

GRHL2 遺伝子の肺癌における役割の解明

名古屋大学大学院医学系研究科 教授 佐藤光夫

1. 研究の背景・目的

肺癌は本邦における癌死の第一位の原因である。その主な理由は高齢化に伴う罹患数の増加および早期発見が困難であり、また、既存の治療法の成績が不十分であることによる。分子レベルにおいて肺癌の病態を明らかにすることは、新たな治療法の開発につながるため重要である。

GRHL2 遺伝子は胎生期の臓器形成を制御する転写因子をコードする *GRHL* 遺伝子ファミリーの一つである[1]。*GRHL2* 遺伝子はヒトのさまざまな癌において腫瘍促進性または抑制性の相反する二相性の機能を持つことが報告されている。例えば、膵臓癌においては、上皮性の性質および幹細胞の性質や転移に関連し癌促進的に機能することが報告されている[2]。また、乳癌においても、*GRHL2* 遺伝子の癌促進的な機能が報告されている。*GRHL2* 遺伝子のノックダウンは乳癌細胞において上皮間葉細胞転換（epithelial to mesenchymal transition; EMT）を伴う増殖抑制を示し、逆に、*GRHL2* 遺伝子の過剰発現は、足場非依存性増殖を増強した[3]。しかし、一方で、*GRHL2* 遺伝子が乳癌細胞において EMT 誘導性の代謝変化の抑制を介して足場非依存性増殖を抑制した報告がある[4]。これは *GRHL2* の腫瘍抑制的な働きを示す。

これまでに肺癌における *GRHL2* 遺伝子の機能を調べた報告は一報のみである[5]。同研究において、*GRHL2* ノックダウンは肺癌細胞株 2 株（A549, H1299）の増殖を抑制したが、一方で浸潤能を増強した。この結果は、肺癌の悪性形質における *GRHL2* の機能としては、一部相矛盾する結果であった。このように、肺癌における *GRHL2* の役割の解明は未だ十分にはなされていない。

以上の背景から、本研究は *GRHL2* の肺がんにおける役割の解明を目的とした。公共データベースを使用した発現解析では、肺腺癌、肺扁平上皮癌いずれにおいても *GRHL2* は高発現を示した。肺がん細胞パネルを対象としたタンパク発現解析において *GRHL2* を最も高く発現した HCC827 細胞を使用してノックダウン実験を実施したところ、*GRHL2* 遺伝子のノックダウンは HCC827 細胞の増殖を抑制した。特に足場非依存性増殖を顕著に抑制し

た。以上の結果は *GRHL2* 遺伝子が肺がんにおいてはがん促進的に作用することを示唆した。

2. 研究の対象ならびに方法

1. 細胞株および細胞培養

肺がん細胞株および不死化正常気管支上皮細胞株 HBEC4KT は American Type Culture Collection(ATCC)から購入、もしくはテキサス大学 John D. Minna 博士または Adi F. Gazdar 博士から受領した[6]。肺癌細胞株の培養は 10% ウシ胎児血清(FCS)を添加した RPMI-1640(富士フィルム和光純薬株式会社,Cat#189-02025)を使用し、HBEC4 は EGF(gibco,Cat#10450-013) と BPE(gibco,Cat#13028-014) を添加した KSM(gibco,Cat#17005042)を使用した。すべての細胞培養を 5%CO₂ インキュベーター内で実施した。

2. 遺伝子ノックダウン実験

siRNA (最終濃度 6.67nM)をトランスフェクション試薬 (Lipofectamine RNAiMAX ,Life Technologies Corp., Cat#13778-150)を用いて一時的に導入し、ノックダウンを行った。オフターゲット効果の影響を減らすために、*GRHL2* のノックダウンは配列の異なる 3 種類の siRNA(*GRHL2* Silencer Select Pre-designed siRNA ,Ambion, Cat#4427037)を使用し、それぞれを si*GRHL2*-①(ID: s36754)、si*GRHL2*-②(ID: s36755)、si*GRHL2*-③(ID: s36756)とした。また、陰性コントロールを siNC(Silencer Select Negative Control#1 siRNA,Ambion, Cat# 4390843)とした。

