

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10792

研究課題名（和文）肺NETの治療法開発のためのTrkB/BDNF-Hhクロストーク経路の解析

研究課題名（英文）Analysis of TrkB/BDNF-Hh crosstalk pathway for development of therapeutic strategy against lung NET

研究代表者

中村 勝也（NAKAMURA, Katsuya）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：60585743

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）：小細胞肺癌細胞株SBC-5において、GLI1を抑制してhedgehogシグナルを阻害すると、TRKB発現が亢進した。SBC-5において、GLI1、TRKBを共に阻害すると、増殖能では相加効果が得られたが、浸潤能では相加効果は認められなかった。これは、GLI1抑制により、TRKB発現が亢進する機序が存在するためと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で小細胞肺癌細胞においてHedgehog-TRKBシグナルに負のクロストークが存在する可能性を示した。この結果は、治療オプションが少なく難治性である小細胞肺癌の新規治療薬創生に大きな意義を持つと考えられる。さらに、この結果は小細胞肺癌で活性化する新たなシグナル経路やクロストーク経路の発見につながり、別の新規治療標的分子の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：When GLI1 that is a transcriptional factor of Hedgehog signaling was inhibited in small cell lung cancer cell line, SBC-5, TRKB expression increased. When both GLI1 and TRKB were inhibited in SBC-5, additive effect was observed in proliferation but not in invasion. We think that this result may be due to the mechanism that TRKB expression increased through the inhibition of GLI1.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺NET hedgehog signal TRKB BDNF 小細胞肺癌 増殖 浸潤 治療薬創生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺 NET (小細胞肺癌および大細胞肺癌の一部) は、発育が急速であり、多くの症例が発見時に既に手術不能状態にあり、また他の肺癌に比べ、標準的治療法が未だ確立されていない(Asamura H et al, J Clin Oncol, 2006)。従って、肺癌の予後改善のために、悪性度の高い肺 NET の新規治療法開発は喫緊の課題である。

癌における Tropomyosin-related kinase B(TrkB)発現増強が、神経芽細胞腫(Nakagawara A et al, Mol Cell Biol, 1994)、肺 NET、肝癌(Yang ZF et al, Cancer Res, 2005)、胆嚢癌、胸腺癌(共に論文投稿中)および前立腺癌(Montano X et al, FEBS Lett, 2004)で確認され、予後不良因子としての可能性が報告されている。また、癌において TrkB の ligand である Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)が産生され、autocrine の系で TrkB/BDNF 経路が活性化している可能性が示唆されている。現在まで TrkB の高発現が報告された癌腫は、神経内分泌腫瘍との関連を有する癌腫が多く含まれている。一方、癌細胞における TrkB の機能に関しては、アポトーシス抵抗性(Thomas R et al, Cancer Res, 2005)や転移能(Smit MA et al, Mol Cell Biol, 2009)への関与を示唆する報告が増加しつつある。さらに、我々のこれまでの研究において悪性度の高い肺癌組織における BDNF 発現と TrkB 発現は正の相関を示すことが分かった。これらを総合すると、肺 NET における TrkB をを標的とした治療法開発の実現性は高いと考えられる。

Hedgehog(Hh)シグナルが NET を含む固形癌の悪性形質誘導に関与し治療標的となることが報告されてきた(Park KS, et al, Nat Med, 2011)。Hh 阻害剤は Hh シグナルの起動蛋白である Smoothed(SMO)阻害剤が中心に開発されてきた。しかし、SMO 阻害剤の臨床試験は一定の効果は上げつつあるが、SMO の変異や Hh シグナル系が KRAS、MAP3K、AKT、ERK シグナルなど様々なシグナル系とクロストークすることなどにより、SMO 単独阻害による治療の限界も指摘されるようになってきた。我々は、肺 NET の治療法開発の研究を通じて Hh シグナルを抑制する治療が、逆に TrkB 発現を亢進し、それが Hh シグナル阻害剤の治療効果を低下させている可能性を新たに見出した。従って、Hh シグナル阻害と Hh シグナル阻害により亢進した TrkB 発現の阻害との併用は、肺 NET に対する有効な治療効果増強につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究においては、新規に見出された TrkB/BDNF-Hh クロストーク経路の肺 NET 悪性化(増殖・浸潤・腫瘍形成能亢進)への関与、および、治療標的としての可能性、の2点に焦点をあて検討する。

