

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591145

研究課題名(和文) 肺癌の上皮間葉細胞転換原因遺伝子と新規治療標的の探索研究

研究課題名(英文) Exploratory study for identifying EMT-associated genes as novel therapeutics for lung cancer

研究代表者

佐藤 光夫 (Mitsuo, Sato)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70467281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA miR-221, miR-222の肺癌の新規治療薬としての可能性を検討した。miR-221, miR-222は一部の肺癌細胞株の増殖を促進したが、その他の細胞においては、抑制作用を示した。さらに、我々は、miR-221, miR-222の肺癌細胞の増殖抑制作用がS期停止とアポトーシスを介すると明らかとした。以上の結果はmiR-221, miR-222の肺癌の新規治療薬としての可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the potential of miR-221 and miR222 as novel therapeutics for lung cancer. These microRNAs are shown to induce epithelial to mesenchymal transition (EMT) in normal mammary epithelial cells. Upon introduction of miR-221 or miR222, immortalized normal human bronchial epithelial cells underwent morphological changes, suggestive of EMT, in association with expression changes in EMT-associated genes. miR-221 and miR222 promoted growth in several lung cancer cell lines but suppressed in other cell lines. Cell cycle and apoptosis analyses revealed that growth suppressive effects by miR-221 and miR-221 occur through S-phase arrest and/or apoptosis. These data suggested the potential of miR-221 and miR222 as novel therapeutics for lung cancer.

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：肺癌 マイクロRNA 上皮間葉細胞転換

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉細胞転換 (Epithelial to mesenchymal transition, EMT)とは胎生期の臓器形成に寄与するプログラムであり、上皮系細胞が間葉系細胞へと転換する現象である。肺癌を含む固形癌における EMT の癌細胞の様々な悪性形質獲得への寄与が示されつつあった。癌の EMT 誘導機序としては、微小環境中の間質系細胞や癌細胞自身が分泌する液性因子 (増殖因子、サイトカイン)などを介するものが知られていた。一方で、癌細胞自身が蓄積する遺伝子異常が EMT にどの程度寄与しているかは十分明らかではなかった。不死化正常気管支上皮細胞株 (HBEC) は研究代表者らが開発した正常細胞株である。研究代表者は HBEC が癌の種類の悪性形質を持たない上皮性の細胞であることより、肺癌の EMT 解析の有用なモデルであると考えた。また、約 20 塩基からなるマイクロ RNA と呼ばれる微小分子が、遺伝子発現を制御することが明らかとなり、発癌過程においても、癌関連遺伝子の発現制御により、重要な役割を果たすことが明らかとなりつつあった。

2. 研究の目的

当初は HBEC 細胞を用いた肺癌細胞の遺伝子異常の EMT への寄与度の評価と EMT 関連の新規治療標的探索を目的とした。HBEC 細胞の EMT モデル確立が困難であったため、マイクロ RNA、miR-221 と miR-222 の肺癌治療への応用の可能性を評価した。両マイクロ RNA は乳腺上皮の EMT 誘導が示されており、肺癌では癌遺伝子としての報告があるが、限られた細胞株での評価であり更なる評価が必要と考えた。

3. 研究の方法

(1)細胞株: *Cdk4* と *hTERT* 遺伝子の導入により不死化した HBEC4 細胞と 6 つの肺癌細胞株 (H460, H838, H1299, H3255, HCC4006,

HCC4011) を使用。

(2)RNA 抽出と定量的リアルタイム PCR: トライゾールによって RNA を抽出し、*E-CADHERIN*, *VIMENTIN*, *ZEB1*, *SIP1(ZEB2)*, *SNAIL*, *SLUG*, *p27^{Kip1}*, *p57* 遺伝子の定量的なリアルタイム PCR を行いそれらの遺伝子の mRNA 発現を定量した。

(3)マイクロアレイ: 3D-Gene Human Oligo chip 25 k (東レ)を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(4)ウエスタンブロット: 切断 caspase3、phospho-Chk1、phospho-Chk2 のタンパク発現をウエスタンブロットで評価した。