3. 細胞増殖アッセイ

WST-1 試薬(Roche,Cat#11644807001)を用いた吸光度の測定により、細胞の増殖を定量した。ノックダウン細胞を 10,000/well で 96well プレートにプレートし、2~3 日培養した後、WST-1 試薬を加え吸光度を測定した。対照細胞とノックダウン細胞間で t 検定を行うことで増殖を評価した。

4. 液体コロニーアッセイ

液体コロニー形成を確認することで、クローナルな細胞の増減を2次的に観察した。ノックダウン細胞を500/wellになるよう6wellプレートにプレートし、14日培養後、メチレンブルーで染色を行った。染色されたコロニーの数をカウントし、対照細胞とノックダウン細胞間でt検定を行うことで増殖を評価した。

5. ソフトアガーアッセイ

軟寒天中で細胞を培養することで、足場非依存的な増殖を測定した。アガーはSea Kem GTG Agarose (Lonza,Cat#50071)を使用した。0.5%アガーで24wellプレートの底を覆い、0.33%アガーで細胞が1,000/wellになるようにプレートした。コロニーの数をカウントし、対照細胞とノックダウン細胞間でt検定を行うことで増殖を評価した。

6. ウェスタンブロット

各肺癌細胞株におけるGRHL2タンパクの発現を調べ、使用する細胞株を決定し、それらの細胞株におけるGRHL2遺伝子のノックダウンが正常に行われているかを確認した。1次抗体としてGRHL2抗体(abcam, Cat#ab88631)、Actin抗体(SIGMA,Cat#A2228)、Vimentin抗体(BD Biosciences,Cat#550513)、E-cadherin抗体(BD Biosciences,Cat#610181)の4種類を用いた。Actinはタンパクローディングのコントロール、Vimentinは間葉系のマーカー、E-cadherinは上皮系のマーカーとして使用した。2次抗体としてマウスモノクローナル抗体(GE Healthcare,Cat#NA931-1ML)を1:2000で希釈し、使用した。

