

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19438

研究課題名(和文) 肺癌の神経内分泌性格を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of regulatory factors of neuroendocrine features in lung cancers

研究代表者

末永 雄介 (Suenaga, Yusuke)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター・研究員

研究者番号：80581793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌は神経内分泌性格を示し、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を高発現する。小細胞肺癌におけるACTHの発現量は不良な予後と関連するが、肺癌がなぜ下垂体ホルモンを産生するかは不明であった。本研究では下垂体の個体発生を制御する転写因子が肺癌において活性化されることを見出した。腺癌と小細胞肺癌における体細胞突然変異を比較したところ、小細胞肺癌に特異的な変異は下垂体の発生を制御する転写因子の下流遺伝子に蓄積していた。また、小細胞肺癌の細胞株を3次元培養すると神経分化を誘導され、ACTHの産生が促進された。以上の結果から、肺癌は下垂体の発生経路を利用して神経分化し、ホルモン産生することが示された。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung carcinoma (SCLC) shows neuroendocrine differentiation and highly expresses anterior pituitary hormones. Expression levels of adrenocorticotrophic hormone in SCLC are associated with poor prognosis; however, mechanisms behind the hormone secretion in lung cancer cells have remained elusive. Here we show that transcription factors required for anterior pituitary development are activated during carcinogenesis of SCLCs. We compared the somatic mutations found in 346 adenocarcinomas and 77 SCLCs, and defined SCLC-specific mutations. The SCLC-specific mutations were enriched in downstream target genes of transcription factors related to anterior pituitary development. Furthermore, 3D culture of SCLC cell lines induced neuronal differentiation and promoted production of adrenocorticotrophic hormone. Therefore, lung cancer cells use the developmental pathway of pituitary gland to show neuroendocrine differentiation.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：小細胞肺癌 神経内分泌 下垂体 ホルモン 転写因子 分化 脱分化 発生

1. 研究開始当初の背景

<神経内分泌性格を有する肺癌>

小細胞肺癌は肺癌の中で最も悪性度が高く、その5年生存率は20%以下と極めて低い。また、神経内分泌細胞に特徴的な遺伝子の発現量が高く、ホルモンを産生する。特に下垂体前葉ホルモンである副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を産生することで知られ(Liddle *et al.*, *Arch Intern Med* 1963)、ACTH前駆体である

Pro-opiomelanocortin (POMC)の血中濃度が高い患者では小細胞肺癌が高頻度に肝転移し、全生存率が低いことが報告された(Stovold *et al.*, *Br J Cancer* 2013)。しかし、肺から発生する癌であるにもかかわらず、そもそもなぜ下垂体前葉ホルモンが産生されるのかは明らかになっていなかった。

<小細胞肺癌に特異的なゲノム異常>

小細胞肺癌は他の肺癌とは異なり、MYCファミリー遺伝子(MYC, MYCN, MYCL)の増幅が高頻度で起こる(Pietanza *et al.*, *Nat. Genet.* 2012)。また、がん抑制遺伝子p53およびRBは、ほぼ全例で機能欠失しており、p53とRBのダブルノックアウトによりマウスにおいて小細胞肺癌が誘発できる(Rickman *et al.*, *Nat Med* 2017)。最近、小細胞肺癌110検体を用いた網羅的なゲノム解析が行われたが、新規の予後因子は見出されず、神経内分泌性格を制御するASCL1の発現量と関連するゲノム異常も見出されなかった(George *et al.*, *Nature* 2015)。さらに、予期しないことに、ASCL1を全く発現しない小細胞肺癌のサブタイプが存在することが明らかになった(George *et al.*, *Nature* 2015)。その後、このサブタイプの一部はNEUROD1を発現し、神経内分泌性格と細胞生存を維持することが報告された(Borromeo *et al.*, *Cell Reports* 2016)。p53、RBのダブルノックアウトマウスではASCL1陽性の小細胞肺癌しか発生しないが、MYCを同時に過剰発現させることでNEUROD1陽性のサブタイプが発生することが示され、ヒトの小細胞肺癌で観察されるサブタイプ

