

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08360

研究課題名(和文) 神経内分泌肺癌に対する悪性神経系形質制御による新たな治療戦略の創成

研究課題名(英文) Establishment of novel therapeutic strategy against neuroendocrine lung cancer through regulation of malignant neural phenotype

研究代表者

矢澤 卓也 (YAZAWA, TAKUYA)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々是非神経内分泌肺癌株にIII/IV型POU転写因子であるPOU3F4あるいはPOU4F2を導入することにより、神経内分泌肺癌への形質転換が惹起されることを経験した。本研究の推進により、その形質転換現象がダイレクトリプログラミング現象であることが明らかとなり、また、POU3F4によってもPOU4F2によっても活性化する神経系特異的なNOTCH-HES pathwayを遮断することにより神経内分泌形質が弱まることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We had experienced that POU3F4 or POU4F2 transgene made non-neuroendocrine lung cancer (NNELC) cells cause transformation to neuroendocrine lung cancer (NELC). Carrying out this study, it was clarified that the transformation from NNELC to NELC is a direct reprogramming phenomenon and that breakdown of a neural cell-specific NOTCH-HES pathway, which is activated by POU3F4/4F2 transgene, diminish neuroendocrine phenotype.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 神経内分泌肺癌 非神経内分泌肺癌 形質転換 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡者数を発生臓器部位別にみると、肺癌は男女ともに第一位であり、その予後の向上が求められている。近年の分子標的治療の発達により非小細胞肺癌、とりわけ腺癌患者の予後には改善が見られつつあるが、極めて予後不良で肺癌の

15-25%を占める神経内分泌形質を有する肺癌(小細胞癌、大細胞神経内分泌癌)に対する治療法には立ち遅れが目立ち、効果的な新規治療法の確立が急務となっている。

神経内分泌肺癌は肺内のどの細胞から発生するのか？ 気道粘膜内に散在する神経内分泌細胞であるという説は本当に正しいのか？ 現在までのところ、その問いに対する確定的な答えはない。それには腺癌や扁平上皮癌では明らかになっている前癌病変が、未だに神経内分泌肺癌では明らかになっていないことも大きく影響している。しかし極く最近になり、肺上皮細胞特異的に *Rb1* および *p53* をダブルノックダウンしたマウス実験系を用いることにより、小細胞癌の 90% は気道粘膜内神経内分泌細胞から発生し、10% は末梢気道上皮から発生するとの報告がなされた(Southerland KD, *et al. Cancer Cell* 19:754-64,2011)。この知見は、神経内分泌肺癌の組織発生の概念に大きなパラダイムシフトを与えた。なぜなら非神経内分泌細胞からも神経内分泌肺癌細胞が発生しうること、また同時に、遺伝子操作により神経内分泌肺癌を非神経内分泌肺癌に形質転換可能であることが、この報告により示されたことになるからである。

申請者らはこれまで、小細胞肺癌の有する未熟な神経細胞としての形質がどのような転写因子によりもたらされ、その病態生理を反映しているかについて検討を重ねてきた。また申請者らは、()小細胞肺癌細胞が *POU3F2* のみならず他の class /

POU 転写因子をも発現していること、() class / *POU* 転写因子は相互に誘導し合っていること、() class / *POU* 転写因子は非神経内分泌肺癌細胞に対し未熟な神経系形質を誘導する能力を有していること、()そしてその形質誘導能力は特に *POU4F2* や *POU3F4* において強力であることを発見し、これを世界に先駆けて報告した(*Pathol Int* 64:415-22,2014)。このような知見は、遺伝子操作により、悪性形質に深く関与している未熟な神経系形質を神経内分泌肺癌細胞から排除することが可能であることを示唆しており、申請者らはこのような発想から本研究を申請するに至った。

2. 研究の目的

そこで本研究では、悪性形質に深く関与している未熟な神経系形質を喪失させることによる新たな神経内分泌肺癌治療戦略を確立することを最終目的とし、その基盤となる検討を積み重ねていくこととした。具体的には、これまでの検討により class / *POU* 転写因子(*POU3F4*, *POU4F2*)が神経内分泌肺癌の未熟な神経系形質発現の主翼を担っていることが明らかになったことから、小細胞肺癌細胞に対し class / *POU* 転写因子の制御下にある未熟な神経系形質を誘導する能力を有するシグナルを探しあて、その経路を強制的に抑制することにより惹起される細胞形質変化について解析し、当該遺伝子操作が新規治療法に発展しうるか、その妥当性について検証していくことを主たる研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) III 型および IV 型 *POU* 転写因子 (*POU3F4*, *POU4F2*) を強制発現することにより非小細胞肺癌細胞に惹起される未熟神経系形質の獲得現象を形態的に証明するため、各遺伝子導入株を NOD-SCID マウス

に皮下移植することにより形成される腫瘍組織について、病理組織学的、免疫組織化学的に検討した。

(2) POU3F4 および POU4F2 遺伝子導入により神経内分泌癌細胞への形質転換が起こった細胞株を用い、GeneChip 解析をおこない、いかなる遺伝子発現変化が惹起されているかについて検討した。

(3) 上記の形質転換現象がいかなる機序で起こっているかを明らかにするため、形質転換前後での DNA メチル化パターン変化について検討した。

(4) POU3F4 遺伝子導入、POU4F2 遺伝子導入により共通して活性化していた神経/神経内分泌細胞特異的シグナルパスウェイを遮断するため、当該遺伝子に対するノックアウト実験をおこない、細胞形質の変化について検討した。