(5)疑似マイクロ RNA トランスフェクション: リポフェクタミンを使用して、疑似マイクロ RNA、*hsa-miR-221* and *hsa-miR-222* の細胞導入を行った。

(6)細胞免疫染色: histone H2AX の細胞免疫染色を行った。

(7)細胞増殖: WST-1 アッセイ、軟寒天中増殖実験、液体コロニー増殖実験を行った。

(8)BrdU DNA 合成アッセイ: BrdU キットにより DNA 合成を評価した。

(9)細胞周期: propidium iodide 染色後、FACS マシンを用いて細胞周期を解析した。

(10)薬剤感受性: 細胞を異なる濃度の抗癌剤 (シスプラチン) に暴露後、WST-1 アッセイにて細胞増殖を定量し疑似マイクロ RNA 導入が薬剤感受性に及ぼす効果を評価した。

4. 研究成果

(1)肺癌細胞における miR-221 と miR-222 の発現パターンは類似していた。

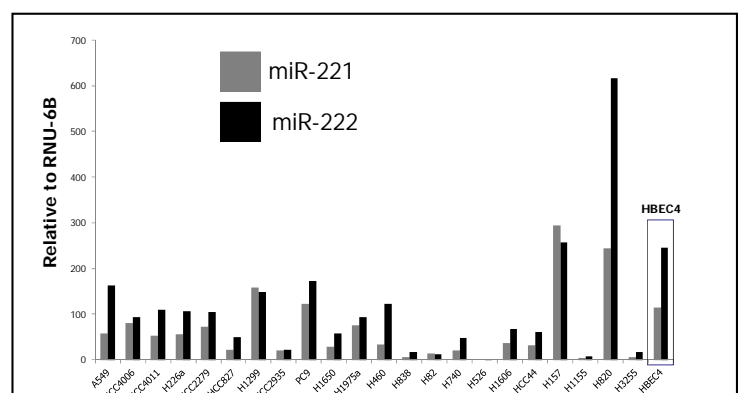


図1: 肺癌細胞、正常肺細胞におけるmiR-221、miR-222の発現

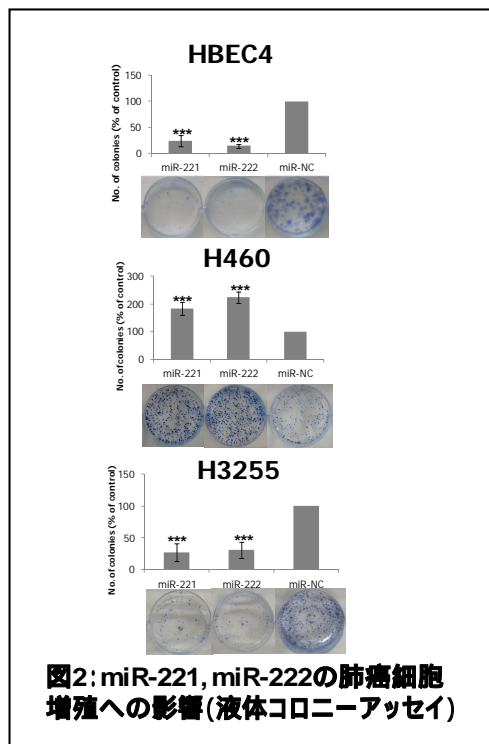
20 の肺癌細胞株と HBEC4 細胞における miR-221 と miR-222 の発現量を定量的なリアルタイム PCR にて定量した。miR-221 と miR-222 の発現パターンは類似性を示した (図 1)。これは miR-221 と miR-222 が共通のプロモータによる発現制御を受けているためと推察した。殆どの肺癌細胞は HBEC4 と同レベルの miR-221 と miR-222 を発現した。

(2) 正常気管支上皮細胞への miR-221 と miR-222 の導入は上皮間葉細胞転換 (EMT) 様の変化を起こすが、EMT 関連の悪性形質増強は示さなかった。

HBEC4 細胞に miR-221 と miR-222 を導入すると、EMT 様の細胞形態変化と EMT 関連遺伝子の発現変化をきたした。しかし、EMT 関連の悪性形質である、浸潤能と足場非依存性増殖の増強は示さなかった。

