

上皮間葉系細胞転換(EMT) の安定化因子を標的とする

肺がん治療開発

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

肺癌の有望な治療標的の発見には、肺癌細胞の悪性形質に基づいた機能的スクリーニングが有用であり、その実施には、ヒト発癌過程の再現性に優れるモデルが必要である。この点において、代表者開発の不死化正常ヒト気管支上皮細胞モデル(HBEC)は優れた実績を持つ。代表者は、留学中にヒト肺癌の発癌モデル HBEC を開発した¹。HBEC は世界で利用され応募者の共著論文を含め多くの一流誌論文で使用されてきた。さらに、代表者はヒト肺癌のすべての病理像のマウス皮下における再現に世界で初めて成功し(*Mol Cancer Res*, 2013 ハイライト採用)、同論文にて、正常気道上皮細胞が癌化する最終段階において、上皮間葉細胞転換(EMT)が必須であることを示した²。癌細胞はEMTにより浸潤能と遊走能を高め悪性度を増強する³。応募者は EMT に関する研究の中で興味深いデータを得た。間葉系の特徴を持つ肺癌細胞において EMT 誘導因子である ZEB1 をノックダウンすると間葉系から部分的 EMT 状態へ変化した。しかし、予想に反し、マウス皮下における移植腫瘍形成能は EMT の程度が減弱したにもかかわらず増強した。この結果は、これまで信じられてきた EMT が進むにつれて細胞の悪性度が増強するという概念と相矛盾するが、部分的な EMT 状態の方が、むしろ、完全な EMT 状態よりも *In Vivo* での悪性度が高いことを示唆する興味深いデータである。さらに、海外共同研究者であるアメリカ・ライス大学 Jolly らは、シミュレーション解析から、部分的な EMT 状態の細胞が容易に上皮系や間葉系に移行せず安定するためには、既知の EMT 制御分子に加えて、“形質安定化因子”の働きが必要であると推測し、GRHL2 が肺癌における形質安定化因子であると報告した⁴。上記の背景より、肺癌における部分的な EMT を安定化する未知の因子の存在が推測され、これは肺癌の悪性形質を決定する有望な治療標的の可能性がある。そこで、本研究は当初の目的として、スクリーニングモデルとして実績のある HBEC 細胞を使用して、肺癌治療標的としての“形質安定化因子”を機能的にスクリーニングし、新規治療標的を発見することを目的とした。本年度は、スクリーニング実施前の実験として以下を実施した。上記の Jolly らの論文においてハイブリ

ッド細胞細胞として報告されている H1975 細胞において形質安定化因子として報告されている Grainyheadlike 2, a mammalian homolog of Drosophila grainyhead (GRHL2) 遺伝子のノックダウン実験を行い、増殖、コロニー形成、薬物感受性に与える影響を評価した。

2. 研究の対象ならびに方法

<細胞培養実験>

肺腺癌細胞 NCI-H1975(テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンターAdi F. Gazdar 博士の好意により受領)。を使用した。培養は 10%ウシ胎児血清(Gibco)入りの RPMI メディウム(シグマアルドリッチ)を使用し、5%CO₂ インキュベーター内で実施した。

<遺伝子ノックダウン実験>

合成 RNA 干渉オリゴ(Silencer Select、最終濃度 5nM)をトランスフェクション試薬(Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent)を用いて NCI-H1975 に一時的に導入した。導入後 48 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロット用のライセート回収、もしくは、増殖アッセイまたはパクリタキセル感受性実験用にプレートした。

<ウエスタンブロット>

RIPA バッファーを使用して細胞溶解し 20ug のタンパクをロードした。一次抗体として、GRHL2, E-cadherin, Vimentin を使用した。

<細胞増殖アッセイ>

テトラゾリウム塩(WST-1) (ロッシュ)を使用して定量した。

<液体コロニーアッセイ>

6 ウエルプレートに 500 個もしくは 1,000 個の細胞をトリPLICATEにてプレートし、10 日後にコロニーをメチレンブルー染色した。コロニーを目視でカウントした。

