

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893050

研究課題名(和文) CAGE法を活用した非小細胞肺癌の新規バイオマーカーの探求

研究課題名(英文) CAGE identified Myeloma Overexpressed as a novel biomarker for non-small cell lung cancer

研究代表者

堀江 真史(Horie, Masafumi)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：60732659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：FANTOM5プロジェクトにより公開された17種のNSCLC細胞株と16種の正常肺上皮肺胞のCAGEデータを比較し、NSCLCに極めて特異的に発現するMYEOVを同定した。siRNAによるノックダウンにより、MYEOVがNSCLCの増殖・上皮間葉転換・浸潤に寄与していることが明らかとなった。またMYEOVの発現はDNAメチル化に大きく依存していた。予後解析ではMYEOV高発現群では有意に予後不良であった。MYEOVは治療ターゲットや予後予測のバイオマーカーとして極めて有望であり、今後の臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：By comparing the CAGE profiles of 17 NSCLC cell lines and 16 normal lung epithelial cells obtained from FANTOM5 database revealed that MYEOV showed particularly high gene expression levels, which was confirmed in several independent NSCLC datasets. Functional studies indicated that MYEOV promotes cell proliferation, survival and invasion. Higher MYEOV gene methylation was associated with lower expression in NSCLC, and MYEOV was epigenetically silenced in the normal lung. Survival analysis revealed that MYEOV expression was associated with poor prognosis in NSCLC patients. Our findings pave the way for the potential application of MYEOV as a therapeutic target or diagnostic marker.

研究分野：呼吸器

キーワード：CAGE FANTOM5 MYEOV 非小細胞肺癌 DNAメチル化 microarray バイオインフォマティクス トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌による死亡の部位別で最多であり、全世界で年間約 137 万人が死亡している。早期の非小細胞肺癌 (NSCLC: non small cell lung carcinoma) は外科切除による完治が望めるが、多くは切除不能の状態で見られ抗癌剤で治療を行うものの効果は乏しく予後不良である。近年では EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子などの発見により、劇的な効果を示す分子標的治療が主流となってきた。このような遺伝子診断と分子標的治療の進歩とともに、治療薬の効果予測、副作用予測および予後予測を可能にするゲノムバイオマーカーが近年注目されている。

近年の次世代シーケンサーを中心としたゲノミクス技術の大幅な進歩はがん研究の在り方を大きく変えつつある。CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法は理化学研究所により開発された技術で、CAP 修飾された mRNA 分子の 5' 末端配列を切り出し塩基配列を決定する技術である。CAGE 法では転写開始点解析、遺伝子発現プロファイリング、遺伝子構造解析、プロモーター部位予測、転写因子結合モチーフ解析、エンハンサー解析などが可能であり、今後の応用が期待されている。

FANTOM5 (Functional Annotation Of the Mammalian cDNA) プロジェクトでは、CAGE 法を用いて約 1,000 種類の正常細胞や正常組織を解析し、正常細胞に関する体系的な定義をした。本研究立案者は FANTOM5 プロジェクトで公開された豊富な正常細胞・正常組織の CAGE データに注目した。**CAGE 法は遺伝子発現解析の新たな手法であるがこれまで肺癌を含めた癌のバイオマーカーの探索に用いられたことはなく、未知のバイオマーカーの発見できる可能性を考え今回の研究の着想に至った。**

2. 研究の目的

本研究では FANTOM5 により公開された豊富な正常細胞や組織の CAGE データを用いて、肺癌細胞株と正常細胞・組織における遺伝子の発現解析を行い、新たな肺癌のバイオマーカーとなりうる遺伝子を同定することを目的とする。また同定された遺伝子の機能解析、予後解析を行い肺癌の診断・治療への応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) NSCLC に特異的に発現する遺伝子の同定

17 種類の NSCLC 細胞株と 16 種類以上の気道・肺由来の初代培養細胞の CAGE データを入手し、Bioconductor の edgeR のアルゴリズムを用いて発現比較を行った。Validation として既存の正常肺と肺癌組織の cDNA マイクロアレイデータを GEO から入手し検討した。さらに肺癌細胞株と正常肺上皮細胞を用いて qPCR で MYEOV の発現を評価した。