の一部がマウスモデルで再現できるようになった(Mollaoglu *et al.*, *Cancer Cell* 2017)。

以上の結果からNEUROD1, ASCL1, MYCが小細胞肺癌の神経分化と生存を制御することが示されたが、なぜ小細胞肺癌が下垂体ホルモンを産生するのかは不明のままであった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、小細胞肺癌がどのように神経分化し、ホルモンを産生するのか、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

神経内分泌性格を制御する未知のゲノム異常を調べるため、まずバイオインフォマティクスを用いて変異解析を行った。データセットは以下の3つを用いた。

- ① 肺腺癌 346 検体と小細胞肺癌 71 検体の全エクソームデータ
- ② 肺腺癌から再発後に小細胞肺癌に形質転換した肺癌の原発巣と再発巣の全エクソームデータ
- ③ 臨床情報を有する 77 検体の全ゲノム解析データ、RNA-seq データ(George *et al.*, *Nature* 2015)

また変異解析から個体発生における下垂体発生の経路が肺癌の神経内分泌性格に關与する可能性が示唆されたため、肺癌細胞株の分化、脱分化を誘導し、肺癌が下垂体分化経路を利用できるかを分子生物学的手法により検証した。

4. 研究成果

<小細胞肺癌の体細胞突然変異は下垂体発生経路に集中する>

データセット①、②を解析し、小細胞肺癌に特異的に起こる体細胞突然変異を調べたところ、下

垂体前葉の発生を制御する二つの転写因子の下流遺伝子に体細胞突然変異が有意に蓄積することを見出した。さらに、この二つの転写因子は腺癌に比較して小細胞肺癌で高発現し、下流遺伝子には転写が引きこす変異の特徴(A から G への変異が転写の鋳型鎖に比較し非鋳型鎖で多いという現象、Haradhvala *et al.*, *Cell* 2016)が検出された。また、前述したNEUROD1やASCL1は下垂体発生の後期に発現し、肺癌の神経内分泌性格に関わる(図1)。これらの結果から、小細胞肺癌の発癌過程でこの二つの転写因子が活性化し、下垂体発生経路を利用して神経分化する可能性が示唆された。

〈下垂体発生初期の発現パターンを示す検体は予後良好である〉

下垂体発生経路の小細胞肺癌での重要性を評価するため、データセット③を用いて、下垂体発生を制御する転写因子の発現量と予後との関連を調べた。その結果、下垂体発生初期に存在する口腔外胚葉の発現パターンを示す検体で5年生存率が90%以上と非常に良好な予後を示した(図2)。口腔外胚葉は下垂体前葉の原基であるラトケ嚢が発生する組織である(図1)。また、口腔外胚葉の発現パターンを示す検体ではPOMCなどの下垂体前葉ホルモンは低い発現量を示した。

〈小細胞肺癌細胞株は下垂体発生経路に沿って分化、脱分化できる〉

以上の結果から肺癌が下垂体発生経路を利用できる可能性が示唆されたため、細胞株を用いて神経分化と脱分化の誘導を試みた。小細胞肺癌細胞株14種を調べたところ、SBC3とSBC5細胞は5年生存率90%以上の予後良好群と同じ口腔外胚葉の発現パターンを示した。これら細胞株を3次元培養したところ、下垂体の分化経路が活性化され、ASCL1、POMCの発現量が上昇し、分泌顆粒を持つ細胞に分化した。また、小細胞肺癌細胞を脱脂した牛胎児血清(以下、FCS)を含む

培地で培養することで、神経分化が抑制されるとの報告があったことから(Terasaki *et al.*, *Cancer Res* 1998)、小細胞肺癌株SBC3、SBC5を前報と同様に培養したところ、細胞形態が変化し、下垂体に特異的な転写因子の発現量が低下、口腔外胚葉のマーカーの発現量が上昇した。よって、下垂体発生経路に沿って小細胞肺癌細胞を人為的に分化、脱分化誘導できることが明らかになった。

〈結論〉

これら結果から、小細胞肺癌細胞では下垂体の発生を制御する転写因子の活性化が起こり、神経分化が進むこと、神経分化が進むほど下垂体ホルモンの発現量が上昇し、患者の生命予後が不良になることが示唆された。