<薬物感受性実験>

トランスフェクション 2 日後に細胞を 96 プレートにプレート(1,000 個/ウエル)し、翌日パクリタキセルを段階希釈(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128nM)にて添加、4 日後に増殖を WST-1 にて定量した。測定結果をオンラインソフト Dr. Fit にて解析し 50%増殖阻止濃度を算出した。

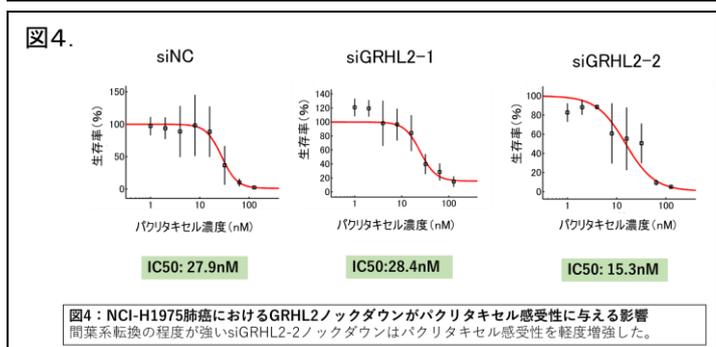
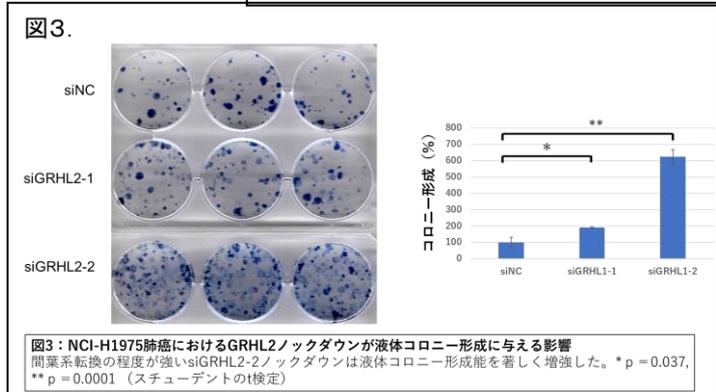
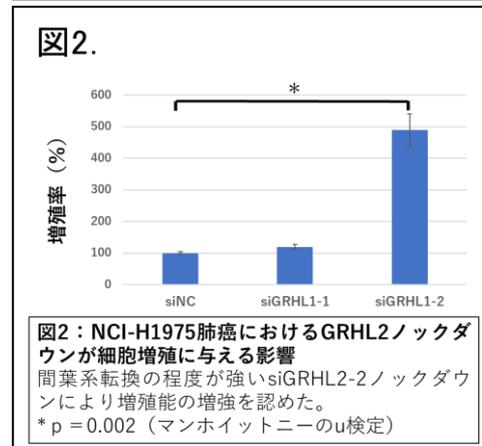
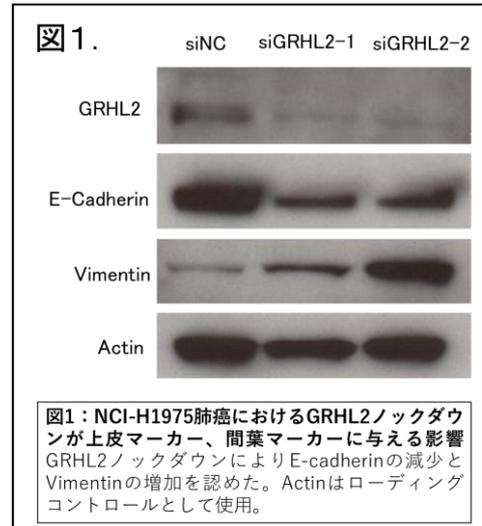
3. **研究結果**肺癌細胞 H1975 細胞を使用して RNA 干渉による GRHL2 遺伝子のノックダウンを実施した。2 種類のノックダウン RNA (GRHL2-1 と GRHL2-2) を使用した。ウェスタンブロッティングにて GRHL2 タンパクの良好なノックダウンを確認した (図1)。上皮性マーカー E-cadherin タンパクはノックダウンにて減少し、間葉系マーカー Vimentin は逆に増加した。Vimentin の増加程度は特に、GRHL2-2 で大きかった。次に、細胞増殖を WST-1 アッセイで評価した。GRHL2-2

