

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09676

研究課題名(和文) 肺癌におけるダイレクトリプログラミング現象：その必要条件および新規誘導因子の探索

研究課題名(英文) Clarification of precondition causing direct reprogramming in lung cancer

研究代表者

矢澤 華子(佐藤)(Yazawa-Sato, Hanako)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：60438132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺腺癌細胞においてダイレクトリプログラミング現象が惹起される条件について検討した。CRISPR-Cas9法により得られたRB1/TP53ノックアウト株を用い遺伝子発現解析を行ったところ、上皮間葉転換に関わる分子の有意な発現亢進が認められた。これらの細胞株に対し神経分化に關与する転写因子POU3F4/POU4F2の遺伝子導入を試みたが、神経内分泌細胞形質の付与は認められなかった。また腸上皮への分化に関わる転写因子CDX2、enteroblasticな分化に関わる転写因子SALL4の遺伝子導入を肺腺癌細胞に試みたところ、CDX2導入により腸上皮形質を付与できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は本邦においても世界的に見ても最も予後不良な癌腫であり、増加の一途を辿っている。その中でも肺腺癌は肺癌の中でも最も多い組織型であるとともに、肺腺癌細胞が有する細胞分化形質は多岐にわたっており、そのことが効果的な治療薬の開発を困難にしている。本研究で得られた知見及び本研究の更なる推進により肺腺癌の分化メカニズムや形質転換メカニズムが明らかになり、得られた知見は将来、効果的な治療薬の開発に繋がるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine indispensable condition for direct reprogramming in lung adenocarcinoma cells. We established RB1/TP53-knockout lung adenocarcinoma cells by CRISPR-Cas9 method and performed gene expression analysis. It was clarified that various epithelial-mesenchymal transition-related molecules are upregulated in RB1/TP53-knockout lung adenocarcinoma cells. Next, we tried to transfect POU3F4/POU4F2 genes, which are associated with neural differentiation, in RB1/TP53-knockout lung adenocarcinoma cells. However, neuroendocrine differentiation was not induced in the cells. Finally, we established lung adenocarcinoma cells expressing CDX2, a transcription factor (TF) promoting intestinal differentiation, or SALL4, a TF promoting enteroblastic differentiation, to examine the association in tumorigenesis of lung adenocarcinomas of intestinal type or hepatoid type. We obtained evidence that intestinal phenotype is induced by CDX2 in lung adenocarcinoma cells.

研究分野：肺癌細胞の分化とリプログラミング機構

キーワード：肺癌 リプログラミング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、肺癌は我が国におけるがんによる死因の第1位を占めており、今後更なる増加が予想されることから、新たな治療法の開発が急務となっている。肺癌には腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌の4大組織型が存在し、それぞれの組織型において治療法も異なる。近年、癌細胞の増殖や転移に関わる分子の同定により、特定の分子の機能を阻害する分子標的治療薬の使用による癌治療が盛んに行われてきており、特に肺癌においては、我が国に多いEGFR遺伝子変異腺癌に対するチロシンキナーゼ(EGFR)阻害剤を用いた分子標的治療が積極的に行われているが、EGFR阻害剤使用に伴う新たな薬剤耐性遺伝子変異の獲得が問題となっている。さらに近年、EGFR阻害剤を用いた治療中に小細胞癌へ形質転換する事象が相次いで報告されていることから、その形質転換メカニズムの解明が急がれる。