3. 研究の方法

(1) 本研究においては、小細胞癌細胞株(SBC-3、SBC-5、87-5、S2)および肺大細胞神経内分泌細胞癌細胞株(NCI-H460、NCI-H810)を標的細胞として使用する。Hh シグナルを活性化する系(Hh シグナルのリガンド SHH の添加、SMO および Hh シグナルの転写因子: GLI1 発現プラスミド導入)を用いて、また逆に Hh シグナルを抑制する系(Hh シグナル抑制剤: シクロパミン添加、SMO および GLI1 siRNA の導入)を用いて、TrkB あるいは BDNF の発現の変化を RT-PCR、western blot 法で解析する。

(2) TrkB/BDNF シグナルを活性化する系(BDNF の添加)を用いて、また逆に TrkB/BDNF シグナルを抑制する系(TrkB および BDNF siRNA の導入)を用いて、Hh シグナル系構成分子(SHH、Patched1、SMO、GLI1)の発現に及ぼす影響を RT-PCR、western blot 法で解析する。

(3) 小細胞癌細胞株(SBC-3、SBC-5)および肺大細胞神経内分泌細胞癌細胞株(NCI-H460、NCI-H810)を標的細胞として使用して、Gli1 プラスミド導入あるいは Shh を添加し Hh シグナルを活性化する系、あるいは GLI1/SMO siRNA を用いて、Hh シグナルを抑制する系を用いて、TrkB 発現に関連する分子を DNA アレイ、蛋白チップ、realtime RT-PCR 法を基本として網羅的に解析する。

(4) 候補分子の遺伝子導入、候補遺伝子の阻害(シグナル阻害剤、低分子 RNA 干渉、遺伝子導入)を基本として TrkB 発現と機能変化(増殖能、浸潤能、腫瘍形成能)を MTT アッセイ、コロニー増殖試験、マトリゲル浸潤試験などで解析し、治療標的になり得る候補分子を選別する。

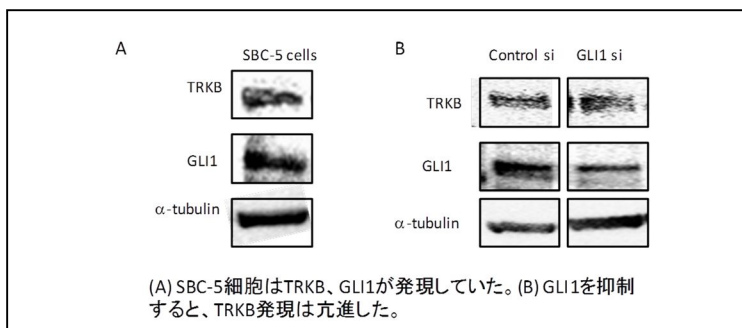
(5) 肺 NET 細胞株を標的細胞とし、選別した候補分子および、それを制御するシグナル経路あるいは分子を抑制する系(分子阻害剤、シグナル阻害剤、siRNA、抗体など)を用いて、肺 NET 細胞の形質変化(増殖、浸潤、腫瘍形成、抗癌剤感受性)を MTT アッセイ、コロニー増殖試験、マトリゲル浸潤試験で検証する。

(6) 肺 NET 細胞株をヌードマウス皮下に移植する系を用いて、候補分子阻害剤あるいはそれを制御するシグナル経路阻害剤を治療薬として使用して、治療効果(増殖抑制、造腫瘍能抑制、浸潤抑制、転移抑制、生存期間延長)を経時的に解析する。さらに、形成された腫瘍を TUNEL 染色法、Ki67、VEGF で染色し、TrkB/BDNF-Hh 両シグナル阻害によるアポトーシス細胞の割合、増殖期の細胞の割合、血管新生の程度を Hh シグナル単独阻害群あるいは TrkB/BDNF シグナル単独阻