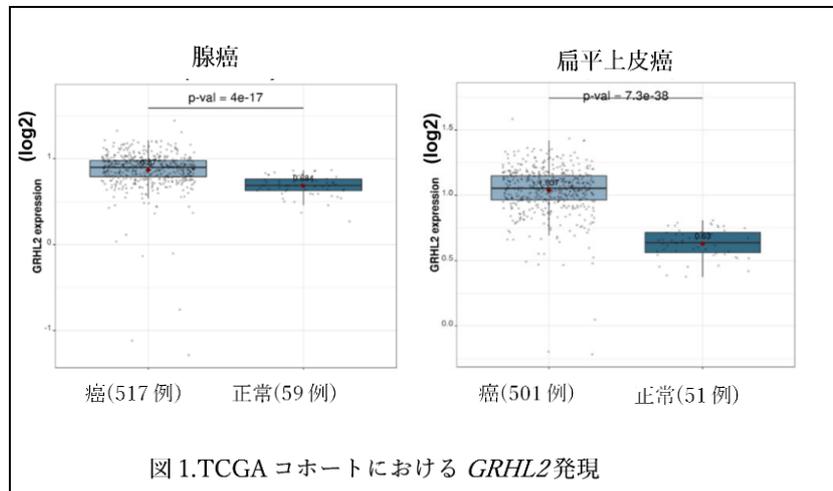
7. 統計

2群間の統計学的比較には、マイクロソフトエクセルを用いたスチューデントのtテストを実施した。

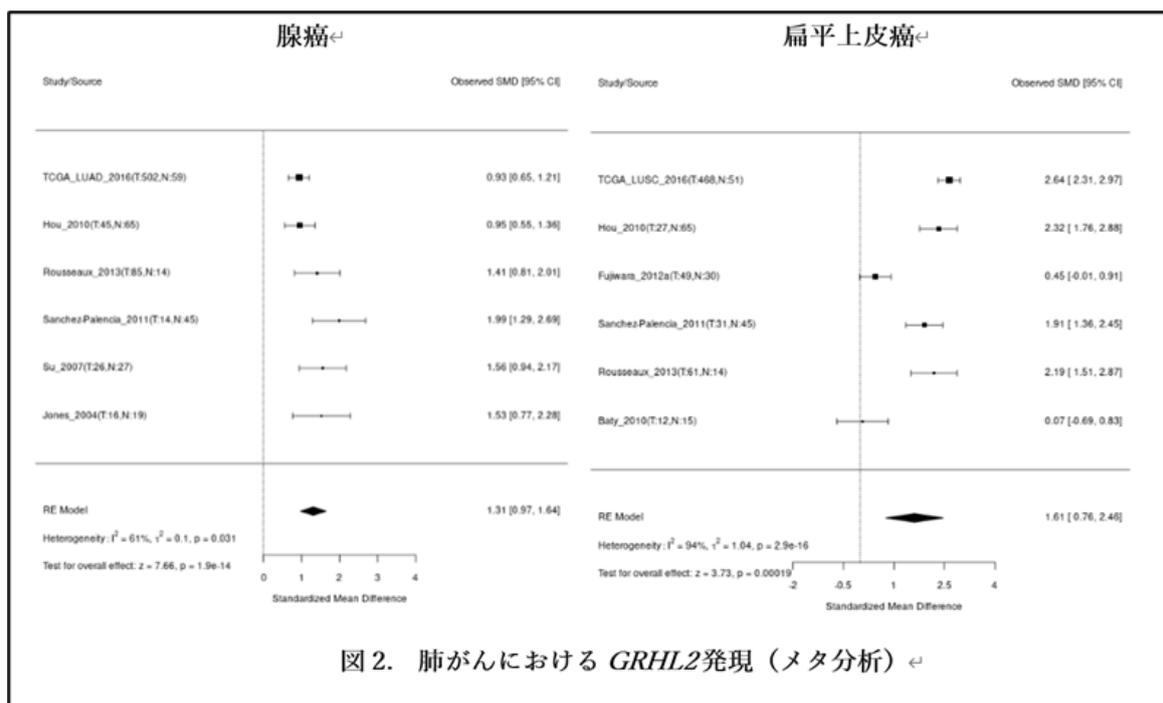
3. 結果

3. 1. *GRHL2* 遺伝子は肺がんにおいて高発現

Bioinformatics 解析を online ツールである、Lung Cancer Explorer (LCE) を用いて行った [7]。癌ゲノムプロジェクトとして公開されている TCGA コホートを 사용하여、肺癌と正常肺における *GRHL2* 発現を解析し



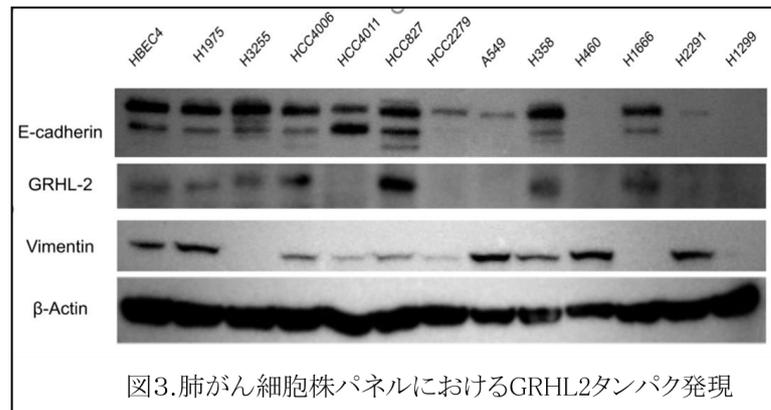
た。腺癌および扁平上皮癌において、正常肺組織と比較すると *GRHL2* が高く発現していることが確認された。(図1 ; 腺癌 : $p=4e-17$ 、扁平上皮癌 : $p=7.3e-38$) TCGA コホート以外のデータセットを含めたメタ分析においても、*GRHL2* の高発現を示している。(図2 ; 腺癌 : $p=1.9e-14$ 、扁平上皮癌 : $p=0.00019$)