(2) 候補遺伝子の機能解析

(1) により候補に挙げた遺伝子について、siRNA によるノックダウンの実験系の構築、増殖能の評価、上皮間葉転換への影響の評価、浸潤能の評価、microarray による網羅的解析、を行い loss of function により遺伝子の機能解析を行った。

(3) 候補遺伝子の発現制御メカニズム解明

肺癌細胞・組織の遺伝子発現データと紐づけできる KRAS・EGFR、ALK・RET・ROS1 などの遺伝子変異、遺伝子コピー数、DNA メチル化などの有する公共データを入手し、同定された遺伝子の発現量とこれらのパラメータとの相関を解析した。

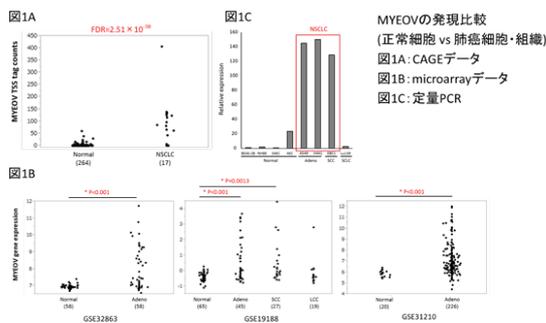
(4) 予後評価

予後データの存在する cDNA microarray データを GEO から入手し、予後解析とその解析を行う。Uppsala 大学の 345 例の肺癌組織アレイを用いてタンパクレベルでの発現の予後解析を行う。

4. 研究成果

(1) MYEOV の同定

17 種類の NSCLC と 16 種類の正常肺上皮細胞の比較により、NSCLC に極めて特異的に発現する MYEOV (MYE|oma OVerexpressed) 遺伝子が同定された (図 1A, $FDR = 2.51 \times 10^{-38}$)。MYEOV は 11 番染色体長腕 (11q13) に存在し、2000 年に胃癌の DNA から NIH/3T3 tumorigenicity assay を用いて同定された遺伝子であり、B 細胞系悪性腫瘍などを始めとして様々な悪性腫瘍で遺伝子再構成が確認されている。MYEOV は胃癌や大腸癌では癌細胞の増殖や浸潤への関与が示唆されているが、肺癌に関しての解析はこれまで報告はなく新規性があると考えられる。Validation として公開されている 3 つの cDNA microarray データ (GSE32863, GSE19188, GSE31210) を用いて肺癌組織と正常組織の MYEOV の発現比較を行ったが、いずれも有意に肺癌組織での高発現を認めた (図 1B)。また定量 PCR にて NSCLC 細胞株と肺上皮細胞の発現を確認したところ 肺癌細胞株 (H441, A549, EBC-1) で明らかに MYEOV の高発現を認めた (図 1C)。



(2) MYEOV の機能解析

siRNA の実験系の構築

Invitrogen 社の Stealth RNAi で MYEOV-high 細胞 (A549, H441) でノックダウンを行い、qPCR で良好なノックダウンの確認をした。

細胞増殖能

MYEOV をノックダウンした A549、および H441 の細胞増殖能をセルカウントで評価したところ、MYEOV ノックダウン群で増殖能の著し

い低下を認めた (図 2 左)。

上皮間葉転換への影響

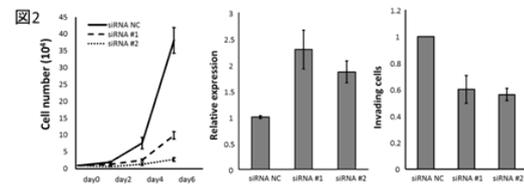
A549 で MYEOV をノックダウンしたところ、上皮系マーカーである E-cadherin の発現上昇を認め、MYEOV が EMT の制御をしている可能性が示唆された (図 2 中)。

