

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460444

研究課題名(和文) 悪性中皮腫の発生および生物学的特性を規定するエピジェネティクス機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of epigenetic mechanisms regulating the development and biological properties of malignant mesothelioma

研究代表者

辻村 亨 (Tsujiura, Tohru)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20227408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫ではEZH2が高発現しBAP1遺伝子に変異がみられる。RNA干渉法により中皮腫細胞のEZH2発現を抑制させると、細胞増殖能、細胞運動能、造腫瘍能が低下したが、中皮細胞にEZH2を高発現させても造腫瘍能を誘導できなかった。悪性中皮腫患者のEZH2高発現群はEZH2低発現群に比べて予後不良であった。中皮細胞の腫瘍化にはEZH2の高発現だけでは不十分であるが、悪性中皮腫の予後にはEZH2が制御する増殖浸潤関連分子が関与していると考えられる。BAP1変異は上皮型中皮腫の診断に有用な分子マーカーと考えられるが、悪性中皮腫におけるBAP1の生物学的意義については更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In malignant mesothelioma, EZH2 is highly expressed and BAP1 mutation is observed. Suppression of EZH2 expression in mesothelioma cells by RNA interfering method decreased their proliferation, motility, and tumorigenic ability, but could not induce tumorigenesis even when EZH2 was highly expressed in mesothelial cells. The EZH2 high expression group of malignant mesothelioma patients had a poorer prognosis than the EZH2 low expression group. Although high expression of EZH2 alone is insufficient for tumorigenesis of mesothelial cells, the prognosis of malignant mesothelioma patients is thought to be involved in EZH2-controlled growth and invasion related molecules. Although BAP1 mutation is considered to be a useful molecular marker for diagnosing epithelioid mesothelioma, further investigation is required on the biological function of BAP1 in malignant mesothelioma.

研究分野：人体病理学

キーワード：悪性中皮腫 エピジェネティクス 細胞増殖

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト曝露によって引き起こされる難治性腫瘍である。我が国ではアスベスト規制が遅れたために、悪性中皮腫の発症数の増加が予想され、2025年に発症数はピークを迎えると推定されている(N Engl J Med, 353:1591-1603, 2005)。悪性中皮腫はアスベストを取り扱った労働者ばかりでなく環境曝露によっても発症することが明らかになり、悪性中皮腫の早期診断法や有効な治療法の開発が急務になっている。

悪性中皮腫ではCDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>/p14<sup>ARF</sup>) やNF2などの‘がん抑制遺伝子’の欠失が見出されているが、がんで発見されている‘がん遺伝子’の変異や増幅および転座型の遺伝子変異などの機能を獲得するゲノム異常の報告は殆ど無い(Carcinogenesis, 34:1413-1419, 2013)。一方、悪性中皮腫ではポリコム群タンパク質複合体の構成分子であるEZH2(ヒストンH3メチル化酵素)が強く発現する。また、米国のグループから、脱コピキチン化酵素をコードするBAP1遺伝子の変異が生殖細胞に起こると悪性中皮腫に罹患しやすくなることが報告され(Nat Genet, 43:1022-1025, 2011 & Nat Rev Cancer, 13:153-159, 2013)、我々も悪性中皮腫の約60%にBAP1遺伝子に変異が起きていることを明らかにしている(Cancer Sci, 102:648-655, 2011 & Cancer Sci, 103:868-874, 2012)。このような背景から、悪性中皮腫ではエピゲノム異常が腫瘍化や生物学的特性に重要な役割を果たしていると推測される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、EZH2とBAP1に着目して、悪性中皮腫の発生および生物学的特性を規定するエピジェネティクス機構を明らかにし、エピゲノム異常に関わる分子を標的にした治療法の開発に繋げることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) EZH2機能の解析

リアルタイムRT-PCR法およびWestern blot法を用いてEZH2を高発現する培養中皮腫細胞を選別した。このEZH2高発現中皮腫細胞を親細胞としてEZH2 siRNA (piLenti-siEZH2-GFP-2A-Puro)を導入し、EZH2発現が抑制された中皮腫細胞(EZH2発現抑制中皮腫細胞)を作製した。また、不死化中皮細胞を親細胞としてEZH2 cDNA (pLenti-GIII-CMV-EZH2-GFP-2A-Bla)を導入し、EZH2を高発現する中皮細胞(EZH2高発現中皮細胞)を作製した。

EZH2発現抑制中皮腫細胞と親中皮腫細胞、およびEZH2高発現中皮細胞と親中皮細胞の細胞増殖能をcell titer blue法で調べ、それぞれの細胞増殖能を比較検討した。また、EZH2発現抑制中皮腫細胞と親中皮腫細胞、およびEZH2高発現中皮細胞と親中皮細胞の細胞運動能をscratch assay法で調べ、それぞ

