係している可能性を示した報告が散見することを考慮して、これらの経路に關与する既存の分子をあらかじめ選択して、抽出したDNAに対してPCRを用いて、検出を試みた。現在そのうち数種類の分子は検出が可能となり、ChIPによりEZH2、H3K27の結合するDNA部位を抽出することが可能と判断して、抽出成分に対するtiling arrayを用いてEZH2、H3K27の結合するDNA部位をゲノムワイドに半定量的解析を行い、正確で詳細なeffector探索を行うこととして、開始した。

以上から、EZH2の働きを更に明らかにすることで、未知の肺癌分子機構解明につながる事が期待される。

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)(英文は、全て査読あり)

[雑誌論文](計 2件)

1. Huqun, Ishikawa R, Zhang J, Miyazawa H, Goto Y, Shimizu Y, Hagiwara K, and Koyama N. Enhancer of Zeste Homolog 2 Is a Novel Prognostic Biomarker in Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer*, 2011

2. Yokoyama T, Koyama N, Kodama K, Hagiwara K, Kanazawa M. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for relapsing polychondritis as a diagnostic approach and evaluation of disease activity. *BMJ Case Reports*, Epub 2009

[学会発表](計 13件)

1. 小山 信之 | 1期非小細胞肺癌に対する予後因子としての EZH2: 発現と機能解析
第6回肺癌分子病態研究会
2011年9月3日 東京

2. 小山信之、嶺崎祥平、前野有理、山崎進、内田由佳、加賀亜希子、岡野哲也、村山芳武、小林国彦 当院における高齢者に対する気管支鏡検査の検討
第34回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、
2011年6月16日静岡

3. Koyama N, Ishikawa R, Miyazawa H, Hagiwara K, and Kobayashi K. EGFR gene mutation as a predictive marker of the response to pemetrexed-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. The 102st American

Association for Cancer Research Annual Meeting
2011, USA, 2011年4月2日 オーランド

4. 小山信之、長井良昭、内田義孝、前野有理、嶺崎祥平、内田由佳、大谷秀雄、村山芳武、小林国彦 非小細胞肺癌症例への Pemetrexed 治療に対する臨床的検討
第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日広島

5. 内田義孝、小山信之、小宮山謙一郎、嶺崎祥平、内田由佳、宮下起幸、前野有理、大谷秀雄、村山芳武、小林国彦 当院における再発・進行非小細胞肺癌症例に対する erlotinib 治療の臨床的検討 第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3日 広島

6. Sadakata R, Miyazawa H, Jialing Z, Huqun, Gotoh Y, Shimizu Y, Kobayashi K, Ishikawa Y, Hagiwara K, and Koyama N. HYAL2 promoter methylation analysis in malignant pleural mesothelioma. 第68日本癌学会学術総会、2010年10月1日 神奈川

7. 小山信之、貞方里奈子、張嘉玲、呼群、後藤義也、清水禎彦、小林国彦、石川雄一、萩原弘一 悪性胸膜中皮腫における HYAL2 DNA プロモーター領域のメチル化解析 第50回日本呼吸器学会学術講演会、2010年4月22日 東京

8. Koyama N, Zhang J, Sadakata R, Huqun, Goto Y, Shimizu Y, Kobayashi K, Ishikawa Y, Hagiwara K. Hypermethylation of semaphorin 3B promoter in malignant mesothelioma. The 101st American Association for Cancer Research Annual Meeting 2010, USA, 2010年4月17日 ワシントン D.C

9. 小山信之、張嘉玲、呼群、石川雄一、
小林国彦、萩原弘一 悪性胸膜中皮腫の
Semaphorin 3B プロモーター領域 DNA メチル
化解析 第 50 回日本肺癌学会総会、
2009 年 11 月 12 日 東京

10. 小山信之、張嘉玲、呼群、石川雄一、
小林国彦、萩原弘一 悪性胸膜中皮腫にお
ける Semaphorin 3B プロモーター領域の DNA
メチル化解析 第 68 日本癌学会学術総会、
2009 年 10 月 30 日 神奈川

11. 小山信之 Ezh2と肺癌 内蒙古医学院
セミナー 2009年8月27日 中国

12. 小山信之、張嘉玲、呼群、石川雄一、小
林国彦、萩原弘一 悪性胸膜中皮腫におけ
る SEMA3B メチル化解析 第 49 回日本呼
吸器学会学術講演会、2009 年 5 月 29 日

13. Koyama N, Huqun, Enhancer zeste homolog
(EZH) 2 expression reduces the survival of the
patients with non-small cell lung cancer. 100th
American Association for Cancer Research
2009.4.22 Denver CO USA

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小山 信之 (KOYAMA NOBUYUKI)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30353460