

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670416

研究課題名(和文) クラスター形成関連分子を標的としたEGFR変異肺癌の転移抑制治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic strategy targeting genes contributing to forming cluster in EGFR mutated lung cancer

研究代表者

佐藤 光夫 (Sato, Mitsuo)

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、仮説「EGFR 遺伝子変異肺癌は、接着分子発現による上皮性性質保持によってクラスター形成し、アノキスを回避して転移する」の検証を目的とする。クラスター形成に寄与する遺伝子同定のためプールshRNAライブラリーによる網羅的解析を行った。ライブラリーを不死化気管支上皮細胞に導入後、二次元培養(コントロール)または、三次元培養し両条件間での個々の遺伝子のshRNA量を次世代シーケンサーで定量した。クラスター形成に寄与する遺伝子候補を特定した。これらの候補遺伝子のクラスター形成への関与を確認するため、合成オリゴによる個別ノックダウンを行い、クラスター形成に関与する数個の遺伝子を特定した。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to test the hypothesis that EGFR mutated lung cancer cells complete a metastatic process by maintaining epithelial characteristics through expressing adhesion molecules. To identify genes contributing to forming clustering, we performed a screen with pooled shRNA library. The library was lentivirally transduced in immortalized normal bronchial epithelial cell lines (HBEC) and then the HBEC were grown in 2D or 3D culture condition. Comparing amount of shRNA between the two conditions by next generation sequencing, we identified potential genes contributing to forming cluster. To confirm this result, we also did individual knockdown of the identified genes. Through these experiments, we were able to identify genes that could serve as therapeutic target in EGFR mutated lung cancer.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：EGFR遺伝子変異 RNA干渉 プールshRNA

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、EGFR 変異肺癌が臨床的には高頻度に全身性の多発転移を発症するにもかかわらず、実験系では転移能の生物学的指標である軟寒天中での増殖(アノキス抵抗性)を示さないことに着目した。正常細胞は細胞外マトリクスへの接着を失うとアポトーシス死する。このタイプのアポトーシスは特にアノキスと呼ばれる。アノキス抵抗性は代表的な癌細胞の悪性形質であり、実験系では軟寒天中増殖などで評価する。研究代表者の準備データではEGFR 変異細胞株 10 種すべてが軟寒天中では増殖せず、一方で別のアノキス抵抗性アッセイ法である超非接着フラスコ培養ではEGFR 非変異細胞に比べ逆に増殖能が高い。これはEGFR 変異細胞が単細胞の状態から培養を開始する軟寒天中ではアノキス抵抗性を示さず、細胞同士が接着しクラスター形成可能な超非接着フラスコ培養状態ではアノキス抵抗性となることを示す。また、研究代表者はEGFR 変異肺癌が接着分子Eカドヘリン発現など上皮細胞の性質をより保持し、細胞同士の接着能が高いことを発見した(Takeyama, Sato et al. *Cancer Lett.* 2010)。

### 2. 研究の目的

上記背景より、研究代表者は、「EGFR 遺伝子変異肺癌は、接着分子発現による上皮性性質保持によってクラスター形成し、アノキスを回避して転移する」という仮説を着想し、クラスター形成関与分子を標的とするアノキス誘導による転移抑制治療開発を目的とする本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

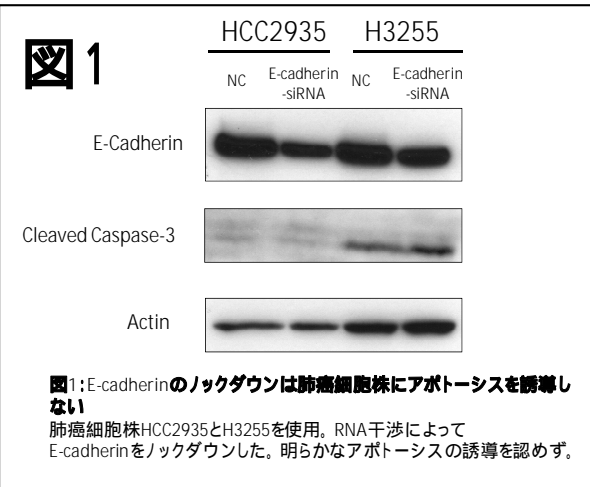
接着分子としてその重要性が確立され、研究代表者の過去の報告においてもEGFR 遺伝子変異肺癌において発現が強いE-cadherinのRNA 干渉によるノックダウンを行った。H358細胞を用いて、合成オリゴおよびshRNA 発現レンチウイルスベクターによる遺伝子ノックダウンを行った。