悪性腫瘍は所々の臓器から発生し、その大半は単一な組織型よりなるが、分化方向の異なる癌細胞が同一腫瘍内に存在している癌腫(複合型癌)も低頻度ながら存在し、その生命予後も一般に不良である。上記のように、肺癌はヒトに発生する癌腫の中でもバリエーションの豊かな癌腫であることから、複合型癌の発生頻度は他臓器に比して高い。更に、胎児肺類似の形態を示す未熟な分化形質を有する肺腺癌では、小細胞癌の混在が高頻度にみられる。このような複合型肺癌の発生メカニズムとしては、複合型肺癌の構成成分は本来同一細胞起源であり、構成成分の形質転換により生じるとい説が有力であるが、これまでにその直接的な証明はない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、小細胞癌における悪性神経内分泌形質獲得機序について検討を重ね、その検索中、神経系細胞の分化制御機構において極めて上流に位置するPOU型転写因子であるPOU3F4あるいはPOU4F2の遺伝子導入により、非小細胞肺癌細胞を小細胞肺癌細胞に形質転換させることに成功し、これを世界に先駆けて報告した。しかし、申請者らが形質転換に成功した肺癌培養細胞株は、細胞形質の未分化な大細胞癌由来に限定的であった。この事実から、肺癌細胞におけるダイレトリプログラミング現象の惹起には、何らかの必要条件が存在していることが示唆された。そこで本研究では、肺癌細胞においてダイレトリプログラミング現象が惹起される必要条件について解明することを目的とした。

RB1(retinoblastoma 1)は細胞周期に関わる重要な癌抑制遺伝子であるが、近年癌細胞の脱分化や幹細胞化への密接な関与が報告されている。これまでの解析により、POU3F4/POU4F2によるダイレトリプログラミングに成功した大細胞癌株ではRB1遺伝子発現が減弱していることが判明していることから、肺癌におけるダイレトリプログラミング現象が惹起される条件についてRB1の不活化を中心に検討した。

また希少肺腺癌であり、肺上皮細胞とは異なる細胞分化形質を示す腸型肺腺癌、肝型肺腺癌の発生機序についても検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)正常肺上皮細胞および種々の組織型に由来する肺癌細胞株におけるRB1の発現状態についての解析:

申請者らが保有する正常肺上皮細胞3株、非小細胞肺癌細胞13株(腺癌株6株、扁平上皮癌株3株、大細胞癌株4株)および小細胞肺癌細胞7株におけるRB1の発現状態について、RT-PCR法あるいはWestern Blot法を用いて解析した。また、RB1の機能異常についてはCCDN1/CDKN2A比により検討を行った。

(2)RB1遺伝子およびTP53遺伝子に異常の見られない非小細胞肺癌細胞株(A549, PC9)に対するRB1遺伝子およびTP53遺伝子のノックアウト:

神経内分泌肺癌では、RB1遺伝子とともに、TP53遺伝子にも異常が認められることから、CRISPER-Cas9システムを用いて、RB1およびTP53遺伝子特異的なCRISPER-Cas9発現ベクターを構築し、これをRB1およびTP53遺伝子に異常の見られない非小細胞肺癌細胞株(A549, PC9)に遺伝子導入することにより当該遺伝子の切断を行い、homozygous deletionを有する細胞株を樹立した。この操作により、RB1あるいはTP53単独ノックアウト細胞株とRB1およびTP53ダブルノックアウト株を樹立した。

(3)RB1およびTP53遺伝子ノックアウト細胞株に対するGene Chip解析を用いた網羅的遺伝子発現解析:

樹立したRB1およびTP53遺伝子ノックアウト細胞株(A549 RB1 KO株、A549 TP53 KO株、A549 RB1/p53 DKO株)を用いて、RB1およびTP53発現状態の変化に伴う細胞形質に関わる遺伝子発現変化について、Gene Chip解析を行った。

(4)RB1およびTP53遺伝子ノックアウト細胞株における上皮間葉転換に関わる分子の発現状態:
樹立したRB1およびTP53遺伝子ノックアウト細胞株(A549 RB1 KO株、A549 TP53 KO株、A549

RB1/TP53 DKO 株、PC9 RB1 KO 株、PC9 TP53 KO 株、PC9 RB1/TP53 DKO 株)を用いて、上記 Gene Chip 解析により発現亢進の認められた上皮間葉転換に関わる分子(CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2 など)の発現変化について、qRT-PCR 法を用いて解析した。

(5)RB1 および TP53 遺伝子ノックアウト細胞株への POU3F4/POU4F2 遺伝子強制発現が、細胞形態および神経内分泌形質に及ぼす影響についての解析：