3. 2. *GRHL2* 遺伝子のノックダウンは肺腺がん細胞株 HCC827 の増殖を抑制。特に足場非依存性増殖を強く抑制

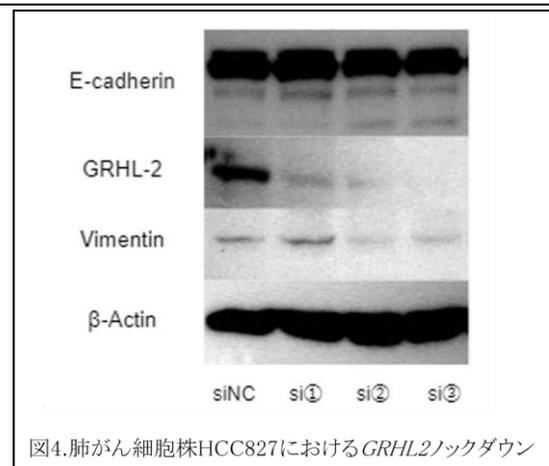
Western Blotting にて各肺癌細胞株における *GRHL2*、Vimentin、E-cadherin の発現を調べた。

(図3) 不死化正常気管支上皮細胞株 HBEC4KT を正常コントロールとして用いた。この中で最も *GRHL2* の発現が高い HCC827 を用いて *GRHL2* ノックダウン実験を行った(図 4)。*GRHL2* のノックダウンに対し、



E-cadherin と Vimentin は明らかな変化を示さなかった。

次に WST-1 試薬を使用し、*GRHL2* ノックダウンが増殖に与える影響を通常の培養条件である細胞が比較的密な状態で確認した(図 5A)。各グラフは対照細胞を 1 とし、*GRHL2* ノックダウン細胞をそれに対する割合で示したものである。対照細胞と比較し、si-②、si-③は有意差をもって細胞の増殖が抑制される現象が認められたが、si-①では対照細胞と有意差が認められなかったため、HCC827 では *GRHL2* ノックダウンは比較的密な状態における増殖を有意に抑制しないことを示した。



引き続き、*GRHL2* ノックダウンが癌細胞のクローン増殖能に与える影響を液体コロニーアッセイにて評価した (図 5B,C)。各グラフは対照細胞を 1 とし、*GRHL2* ノックダウン細胞をそれに対する割合で示したものである。液体コロニーアッセイは、wst-1 増殖アッセイよりもクローナルで過酷な条件下のアッセイである。これにおいては、*GRHL2* ノックダウンによって細胞増殖の抑制を確認した。

ソフトアガーアッセイにより、*GRHL2* ノックダウンの足場非依存性増殖への影響を評価した(図5D)。対照細胞と比較してノックダウン細胞は顕著な増殖低下がみられ、HCC827において*GRHL2* ノックダウンは足場非依存性増殖を強く抑制した。

4. 考察

肺がん細胞株において*GRHL2* タンパク発現は、上皮系マーカーである CDH1 (E-cadherin)発現と正の相関傾向を示し、逆に、間葉系マーカーである Vimentin 発現と逆相関の傾向を示した(図1)。この結果は、*GRHL2* が肺がん細胞の上皮性性質を関連することを示唆した。

オンラインツールを用いて肺がん患者から採取した検体における *GRHL2* 発現を調べた。*GRHL2* は肺腺癌、肺扁平上皮癌いずれにおいても、正常肺検体に比べて発現は増加しており(図2)、これは *GRHL2* が肺がんの発生または進展に寄与することを示唆した。