また、クラスター形成(spheroid)に寄与する遺伝子同定のための網羅的解析を行った。プールshRNAライブラリーを不死化気管支上皮細胞(HBEC)に導入した。導入後、細胞を二次元(フラスコの接着培養)培養(コントロール)または、三次元培養(超非接着培養フラスコ)し、これらの2つの条件間での、個々の遺伝子に対するshRNA数を次世代シーケンサーにて定量した。

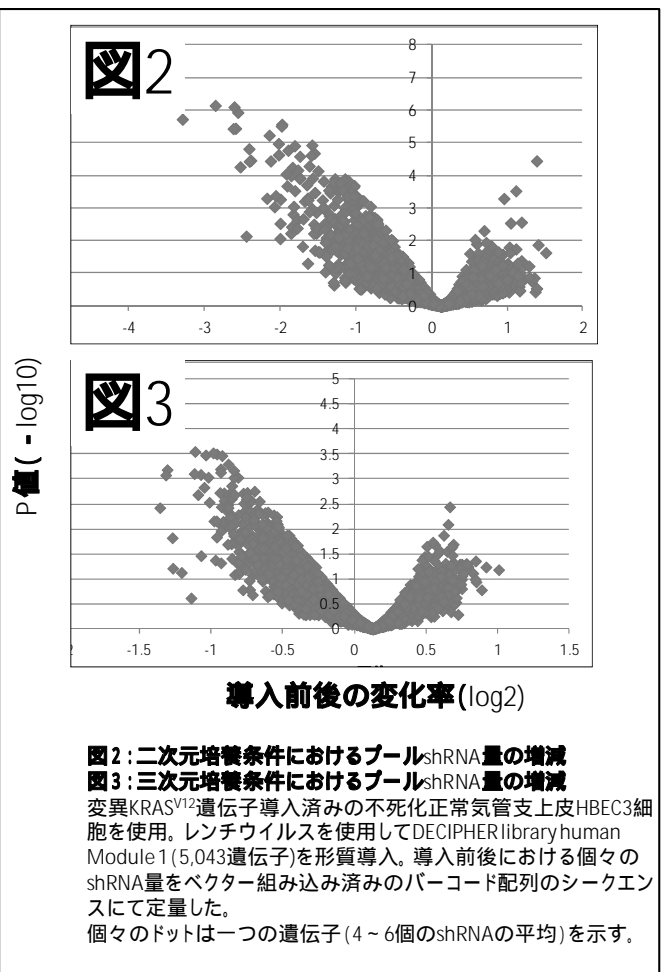
### 4. 研究成果

接着分子E-cadherinのRNA干渉によるノックダウンを行ったが、アポトーシス誘導をみと

めなかった(図1)。



そこで、クラスター形成(spheroid)に寄与する遺伝子同定のための網羅的解析を行った。プールshRNAライブラリーを変異KRAS<sup>V12</sup>が導入されたHBECに形質導入した。導入後、細胞を二次元(フラスコの接着培養)培養(コントロール)または、三次元培養(超非接着培養フラスコ)し、これらの2つの条件間での、個々の遺伝子に対するshRNA数を次世代シーケンスにて定量した。次世代シーケンスはコスモバイオ社に外部委託した。二次元培



養と三次元培養の結果を比較(図2、図3)した。特に三次元において増殖に影響を与える遺伝子をクラスター形成に關与する候補遺伝子とした。次に、これらの遺伝子のクラスター形成(spheroid)への關与を確認するために、合成オリゴによる個別ノックダウン実験を行った。遺伝子のノックダウンが細胞増殖に与える影響が、2次元培養条件では無く、3次元にて影響を与える遺伝子をクラスター形成(spheroid)に關与する候補遺伝子として特定した(図4、図5)。