樹立した RB1 および TP53 遺伝子ノックアウト細胞株(A549 RB1 KO 株、A549 TP53 KO 株、A549 RB1/TP53 DKO 株、PC9 RB1 KO 株、PC9 TP53 KO 株、PC9 RB1/TP53 DKO 株)を用いて、POU3F4 あるいは POU4F2 遺伝子導入に伴う形態変化を観察するとともに、神経内分泌形質に関与する遺伝子 (SYP, CHGA, NCAM1)発現変化について、qRT-PCR 法を用いて解析した。

(6)ダイレクトリプログラミングに関与する新たな誘導因子の探索：

CDX2 あるいは SALL4 遺伝子を種々の肺腺癌細胞株に強制発現させることによる腸型肺腺癌の形質に関わる分子(KRT7, KRT20, MUC2, SATB2)の発現変化および肝型肺腺癌の形質に関わる分子(AFP, GPC3)の発現変化について、qRT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1)肺癌細胞株における RB1 の発現について RT-PCR にて検討したところ、小細胞癌細胞株において、RB1 の発現低下が認められた。また、Western Blot により RB1 タンパクの発現について確認したところ、腺癌細胞株では RB1 の発現は認められたが、小細胞癌細胞株において RB1 発現は認められなかった。RB1 の機能異常について CCDN1/CDKN2A 比により検討すると、小細胞癌株では RB1 が機能していないこと、非小細胞株においては発現している RB1 が正常に機能していることが明らかになった。このことから、RB1 遺伝子が有する機能は、非小細胞癌株において RB1 をノックアウトすることにより、正確に検索できることが推測された。

(2)RB1 および TP53 遺伝子に異常の見られない非小細胞肺癌細胞 2 株(A549, PC9)に対し、CRISPER-Cas9 システムを用いて、RB1 および TP53 遺伝子特異的な CRISPER-Cas9 発現ベクターを用いて RB1 および TP53 遺伝子のノックアウトを行ったところ、各種 RB1 および TP53 ノックアウト腺癌株を樹立することに成功した。

(3)上記にて樹立した RB1 および TP53 遺伝子ノックアウト細胞 3 株(A549 RB1 KO 株、A549 TP53 KO 株、A549 RB1/TP53 DKO 株)を用いて、RB1 および TP53 発現状態の変化に伴う細胞形質に関わる遺伝子発現変化について Gene Chip 解析を行ったところ、野生型の A549 細胞と比較していずれの細胞株においても、上皮間葉転換に関わる分子(CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2 など)において有意な発現亢進が認められた。

(4)同様に、樹立した RB1 および TP53 遺伝子ノックアウト細胞 6 株(A549 RB1 KO, A549 TP53 KO, A549 RB1/TP53 DKO, PC9 RB1 KO 株、PC9 TP53 KO 株、PC9 RB1/TP53 DKO 株)を用いて、上皮間葉転換に関わる分子(CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2 など)の発現変化について qRT-PCR 法を用いて解析した結果、Gene Chip 解析結果と同様にこれら複数の分子の有意な発現亢進を確認することができた。

(5)次に、樹立した RB1 および TP53 遺伝子ノックアウト細胞 6 株(A549 RB1 KO 株、A549 TP53 KO 株、A549 RB1/TP53 DK 株、PC9 RB1 KO 株、PC9 TP53 KO 株、PC9 RB1/TP53 DKO 株)に対し、POU3F4 あるいは POU4F2 遺伝子を強制発現させることにより神経内分泌癌へのダイレクトリプログラミングを試みたが、細胞形態に有意な変化は認められなかった。また、神経内分泌形質に関与する遺伝子 (SYP, CHGA, NCAM1)発現変化について qRT-PCR 法を用いて解析したところ、有意な発現変化は認められなかった。

これらの結果から、小細胞肺癌に高頻度に見られる RB1 及び TP53 機能不全は、癌細胞の上皮間葉転換現象に深く関与していることが明らかになった。一般に小細胞肺癌においては CDH2 の発現が亢進していることから、本研究において得られた知見は、RB1 及び TP53 機能不全状態が、肺腺癌細胞から小細胞肺癌細胞へとリプログラムされるための準備状態を提供している可能性を示唆している。