れの細胞運動能を比較検討した。

#### (2) 移植モデルによるEZH2機能の解析

EZH2発現抑制中皮腫細胞および親中皮腫細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成の有無および形成される腫瘍のサイズを経時的に計測して造腫瘍能を調べた。同様にして、EZH2高発現中皮細胞および親中皮細胞のヌードマウスにおける造腫瘍能についても調べた。

#### (3) EZH2の臨床病理学的解析

胸膜肺全摘術を施行した悪性中皮腫患者を対象にして、悪性中皮腫におけるEZH2発現を免疫染色で調べ、発現強度によりEZH2高発現群とEZH2低発現群に分類した。Kaplan-Meier法により、EZH2高発現群とEZH2低発現群の全生存曲線を作成し、log rank testにより比較検討した。

#### (4) 悪性中皮腫におけるEZH2標的遺伝子の検索

EZH2発現抑制中皮腫細胞と親中皮腫細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、発現の増強する遺伝子或いは発現の減弱する遺伝子を検索した。EZH2発現抑制中皮腫細胞において発現の減弱がみられた血管新生因子(X)については、siRNAを導入して血管新生因子(X)の発現を抑制する中皮腫細胞を作製し、(1)および(2)と同様のin vitro実験、ヌードマウス移植実験を行った。

#### (5) BAP1の臨床病理学的解析

悪性中皮腫(上皮型、肉腫型、二相型)のBAP1発現を免疫染色で調べ、核における発現の有無に基づいて、各組織型のBAP1変異率を算出した。胸膜肺全摘術を施行した上皮型中皮腫患者を対象にして、BAP1発現を免疫染色で調べ、BAP1発現(+)野生型BAP1中皮腫群とBAP1発現(-)変異型BAP1中皮腫群に分類した。Kaplan-Meier法により、野生型BAP1中皮腫群と変異型BAP1中皮腫群の全生存曲線を作成し、log rank testにより比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) EZH2機能の解析

リアルタイムRT-PCRおよびWestern blotの結果から、EZH2を高発現する培養中皮腫細胞としてMST0-211Hを選択した。MST0-211HにEZH2 siRNAを導入すると、EZH2発現が抑制された2つの中皮腫細胞クローン (siEZH2-7-1, siEZH2-7-4) が得られた。また、不死化中皮細胞(HOMC-A4)にEZH2 cDNAを導入すると、EZH2を高発現する3つの中皮細胞クローン(E4, E5, E10)が得られた。

EZH2発現抑制中皮腫細胞クローン (siEZH2-7-1, siEZH2-7-4) と親中皮腫細胞(MST0-211H)の細胞増殖能をcell titer blue法で調べると、EZH2発現抑制中皮腫細胞クローンでは細胞増殖能が親中皮腫細胞よりも

低下していた。EZH2 発現抑制中皮腫細胞クローン (siEZH2-7-1, siEZH2-7-4) と親中皮腫細胞 (MST0-211H) の細胞運動能を scratch assay 法で調べると、EZH2 発現抑制中皮腫細胞クローンでは細胞運動能が親中皮腫細胞よりも低下していた。

EZH2 高発現中皮細胞クローン (E4, E5, E10) と親中皮細胞 (HOMC-A4) の細胞増殖能を cell titer blue 法で調べると、EZH2 高発現中皮細胞クローンでは細胞増殖能が親中皮細胞よりも高かった。EZH2 高発現中皮細胞クローン (E4, E5, E10) と親中皮細胞 (HOMC-A4) の細胞運動能を scratch assay 法で調べると、EZH2 高発現中皮細胞クローンでは細胞運動能が親中皮細胞よりも高かった。

(2) 移植モデルによる EZH2 機能の解析  
EZH2 発現抑制中皮腫細胞クローン (siEZH2-7-1, siEZH2-7-4) と親中皮腫細胞 (MST0-211H) をヌードマウスの皮下に移植すると、EZH2 発現抑制中皮腫細胞クローンでは造腫瘍能が親中皮腫細胞よりも低下していた。

一方、EZH2 高発現中皮細胞クローン (E4, E5, E10) をヌードマウスに移植しても腫瘍を全く形成しなかった。

(3) EZH2 の臨床病理学的解析  
胸膜肺全摘術を施行した悪性中皮腫患者を対象にして、EZH2 発現と術後予後との関連を調べた。EZH2 高発現群の全生存期間は、EZH2 低発現群に比べて有意に短く、特に腫瘍辺縁部に EZH2 を高発現する症例の予後は極めて不良であった。

(4) 悪性中皮腫における EZH2 標的遺伝子の検索

EZH2 高発現の親中皮腫細胞と EZH2 発現抑制中皮腫細胞クローンの遺伝子発現プロファイルを比較すると、親中皮腫細胞において発現が高い或いは発現が低い遺伝子が見出され、この中には血管新生因子 (X) をコードする遺伝子やがん抑制遺伝子 (Y) が含まれていた。血管新生因子 (X) の発現を抑制した MST0-211H をヌードマウスの皮下に移植すると、造腫瘍能は親中皮腫細胞 (MST0-211H) よりも低かった。また、EZH2 高発現の親中皮腫細胞において発現の低いがん抑制遺伝子 (Y) については、発現の強度と細胞増殖能に負の相関を認めた。