(3) miR-221 と miR-222 の導入が肺癌細胞に与える影響は細胞毎に大きく異なった。

先行論文 (Garofalo ら Cancer Cell, 2009) は miR-221 と miR-222 が肺癌細胞株 H460 の浸潤能増強することを示している。同論文と矛



盾のない結果として、我々は miR-221 と miR-222 が H460 の増殖を増強することを認

めた (図 2)。

その他 5 つの肺癌細胞においては、miR-221 と miR-222 の影響は大きく異なった。miR-221 は 4 つの細胞 (H3255, HCC4006, HCC4011, H1299) の増殖を抑制し、H838 には影響を与えなかった。

miR-222 は 3 つの細胞 (H3255, HCC4006, HCC4011) の増殖を抑制し、2 つの細胞 (H838, H1299) の増殖を促進した。

(4) 網羅的な遺伝子発現解析は miR-221 が遺伝子発現パターンに与える影響が miR-221 により増殖が促進される細胞と抑制される細胞間で異なる事を示した。

上記の結果は miR-221 と miR-222 の影響が肺癌細胞間で大きく異なる事を示した。この現象の分子的機序解明のために、miR-221 と miR-222 導入による細胞増殖の影響が同一 (抑制) であった H3255 と miR-221 と miR-222 で異なった H1299 を対象として網羅的な遺伝子発現解析を行った。2 倍以上に発現が増強もしくは抑制された遺伝子群によるパスウェイ解析を行ったところ、H3255 では miR-221 と miR-222 導入で影響を受けるパスウェイの多くが重複したが、一方、H1299 では重複が殆どなかった。この結果は miR-221 と miR-222 導入が網羅的遺伝子発現に与える影響の違いが、増殖抑制もしくは抑制という結果に影響を与えている事を示唆した。

(5) miR-221 と miR-222 による肺癌細胞の増殖抑制は細胞周期 S 期停止もしくはアポトーシスを介する

miR-221 と miR-222 による細胞増殖抑制のメカニズムを解析するために細胞周期解析とアポトーシスアッセイを行った。miR-221 と miR-222 は H460, H3255, HCC4006 においてアポトーシスを誘導した。

また、細胞周期解析は、miR-221 と miR-222 は H460, H3255, HCC4011, H838, H1299 細胞の S 期細胞の増加を起こした。この S 期細胞

増加が S 期停止によるものか、もしくは DNA 取り込み増加を反映するものかを判別するために BrdU アッセイを行った。結果は、S 期が増加し、同時に、細胞増殖が抑制されている細胞の殆どにおいて BrdU 取り込み低下を認めた。これは miR-221 と miR-222 による S 期細胞増加は S 期停止によるものであることを示す。以上の結果は、miR-221 と miR-222 が S 期停止もしくはアポトーシスによって肺癌細胞の増殖を抑制することを示唆する。

(6) miR-221 と miR-222 による S 期停止は二本鎖 DNA 切断により惹起される。

先行研究は、miR-221 と miR-222 が G1/S チェックポイントを障害し、S 期細胞の増加を来すと報告している。この論文をヒントに、我々は、miR-221 と miR-222 による G1/S チェックポイント障害が DNA ダメージ修復能を超える二本鎖 DNA 切断を起こし、結果として S 期停止、状況によっては引き続いて起こるアポトーシスを惹起するという仮説を立てた。この仮説の検証のために、二本鎖 DNA 切断のマーカである γ H2AX の免疫染色を行った。miR-221 と miR-222 は H1299 と H3255 の γ H2AX 陽性細胞を増加されたが、一方で HBEC4 では不変であった。この結果は、miR-221 と miR-222 が二本鎖 DNA 切断を介して S 期停止を惹起することを示唆した。

(7) miR-221 と miR-222 は肺癌細胞 H1299 の S 期標的薬剤シスプラチンへの感受性を改善させた (図 3)