図4

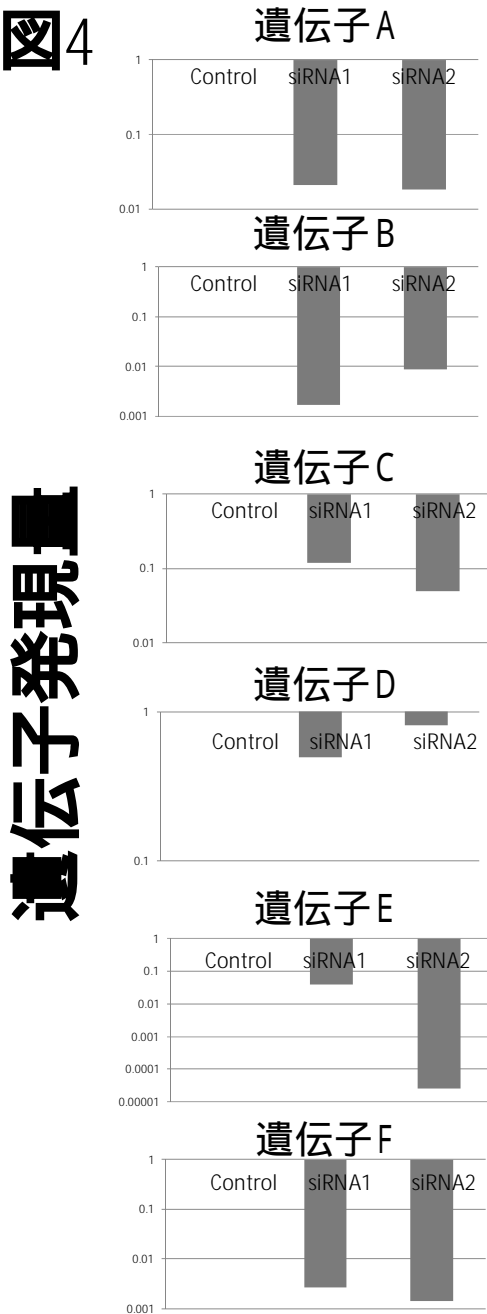


図4:クラスター形成に關与が予測される候補遺伝子の合成RNA干渉オリゴを用いた個別ノックダウン  
KRAS導入HBECC細胞を使用。合成RNA干渉オリゴを用いて候補遺伝子ノックダウンを行った。ノックダウン効率をリアルタイムPCRにて評価した。結果の一部を示す。いずれの遺伝子においても、有効なノックダウンを確認した。

図5

細胞生存率

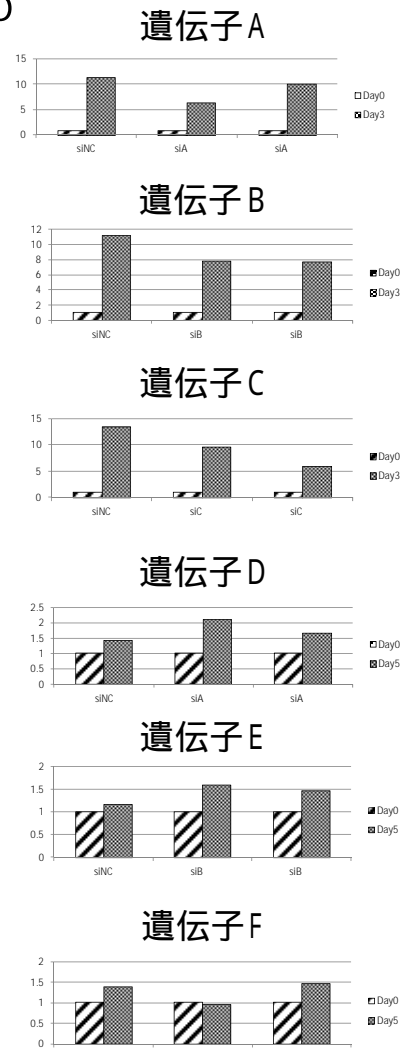


図5:2次元または3次元培養条件におけるクラスター形成に關与する候補遺伝子のノックダウンが細胞増殖に与える影響

KRAS導入HBECC細胞を使用。合成RNA干渉オリゴを用いて候補遺伝子のノックダウンを行った。ノックダウンは2次元(左棒グラフ)および3次元(右棒グラフ)培養条件において遺伝子毎に細胞増殖に異なる影響を与えた。細胞増殖に与える影響が2次元培養条件では無く、かつ、3次元培養条件ではある遺伝子をクラスター形成(spheroid)に關与する遺伝子として特定した。結果の一部を示す。