細胞浸潤能

A549 で MYEOV をノックダウンし matrigel invasion assay により浸潤能の評価を行ったところ、MYEOV ノックダウン群で浸潤細胞の減少を認めた (図 2 右)。

トランスクリプトーム解析

MYEOV をノックダウンした A549 を用いて cDNA microarray による網羅的解析を行った。MYEOV により制御される遺伝子群の抽出を行い、MYEOV の下流に存在すると思われる遺伝子を同定することができた。



(3) MYEOV の発現制御メカニズムの解明

KRAS/EGFR 遺伝子変異との相関

CCLC (Cancer Cell Encyclopedia) や E-MTAB-2706 の遺伝子変異 (EGFR・KRAS) と MYEOV の発現量を対応させたところ、KRAS 変異群で有意に MYEOV の高発現を認めた。

遺伝子コピー数との相関

CCLC では一部の細胞株で MYEOV のコピー数増加を認めたが、MYEOV 遺伝子の発現量との相関は認められなかった。

メチル化との相関

GSE36216 (イルミナの 450K メチル化アレイ) と E-MTAB-2706 (RNA-seq) とを対応させた。

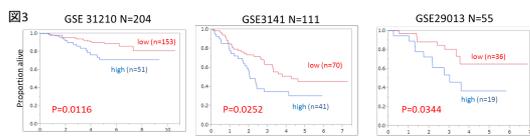
MYEOV のプロモータ領域のメチル化と遺伝子発現は極めて強い負の逆相関を認めた

(Spearman's $\rho = -0.81, P < 0.001$)。さらに DBTSS に公開されている 26 個の NSCLC の BS-seq・RNA-seq より一部の細胞株で

TSS-1500bp から gene body にわたって広い範囲で脱メチル化が起きていた。

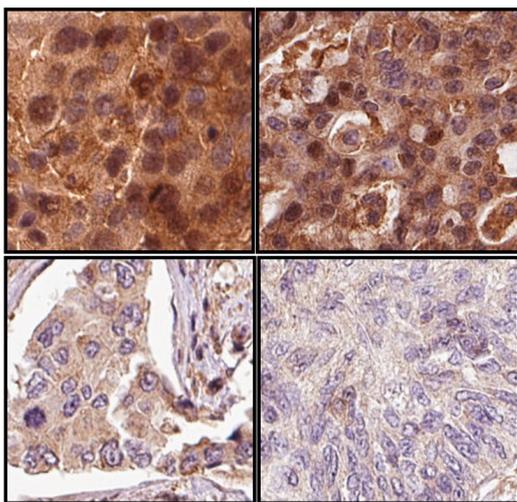
(4) 予後解析

a) 公開されている予後データの得られる 3 つの cDNA microarray データ (GSE31210, GSE3141, GSE29013) を入手し、MYEOV 高発現・低発現の 2 群に分けて Kaplan-Meier による予後解析を行ったところ、**何れも MYEOV 高発現群にて有意に予後不良であった (図 3)。**



b) Uppsala 大学との共同にて NSCLC 患者の手術検体を用いて MYEOV の免疫染色を行った。**NSCLC で高発現群 (図 4 上) と低発現群 (図 4 下) に分かれた。**この結果をもとに今後組織アレイによる予後解析を行う予定である。

図 4



以上より、FANTOM5 のデータベースを活用することにより、NSCLC の新たなバイオマーカー候補である MYEOV を同定することができた。**MYEOV は治療ターゲットとしても予後予測のバイオマーカーとしても有望であり、今後の臨床への応用が期待される。**

上記結果について、現在英文誌へ投稿中である。

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 15 件)