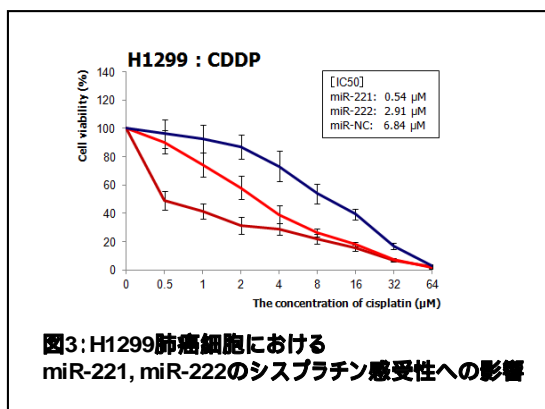


図3: H1299肺癌細胞における miR-221, miR-222のシスプラチン感受性への影響

(8) まとめ

先行論文 (Garofalo ら、Cancer Cell, 2009) は miR-221 と miR-222 が肺癌においては浸潤能の増強作用など癌遺伝子として機能すると報告している。我々のデータは、miR-221 と miR-222 の作用が肺癌細胞毎に大きく異なることを示した。増殖が抑制された肺癌細胞では、miR-221 と miR-222 が細胞増殖をアポトーシスと細胞周期 S 期停止により抑制することを見出した。さらに DNA 二本鎖切断がアポトーシスと細胞周期 S 期停止の一因となっていることを示唆する結果を得た。我々の検索した限りでは、これらのデータは miR-221 と miR-222 の肺癌における腫瘍抑制作用を初めて示すものである。我々の成果はこれらのマイクロ RNA の肺癌の新規治療手段としての可能性を示した点において肺癌の研究領域に大きなインパクトを与えると考える。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Yoshida K, Sato M, Hase T, Elshazley M, Yamashita R, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Nakamura S, Kondo M, Girard L, Minna JD, et al. TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival. *Cancer Sci* 2012. 査読有 doi: 10.1111/cas.12068.

Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, et al. Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *Ann Surg Oncol* 2012;19 Suppl 3:S634-45. 査読有 doi: 10.1245/s10434-011-2142-0.

Elshazley M, Sato M, Hase T, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, et al. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural

mesothelioma. *Int J Cancer* 2012;131:2820-31.
査読有 doi: 10.1002/ijc.27598.

Hase T, Sato M, Yoshida K, Girard L, Takeyama Y, Horio M, Elshazley M, Oguri T, Sekido Y, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD, et al. Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer Sci* 2011;102:1493-500. 査読有 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01973.x.

〔学会発表〕(計4件)

Why, when and how to test for *EGFR*, 佐藤光夫, 第33回フィリピン呼吸器学会、招待講演、フィリピン、マニラ、2014年3月8日

時計遺伝子Bmal1 ノックダウンはアポトーシスと細胞老化を介して肺癌細胞の増殖を抑制する

山下良、佐藤光夫、長谷川好規ら、第54回日本肺癌学会、ホテルニューオータニ、東京都千代田区、2013年11月21日

THE COMBINATION OF FIVE CHANGES (TELOMERASE, P16/RB BYPASS, P53 KNOCKDOWN, KRASV12, C-MYC) TOGETHER WITH SERUM-INDUCED EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION PROGRESSES NORMAL HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS TO FULL MALIGNANCY

Mitsuo Sato, Jill E. Larsen, Woochang Lee, David

Shames, Ignacio I. Wistuba, Adi F. Gazdar³, Jerry W. Shay, John D. Minna, Masashi Kondo, Yoshinori Hasegawa 第5回アジア太平洋肺癌会議、Hilton Fukuoka Sea Hawk ホテル、福岡市、2012年11月28日

Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells.

Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. 第14回世界肺癌学会、オランダ、アムステルダム 2011年7月4日

〔図書〕(計1件)

Micro RNA in Regenerative Medicine, Elsevier, Mitsuo Sato, David S. Shames, Yoshinori Hasegawa, 2014年、*In press*

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤光夫 (Mitsuo Sato)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70467281

(2) 研究分担者

近藤 征史 (Masashi Kondo)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00378077