ノックダウン細胞は増殖がコントロールと比較し、およそ 5 倍と著しく増強した (図2)。この傾向は液体コロニーアッセイでも同様であった (図 3)。パクリタキセルに対する感受性を評価した。GRHL2②ノックダウン細胞において感受性が軽度改善した (図 4)。

4. **考察**

我々は過去の報告において、非小細胞肺癌の EMT 決

定において EMT 誘導転写因子の中で、特に ZEB1 が重要な働きを果たしていることを示した。同論文において、肺癌細胞は大きく、上皮性、間葉系、両者の中間の性質を持つものの 3 つのタイプに分類されることを見出した⁵。その中で、NCI-H1975 は E-cadherin と Vimentin の両者を発現する中間の性質を持つタイプに分類された。Jolly らも NCI-H1975 が上皮性、間葉系、両者の中間の性質を持つタイプであることを見出しハイブリッド EMT と名付けた、さらに、その性質の安定化因子として転写因子 GRHL2 が機能するこ



とを示唆する結果を報告した。GRHL2 は気管支の発生など管腔構造の発達を促進することが知られている。JollyらはGRHL2のノックダウンがNCI-H1975の移動能を抑制することを示したが、その他の形質についてはこれまで評価されていない。我々は、GRHL2のノックダウンがNCI-H1975の増殖とコロニー形成を増強し、パクリタキセルに対する感受性を軽度改善する結果を得た。

上述したように、Jollyらは、GRHL2のノックダウンがNCI-H1975の移動能を抑制すると報告したが、これは、悪性度が減弱することを示唆しており、アッセイ系は異なるが我々の結果とは相反する。まずは、我々も移動能を評価し、彼らの結果と比較することが必要と考える。これまでの報告は、GRHL2の癌における役割は複雑であり通常の癌遺伝子と腫瘍抑制遺伝子という単純な分類は困難であることを示唆する。例えば、乳癌におけるGRHL2の役割を検討した論文は、GRHL2がEMT抑制、アノキス促進など腫瘍抑制性の機能を持つことを示しているが⁶、一方で、別の論文は膵臓癌において、GRHL2が幹細胞性質の維持に関与する報告もある⁷。肺癌におけるGRHL2の役割をより明確に解明するためには、複数の異なるタイプの細胞を使用して、増殖能、アノキス抵抗性、幹細胞性、薬剤感受性、マウス異種移植増殖能などの形質を網羅的に解析することが必要と考える。

我々のGRHL2ノックダウン実験では2種類のノックダウンRNA(GRHL2-1とGRHL2-2)を使用した。両ノックダウン間でのGRHL2のノックダウン効率の差はほとんどなかったにもかかわらず、増殖能、コロニー形成能に大きな差を認めた。わずかなノックダウン効率がこれらの差の原因となった可能性がある。しかし、オフターゲット効果による影響の可能性もあるため、さらに別のノックダウンRNAを追加して検証することが必要と考えた。

我々の結果は、既報論文が提唱するGRHL2が肺癌細胞のハイブリッドEMT性質の安定化因子としての機能を支持する結果ではなかった。しかし、アッセイ法が異なるなどの要因があるため、さらなる実験にて確認する必要があると考えた。これらの結果を最終的な目標であるHBEC細胞を使用した肺癌治療標的としての“形質安定化因子”の機能的スクリーニングからの新規治療標的発見に繋げていきたい。

5. 文献

1. Sato M, Vaughan MB, Girard L, et al. Multiple oncogenic changes (K-RAS (V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 2006;66:2116-2128.

2. Sato M, Larsen JE, Lee W, et al. Human lung epithelial cells progressed to malignancy through specific oncogenic manipulations. *Mol Cancer Res* 2013;11:638-650.
3. Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. *Respirology* 2012;17:1048-1059.
4. Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, et al. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget* 2016;7:27067-27084.
5. Takeyama Y, Sato M, Horio M, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer Lett* 2010;296:216-224.
6. Cieply B, Riley Pt, Pifer PM, et al. Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2. *Cancer Res* 2012;72:2440-2453.
7. Nishino H, Takano S, Yoshitomi H, et al. Grainyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression. *Cancer Med* 2017;6:2686-2696.

6. 論文

なし