1. Djureinovic D, Hallström B, Horie M, Johanna Mattsson J, Fleur L, Fagerberg L, Brunnström H, Lindskog C, Madjar K, Rahnenführer J, Ekman S, Ståhle E, Koyi H, Brandén E, Edlund K, Hengstler J, Lambe M, Saito A, Botling J, Pontén F, Uhlén M, Micke P. Profiling cancer-testis antigens in non-small cell lung cancer. *JCI insight*. Inpress. 査読あり
2. Nelson Kibinge N, Ono N, Horie M, Sato T, Sugiura T, Md. Altaf-Ul-Amin, Saito A, Kanaya S. Integrated pathway-based transcription regulation network mining and visualization based on gene expression profiles. *J Biomed Inform*. 2016 Apr 7. 査読あり
3. Ohshima M, Yamaguchi Y, Ambe K, Horie M, Saito A, Nagase T, Nakashima T, Ohki T, Kawai T, Abiko Y, Micke P, Kappert K. Fibroblast VEGF-Receptor 1 Expression as Molecular Target in Periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2016 Feb;43(2):128-37. 査読あり
4. Horie M, Tamiya H, Goto Y, Suzuki M, Matsuzaki H, Hasegawa WT, Noguchi S, Kawakami M, Matsuta K, Nagase T, Sakamoto Y. Nonspecific elevation of serum Aspergillus galactomannan antigen levels in patients with rheumatoid arthritis. *Respir Investig*. 2016 Jan;54(1):44-9. 査読あり
5. Matsuzaki H, Mikami Y, Makita K, Takeshima H, Horie M, Noguchi S, Jo T, Narumoto O, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T, Yamauchi Y. Interleukin-17A and

Toll-Like Receptor 3 Ligand Poly(I:C) Synergistically Induced Neutrophil Chemoattractant Production by Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One*. 2015 Oct 27;10(10):e0141746. 査読あり

6. **Horie M**, Saito A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Nagase T. Three-dimensional Co-culture Model for tumor-stromal Interaction. *J Vis Exp*. 2015 Feb 2;96: e52469. 査読あり

7. Mikami Y, Matsuzaki H, **Horie M**, Noguchi S, Jo T, Narumoto O, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T, Yamauchi Y. Lymphotoxin Receptor Signaling Induces IL-8 Production in Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One*. 2014 Dec 11;9(12) 査読あり

8. **Horie M**, Saito A, Noguchi S, Yamaguchi Y, Ohshima M, Morishita Y, Suzuki HI, Kohyama T, Nagase T. Differential knockdown of TGF- ligands in a three-dimensional co-culture tumor-stromal interaction model of lung cancer. *BMC Cancer*. 2014 Aug 9;14:580. 査読あり

9. Noguchi S, Saito A, **Horie M**, Mikami Y, Suzuki HI, Morishita Y, Ohshima M, Abiko Y, Mattsson JS, König H, Lohr M, Edlund K, Botling J, Micke P, Nagase T. An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Sep 1;20(17):4660-72. 査読あり

10. **Horie M**, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T. Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. *Exp Lung Res*. 2014 Jun;40(5):222-36. 査読あり

11. **Horie M**, Noguchi S, Tanaka W, Goto Y, Yoshihara H, Kawakami M, Suzuki M,

Sakamoto Y. Relationships among smoking habits, airflow limitations, and metabolic abnormalities in school workers. *PLoS One*. 2013 Nov 29;8(11):e81145. 査読あり

12. Saito A, Suzuki HI, **Horie M**, Ohshima M, Morishita Y, Abiko Y, Nagase T. An integrated expression profiling reveals target genes of TGF- and TNF- possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(2):e56587. 査読あり

13. Mikami Y, Yamauchi Y, **Horie M**, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T. Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 30;428(4):451-7. 査読あり

14. **Horie M**, Saito A, Mikami Y, Ohshima M, Morishita Y, Nakajima J, Kohyama T, Nagase T. Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three-dimensional in vitro co-culture model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun 22;423(1):158-63. 査読あり

15. **Horie M**, Ugajin M, Suzuki M, Noguchi S, Tanaka W, Yoshihara H, Kawakami M, Kichikawa Y, Sakamoto Y. Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in community-acquired pneumonia. *Am J Med Sci*. 2012 Jan;343(1):30-5. 査読あり

【学会発表】(計 10 件)