(5) BAP1 の臨床病理学的解析  
悪性中皮腫と診断された 46 例について免疫染色で BAP1 の発現を調べると、上皮型 (35 例) では 63% (22 例) で明らかな BAP1 発現消失が認められたのに対して、肉腫型 (7 例) では BAP1 発現消失は認められなかった。二相型 (4 例) では 1 例で明らかな BAP1 発現消失を認めたが、染色性が多様で判定が困難な症例が存在した。

胸膜肺全摘術を施行された上皮型中皮腫患者を対象として BAP1 発現と術後予後との関連を調べると、BAP1 発現 (+) 野生型 BAP1 中皮腫群と BAP1 発現 (-) 変異型 BAP1 中皮腫群の予後に有意な差を認めなかった。

(6) 総括  
中皮細胞に EZH2 を高発現させてもヌードマウスにおいて造腫瘍能を示さなかったことより、中皮細胞の腫瘍化には EZH2 の高発現だけでは不十分と考えられる。一方、悪性中皮腫の予後には EZH2 が制御する浸潤関連分子や血管新生因子などが深く関与している可能性がある。

BAP1 変異は上皮型中皮腫の診断に極めて有用な分子マーカーと考えられるが、悪性中皮腫における BAP1 の生物学的意義については更なる検討が必要である。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Nasu M, Pastorino S, Szymiczek A, Bononi A, Tanji M, Pagano I, Gaudino G, Napolitano A, Goparaju C, Pass HI, Yang H, Carbone M. High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、113: 13432-13437. 2016.

DOI: 10.1073/pnas.1612074113

Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, Sato A, Tsujimura T, Kawahara K, Iwasaki A, Okamoto T, Oda Y, Honda H, Nabeshima K. BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH results in combination provide higher confidence in malignant pleural mesothelioma diagnosis: ROC analysis of the two tests. Pathol Int. 査読有、66:563-570, 2016.

DOI: 10.1111/pin.12453.

Wu D, Hiroshima K, Yusa T, Ozaki D, Koh E, Sekine Y, Matsumoto S, Nabeshima K, Sato A, Tsujimura T, Yamakawa H, Tada Y, Shimada H, Tagawa M. Usefulness of p16/CDKN2A fluorescence in situ hybridization and BAP1 immunohistochemistry for the diagnosis of biphasic mesothelioma. Annals of Diagnostic Pathology. 査読有、26:31-37, 2016.

DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2016.10.010.

Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A,

Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene*. 査読有、34:73-83, 2015.  
DOI:10.1038/onc.2013.528.

Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Otsuki T, Fukuoka K, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. Biallelic germline and somatic mutations in malignant mesothelioma: multiple mutations in transcription regulators including mSWI/SNF genes. *Int J Cancer*. 査読有、136:560-571, 2015.  
DOI: 10.1002/ijc.29015.

Emi M, Yoshikawa Y, Sato C, Sato A, Sato H, Kato T, Tsujimura T, Hasegawa S, Nakano T, Hashimoto-Tamaoki T. Frequent genomic rearrangements of BRCA1 associated protein-1 (BAP1) gene in Japanese malignant mesothelioma-characterization of deletions at exon level. *J Hum Genet*. 査読有、60:647-649, 2015.  
DOI: 10.1038/jhg.2015.91.

〔学会発表〕(計3件)

Tsujimura T, Sato A, Shinohara Y, Sumida A, Hasegawa S, Nakano T. Clinical, cytological, and molecular biological approaches to the diagnosis of early mesothelioma. (Symposium) The 19th international Congress of Cytology 2016.5.30, Yokohama (Japan)

辻村亨、佐藤鮎子、篠原義康、工藤朝雄、今橋祐喜、清水重喜、鍋島一樹、長谷川誠紀、中野孝司、増加する悪性中皮腫診断のスキルアップを目指して 中皮細胞の機能と形態から診断のカギを探る 中皮腫診断の現状と将来(シンポジウム)第56回日本臨床細胞学会総会(春期大会)2015.6.13、くにびきメッセ・松江テルサ(島根県・松江市)

辻村亨、鳥井郁子、佐藤鮎子、篠原義康、工藤朝雄、清水重喜、体腔液における鑑別診断 その最前線 胸水を用いた悪性中皮腫の鑑別診断(シンポジウム)第55回日本臨床細胞学会総会(春期大会)2014.6.7、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計1件)

清水重喜、鳥井郁子、佐藤鮎子、辻村亨、篠原出版新社、石綿関連疾患の病理とそのリスクコミュニケーション、中皮腫の遺伝子異常、2015、91-102

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻村 亨(Tsujimura, Tohru)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号:70207661

(2)研究分担者

佐藤 鮎子(Sato, Ayuko)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号:20419823

篠原 義康(Shinohara, Yoshiyasu)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号:60723509