(6)肺からは、腸型肺腺癌や肝型肺腺癌、肺芽腫、肺癌肉腫など、肺癌の発生母地である気道上細胞にはない性質を有する癌も発生し、またこれらの成分を有する通常型肺癌も存在する。このような現象も一種のダイレクトリプログラミング現象と解釈できる。そこで、腸型腺癌のマーカーである CDX2 ならびに肝型肺腺癌マーカーである SALL4 発現が肺癌細胞におよぼす影響について検討することを目的とし、CDX2 および SALL4 発現の認められない種々の肺腺癌細胞株(A549, PC9, H1975)に CDX2 および SALL4 遺伝子を強制発現させ、腸型形質に関わる分子(KRT7, KRT20, MUC2, SATB2)の発現および肝型形質に関わる分子(AFP, GPC3)の発現変化について qRT-PCR 法を

用いて解析した。その結果、CDX2 強制発現細胞株において、KRT7 発現は微減し、KRT20 は著明な発現亢進を示し、また微弱ながら MUC2 の発現亢進が認められた。この様な発現変化の程度は、遺伝子導入した肺腺癌株により異なっていた。一方、SALL4 強制発現株では、AFP、GPC3 といった肝型形質に関わる分子の有意な発現亢進は認められなかったが、CDX2 強制発現により SALL4 発現が誘導されるという新たな知見が得られた。SALL4 は AFP や GPC と並び enteroblastic differentiation を呈する胃癌のマーカー分子となっているが、SALL4 の発現が腸上皮分化に重要な CDX2 により肺腺癌細胞に誘導されるという事実は、CDX2 と SALL4 の間に何らかの interaction があることを示唆しており、今後はそのメカニズムの解明のため、更なる検討を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okii H, Yazawa T, Baba Y, Kanegae Y, Sato H, Sakamoto S, Goto T, Saito I, Kurahashi K.	4. 巻 61
2. 論文標題 Adenovirus vector expressing keratinocyte growth factor using CAG promoter impairs pulmonary function of mice with elastase-induced emphysema.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 264-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12492.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢澤華子、柏木維人、石井順、平松千恵、菅間博、矢澤卓也
2. 発表標題 POU3F4およびPOU4F2強制発現に伴い共通して活性化する転写因子HES5の制御による神経内分泌形質の減弱化
3. 学会等名 第22回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正和明哲、矢澤卓也、矢澤華子、石井順、柏木維人、石井芳樹
2. 発表標題 RB1ファミリーの活性化が細胞増殖やEMTに及ぼす影響
3. 学会等名 第59回日本呼吸器病学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口有寿佳、坂口舞、江島一志、矢澤華子、石井順、柏木維人、平松千恵、正和明哲、矢澤卓也
2. 発表標題 CDX2遺伝子導入による腸型肺腺癌細胞作製の試み
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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。
2. 発表標題 POU3F4/4F2遺伝子導入により肺癌細胞に惹起されたダイレクトリプログラミング現象。
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤華子、石井順、平松千恵、宍戸-原由紀子、菅間博、矢澤卓也。
2. 発表標題 POU3F4/4F2遺伝子導入により肺癌細胞に惹起されたダイレクトリプログラミング現象。
3. 学会等名 第21回日本臨床内分泌病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村井陸、辰田功顕、矢澤華子、平松千恵、石井順、柏木維人、岩本雅美、正和明哲、矢澤卓也
2. 発表標題 肺腺癌細胞株におけるCDX2遺伝子感受性の違いについての検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

獨協医科大学病理学
<http://www2.dokkyomed.ac.jp/dep-m/pathology/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 由紀子 (HARA YUKIKO) (40313267)	京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授 (24303)	
研究分担者	矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA) (50251054)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	宮田 千恵 (MIYATA CHIE) (20613847)	聖マリアンナ医科大学・医学部・その他(移行) (32713)	