1. **Horie M**, Saito A, Nagase T. Transcriptome Analysis of Small Cell Lung Cancer. ATS 2016. San Francisco (USA)

2. Inui T, Nakamoto K, Sada M, Ishii H, Kogane T, Koyama H, Matsuzaki H, Noguchi S, Mikami Y, **Horie M**, Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H. Influence of gene

polymorphism on biological markers in patients with asthma and COPD associated with air pollutants. APSR 2015. Kuala Lumpur (Malaysia)

3. Mikami Y, Takai D, **Horie M**, Noguchi S, Matsuzaki H, Makita K, Takeshima H, Yamauchi Y, Tanaka G, Nagase T. Respiratory manifestations in hospitalized patients with hematological malignancies. ERS 2015. Amsterdam (Holland)

4. Matsuzaki H, Yamauchi Y, Mikami Y, Noguchi S, **Horie M**, Narumoto O, Hirota N, Jo T, Takami K, Nagase T. Evaluation Of Intracellular Signaling Of Synergistic Chemokines Production From Bronchial Epithelial Cells By Co-Stimulation With IL-17A And TLR3 Ligand. ATS 2015. Denver (USA)

5. Mikami Y, Matsuzaki H, **Horie M**, Noguchi S, Jo T, Mitani A, Yamauchi Y, Nagase T. Montelukast Inhibits Transforming Growth Factor-1-Induced Fibroblast To Myofibroblast Differentiation. ATS 2015. Denver (USA)

6. **Horie M**, Mikami Y, Noguchi S, Matsuzaki T, Tarui M, Narumoto O, Hirota N, Mitani A, Saito A, Jo T, Sakamoto M, Takami K, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T, Yamauchi Y. Transforming growth factor-beta induces the production of neurotrophins in lung fibroblasts via Smad pathway. APSR 2014. Bali (Indonesia)

7. Inui T, Wada H, Nakamoto K, Sada M, Tsuji S, Nakamura M, Honda K, Tanaka Y, Koide T, Takata S, Yokoyama T, Kurai D, Saraya T, Ishii H, Koyama H, Kogane T, **Horie M**, Mikami Y, Noguchi S, Matsuzaki H, Yamauchi Y, Kohyama T, Goto H, Takizawa H. Influence of gene polymorphism on air pollutants-induced airway oxidative

stress among asthmatic patients. APSR 2014. Bali (Indonesia)

8. Jo T, Yamauchi Y, Okudaira R, Saito A, Hirota N, Goto Y, Narumoto O, Watanabe K, Sunohara M, Amano Y, **Horie M**, Mikami Y, Noguchi S, Matsuzaki H, Tanaka G, Takami K, Ohishi N, Kohyama T, Nagase T. The influence of bronchial asthma as a comorbidity of COPD on the COPD assessment test (CAT). ERS 2014. Munich (Germany)

9. Matsuzaki H, Yamauchi Y, Mikami Y, Noguchi S, **Horie M**, Narumoto O, Hirota N, Jo T, Takami K, Nagase T. IL-17A And TLR3 Ligand Poly (i:c). Synergistically Induce The Production Of Chemokines From Bronchial Epithelial Cells. ATS 2014. San Diego (USA)

10. Mikami Y, Yamauchi Y, Hirota N, Matsuzaki H, **Horie M**, Noguchi S, Jo T, Narumoto O, Kohyama T, Takizawa H, Nagase T. Lymphotoxin Receptor Signal Induces IL-8 From Bronchial Epithelial Cells Via Erk And NF- κ B Activation. ATS 2014. San Diego (USA)

【図書】(計 2 件)

1. **Horie M**. DNA adduct formation by diesel exhaust and its relevance to carcinogenesis. *PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects & Prevention Strategy*. 81-102.

2. **堀江真史**, 山内康宏. 第 1 回呼吸器疾患に関する細胞生物学 気道上皮細胞. *Respiratory Medical Research*. 2016 年 1 月:4:65-70

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 真史 (HORIE MASAFUMI)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号 : 60732659