## 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)

1 .Cancer Med. 2015 Apr;4(4):551-64. doi: 10.1002/cam4.412. Epub 2015 Jan 30.

Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222 in non-small cell lung cancer cells.

Yamashita R<sup>1</sup>, Sato M, Kakumu T, Hase T, Yogo N, Maruyama E, Sekido Y, Kondo M, Hasegawa Y. 査読有

2 . PLoS One. 2015 Aug 5;10(8):e0134842.  
doi: 10.1371/journal.pone.0134842.  
eCollection 2015.

Nuclear Receptor Expression and Function  
in Human Lung Cancer Pathogenesis.

Kim J, Sato M, Choi JW, Kim HW, Yeh  
BI, Larsen JE, Minna JD, Cha JH, Jeong Y.  
査読有

3 . Respir Res. 2014 Nov 21;15:150. doi:  
10.1186/s12931-014-0150-x.

Protective effects of intratracheally  
administered quercetin on  
lipopolysaccharide-induced acute lung  
injury.

Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K,  
Nose H, Sato M, Hashimoto N, Hasegawa Y,  
Kawabe T. 査読有

4 .Respir Investig. 2014 May;52(3):153-9.  
doi: 10.1016/j.resinv.2013.09.003. Epub  
2013 Nov 9.

Prospective analysis of efficacy and  
safety of an  
individualized-midazolam-dosing protocol  
for sedation during prolonged  
bronchoscopy.

Ogawa T, Imaizumi K, Hashimoto I, Shindo  
Y, Imai N, Uozu S, Shimokata T, Ito S,  
Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y.  
査読有

5 . Biochem Biophys Res Commun. 2014 Oct  
10;453(1):101-5. 査読有  
doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.063. Epub  
2014 Sep 23.

Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release mediated by  
mechanical stretch in human lung  
fibroblasts.

Murata N, Ito S, Furuya K, Takahara N,  
Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M,  
Hasegawa Y. 査読有

6 . J Respir Cell Mol Biol. 2014  
Dec;51(6):772-82.  
doi: 10.1165/rcmb.2014-00080C.

Real-time imaging of ATP release induced  
by mechanical stretch in human airway  
smooth muscle cells.

Takahara N, Ito S, Furuya K, Naruse K, Aso  
H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

1 . 第 74 回日本癌学会学術総会 ポスター  
発表

肺がん治療標的としての CDK11 の可能性  
各務智彦、佐藤光夫、加藤俊夫、與語直之、  
長谷哲成、森瀬昌宏、近藤征史、関戸好孝、  
長谷川好規

平成27年10月9日(愛知県、名古屋市、国際会  
議場)

2 .26<sup>th</sup> EORTC-NCI-AACR Symposium ポスタ  
ー発表 Tumor suppressive roles of miR-221 and

miR-222 in lung cancer SatoM, Yamashita R,  
Kakumu T, Yogo N, Hase T, Maruyama E,  
Sekido Y, Kondo M, and Hasegawa Y, 平成 26  
年 11 月 19 日(バルセロナ, スペイン,  
CCIB-Centre)

〔図書〕(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・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 (KONDO, Masashi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教  
授  
研究者番号 : 00378077

研究分担者

長谷 哲成 (HASE, Tetsunari)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助助  
研究者番号 : 30621635

(3) 連携研究者

湯川 博 (YUKAWA, Hiroshi)  
名古屋大学大学院工学系研究科・特任講師  
研究者番号 : 30634646

(4) 研究協力者

與語 直之 (YOGO, Naoyuki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科博士過  
程 3 年生