本研究は、なぜ小細胞肺癌が下垂体ホルモンを産生するのかという、これまで全く謎であった疑問に対して、分子生物学的観点から一定の説明を与えるものである。

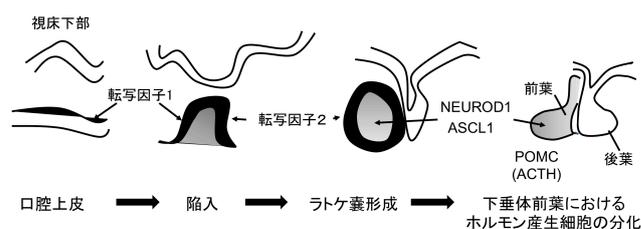


図1. 小細胞肺癌において特異的に体細胞突然変異を起こす転写因子1, 2の下垂体発生経路における遺伝子発現

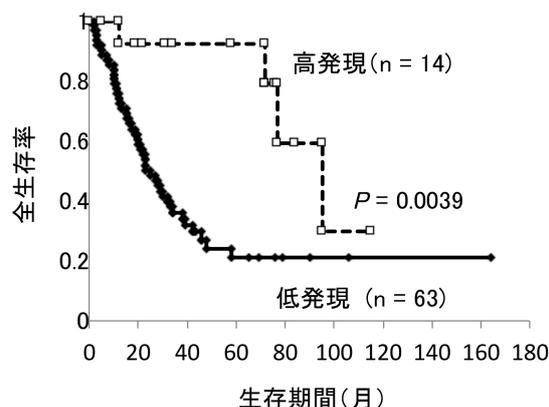


図2. 小細胞肺癌において下垂体発生初期の転写因子の高発現は良好な予後と相関する

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)

[学会発表](計6件)

1. 末永 雄介、新行内 雅斗、兼松 宗太郎、飯笹 俊彦、加藤 護、横井 左奈 下垂体前葉発生に関与する転写因子は小細胞肺癌の神経内分泌性格を制御する ConBio 2017、神戸、2017年12月、電子抄録 3P-0987
2. 末永 雄介、新行内 雅斗、兼松 宗太郎、飯笹 俊彦、加藤 護、横井 左奈、下垂体前葉発生に関与する転写因子は小細胞肺癌の神経内分泌性格を制御する、第76回日本癌学会学術総会、横浜、2017年9月、第76回日本癌学会学術総会 プログラム集、Page 223
3. 末永 雄介、肺癌の神経内分泌性格を制御する分子機構の解析、平成29年度第1回 生物系若手研究者講話、明治薬科大学、2017年6月9日
4. 末永 雄介、新行内 雅斗、兼松 宗太郎、飯笹 俊彦、加藤 護、横井 左奈、神経内分泌分化を制御する転写因子の下流遺伝子は小細胞肺癌において鋳型鎖・非鋳型鎖の変異率に強い非対称性を示す、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜、プログラム、p82
5. Yusuke Suenaga, Masato Shingyoji, Mamoru Kato, Isao Kurosaka, Miki Ohira, Tishihiko Iizasa, Hiroki Nagase, Sana Yokoi, Frequent somatic mutations in neuroendocrine differentiation-related pathways in SCLC-transformed lung adenocarcinomas, 日本人類遺伝学会第60回大会, 2015年10

月、東京、プログラム・抄録集、p282

6. Yusuke Suenaga, Masato Shingyoji, Mamoru Kato, Isao Kurosaka, Miki Ohira, Tishihiko Iizasa, Hiroki Nagase, Sana Yokoi, Frequent somatic mutations in neuroendocrine differentiation-related pathways in SCLC-transformed lung adenocarcinomas, 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、名古屋市、第74回日本癌学会学術総会プログラム、Page142

[図書](計1件)

末永 雄介、中川原 章、横井 左奈、神経内分泌腫瘍と脳腫瘍における MYC ファミリー遺伝子、実験医学、Vol. 36 (3月号) No.4、501-507、2018

[その他]

ホームページ等

千葉県がんセンター研究所

<https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

末永 雄介(SUENAGA, Yusuke)

千葉県がんセンター研究所・がんゲノムセンター・研究員

研究者番号:80581793