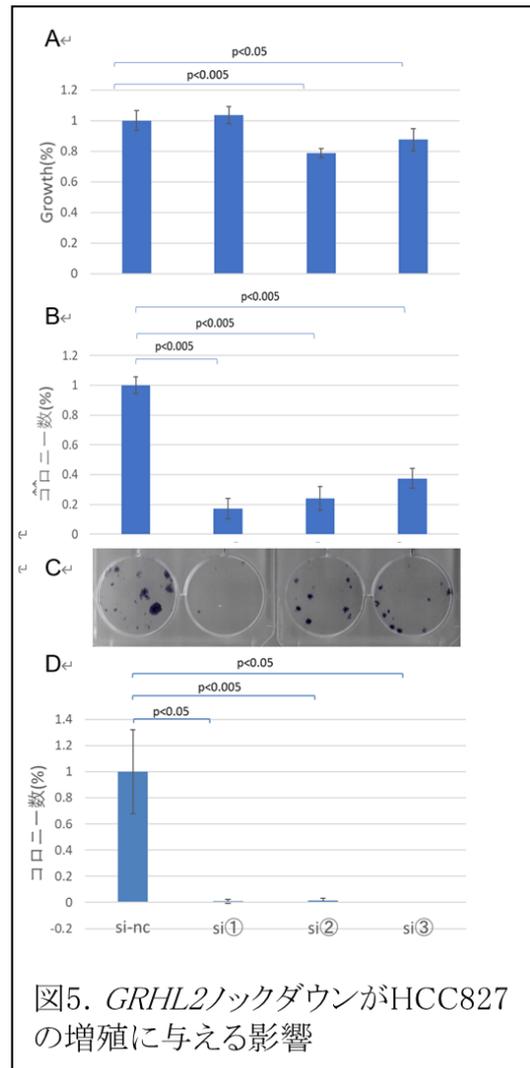


図5. *GRHL2*ノックダウンがHCC827の増殖に与える影響

GRHL2 を高発現する HCC827 細胞を使用して、RNA 干渉による *GRHL2* ノックダウン実験を行った。細胞増殖を比色分析的アッセイ、コロニー形成アッセイ、足場非依存性増殖アッセイの3つで評価した。細胞が比較的密な状態でアッセイを実施する比色分析的アッセイでは明らかな変化を認めなかったが、コロニー形成アッセイ、足場非依存性増殖アッセイにおいては、*GRHL2* ノックダウンは強い抑制効果を示した(図5)。足場非依存性増殖アッセイは、がんの悪性形質と最もよく相関するアッセイの一つであるため、これらの結果は、*GRHL2* 発現が HCC827 細胞の悪性形質に寄与することを示唆した。別の細胞株においても同様の結果が得られるかの確認が必要であると考えた。

以上、我々の結果は、*GRHL2* が肺がん細胞の悪性形質に寄与することを示唆した。さらなる追加実験によりその検証が必要と考えた。

5. 文献

1. Wilanowski, T., et al., *A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to Drosophila grainyhead*. Mech Dev, 2002. **114**(1-2): p. 37-50.
2. Nishino, H., et al., *Grainyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression*. Cancer Med, 2017. **6**(11): p. 2686-2696.
3. Werner, S., et al., *Dual roles of the transcription factor grainyhead-like 2 (GRHL2) in breast cancer*. J Biol Chem, 2013. **288**(32): p. 22993-3008.
4. Farris, J.C., et al., *Grainyhead-like 2 Reverses the Metabolic Changes Induced by the Oncogenic Epithelial-Mesenchymal Transition: Effects on Anoikis*. Mol Cancer Res, 2016. **14**(6): p. 528-38.
5. Pan, X., et al., *GRHL2 suppresses tumor metastasis via regulation of transcriptional activity of RhoG in non-small cell lung cancer*. Am J Transl Res, 2017. **9**(9): p. 4217-4226.
6. Ramirez, R.D., et al., *Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9027-34.
7. Cai, L., et al., *LCE: an open web portal to explore gene expression and clinical associations in lung cancer*. Oncogene, 2019. **38**(14): p. 2551-2564.

6. 論文

なし