4. 研究成果

(1) POU3F4/4F2 導入により、大細胞癌株がヒト肺癌組織で見られる小細胞癌ないし大細胞神経内分泌癌としての形態的特徴を有する形態に変化し、免疫組織化学的には、CD56 や synaptophysin など神経内分泌マーカーを強く発現するようになった。一方で、複数の腺癌株を用い同様に III 型あるいは IV 型 POU 転写因子を強制発現する株を樹立したが、大細胞癌株と同様の形質転換現象は惹起されなかった。このことから、III/IV 型 POU 転写因子導入に伴う形質転換現象はいかなる肺癌細胞にも普遍的に起こるものではなく、分化の低下した肺癌細胞にのみ起こる現象であることが判明した。

(2) 上記のごとく神経内分泌癌に形質転換した細胞株を用い、コントロール株とともに

に GeneChip 解析を施行したところ、POU3F4/4F2 導入により神経内分泌マーカー遺伝子発現の著明な亢進が確認された。さらに驚くべき事に、リプログラミングに係わる遺伝子の強烈な発現亢進が引き起こされていることが明らかになった。

(3) (2)の結果を受け、POU3F4/4F2 導入に伴う形質転換現象の前後で DNA メチル化パターン変化が惹起されているか否かについて網羅的 DNA メチル化解析を行ったところ、プロモーターのメチル化状態が激変している遺伝子を多数見出すことができた。その中には神経系分化に重要な役割を演じている TCF4 なども含まれていることが明らかになった。

(4) (2)の結果を詳細に分析すると、POU3F4 および POU4F2 導入により共通して発現亢進する転写因子が存在することが判明した。そのうち神経分化に重要な役割を演じている NOTCH-HES pathway に着目し、ある分子(分子 A)の遺伝子をノックアウトすることによる神経内分泌形質の変化について検討したところ、CD56 の発現は半減した。神経内分泌形質は腫瘍細胞の悪性形質に密接に関連していることから、上記 NOTCH-HES pathway の遮断は、神経内分泌肺癌に対する分化制御を介した新たな治療法に発展しうるものと思われた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (3 件)

Ishii J, [Yazawa T](#), Chiba T, [Shishido-Hara Y](#), Arimasu Y, [Sato H](#), Kamma H. PROX1 promotes secretory granule formation in medullary thyroid cancer cells. *Endocrinology* 157:1289-1298, 2016.
DOI: 10.1210/en2015-1973

Suzuki M, Yazawa T, Ota S, Morimoto J, Yoshino I, Yamanaka S, Inayama Y, Kawabata Y, Shimizu Y, Komatsu M, Notohara K, Koda K, Nakatani Y. High-grade fetal adenocarcinoma of the lung is a tumour with a fetal phenotype that shows diverse differentiation including high-grade neuroendocrine carcinoma: a clinicopathological, immunohistochemical and mutational study of 20 cases. *Histopathology* 67:806-816, 2015.

DOI: 10.1111/his.12711

Yazawa T. Recent advances in histogenesis research of lung neuroendocrine cancers: Evidence obtained from functional analyses of primitive neural/neuroendocrine cell-specific transcription factors. *Pathol Int* 65:277-285, 2015.

DOI: 10.1111/pin.12267

[学会発表] (7 件)

矢澤華子、石井順、平松千恵、宍戸-原由紀子、菅間博、矢澤卓也。POU3F4/4F2 遺伝子導入により肺癌細胞に惹起されたダイレトリプログラミング現象。第 21 回日本臨床内分泌病理学会総会。東京都中央区。2017.10.27-28.

矢澤華子、石井順、宍戸-原由紀子、柏木維人、平松千恵、菅間博、矢澤卓也。POU3F4/4F2 遺伝子導入により肺癌細胞に惹起されたダイレトリプログラミング現象。第 106 回日本病理学会総会。東京都新宿区。2017.4.27-29.

石井順、矢澤卓也、千葉知宏、有益優、菅間博。PROX1 は甲状腺髄様癌の内分泌顆粒形成に関与する。第 19 回日本内分泌病理学会総会。佐賀県佐賀市。2015.10.24-25.

矢澤卓也。肺癌の分子病理学から見た組織病理学、細胞学。平成 27 年度千葉県臨床細胞学会(招待講演)。千葉県君津市。2015.07.11.

鈴木理樹、矢澤卓也、太田聡、森本淳一、吉野一郎、中谷行雄。Analysis of high-grade fetal adenocarcinoma of the lung. 第 104 回日本病理学会総会。愛知県名古屋市。2015.4.30-5.2.

石井順、小島薫子、千葉知宏、住石歩、有益優、宍戸-原由紀子、佐藤華子、矢澤卓也、菅間博。甲状腺髄様癌の内分泌顆粒形成における PROX1 の役割について。第 104 回日本病理学会総会。愛知県名古屋市。2015.4.30-5.2.

遠藤哲哉、石井順、榮田昌史、藤原正親、宍戸-原由紀子、下山田博明、平野和彦、寺戸雄一、菅間博、矢澤卓也、遠藤俊輔。肺内分泌腫瘍における BRN2、ASCL1、TTF1、P53 の発現性の検討。第 115 回日本外科学会定期学術集会。愛知県名古屋市。2015.4.16-18.

[図書] (0 件)

[産業財産権] (0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dep-m/pathology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 卓也 (YAZAWA, TAKUYA)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：50251054

(2) 研究分担者

原 由紀子 (HARA, YUKIKO)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40313267

矢澤-佐藤 華子 (YAZAWA-SATO,
HANAKO)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：60438132

三好 洋 (MIYOSHI, HIROSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322519