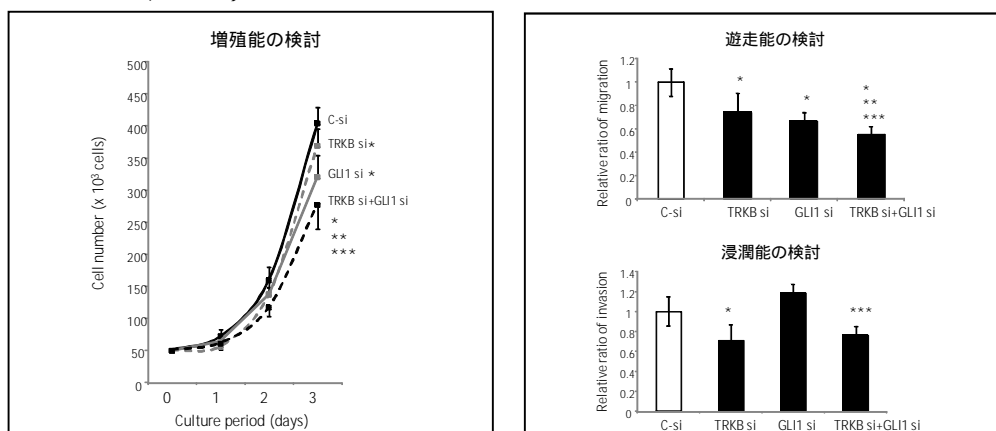
害群と比較する。また、手術時摘出新鮮肺 NET 組織を移植する系を用いて、同様の方法で TrkB/BDNF-Hh 両シグナル阻害による増殖抑制実験を行う。

4. 研究成果

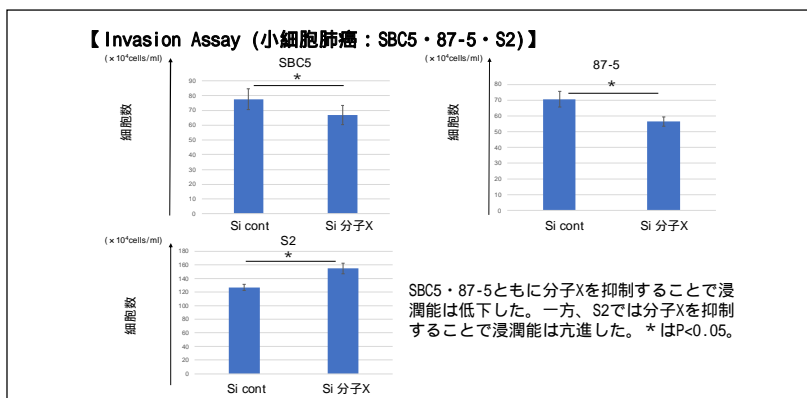
(1) 小細胞肺癌細胞株 SBC-5 が、TRKB、GLI1 を発現していることを western blot 法で確認し、SBC-5 細胞株に TRKB シグナルおよび Hh シグナルが活性化していることを確認した。また、SBC-5 細胞株に GLI1 siRNA を導入して、Hh シグナルを抑制すると TRKB 発現が亢進した。



(2) SBC-5 細胞株に GLI1 siRNA あるいは TRKB siRNA を導入して増殖能を検討した。コントロールと比較して、GLI1 抑制群、TRKB 抑制群共に増殖は有意に低下したが、GLI1、TRKB を同時に抑制した群はさらに増殖能が低下した。また、SBC-5 細胞株に GLI1 siRNA あるいは TRKB siRNA を導入して遊走能、浸潤能を検討した。遊走能の検討では、コントロールと比較して、GLI1 抑制群、TRKB 抑制群共に有意に低下したが、GLI1、TRKB を同時に抑制した群はさらに遊走能が低下した。浸潤能の検討では、コントロールと比較して、TRKB を抑制した群では有意に浸潤能が低下したが、GLI1 を抑制した群では差は認められなかった。また、GLI1、TRKB を同時に抑制した群は TRKB のみを抑制した群と同じ程度であった (下図参照、*は Control si との比較、**は TRKB si との比較、***は GLI1 si との比較を示す。Onishi H, Nakamura K et al, Anticancer Res, 2017)



(3) Hh シグナル、TRKB シグナルと関連する分子を解析中、分子 X が、Hh シグナルと関連する可能性を見出した。分子 X の抑制は、siRNA を用いた。肺 NET の解析は、SCLC に焦点をあて、細胞株 SBC-5・87-5・S2 を使用した。まず、増殖能の検討を細胞数計測により行った。分子 X を抑制すると、2つの細胞株で増殖は有意に低下したが、1つの細胞株では増殖は有意に増加した。次に浸潤能を解析した。増殖と同様に、分子 X を抑制すると、2つの細胞株で浸潤は抑制されたが、1つの細胞株では浸潤は有意に増加した。現在、分子 X の強制発現 (プラスミド作成) を視野に入れて、実験を行うとともに、分子 X がどのシグナル系を介するのか (Hh-MAPK、Hh-PI3k、TrkB-MAPK、TrkB-PI3k など) を解析中である (論文作成中)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamasaki A, Yanai K, Onishi H	4. 巻 In press
2. 論文標題 Hypoxia and pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2020.04.018	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 -
1. 著者名 Saeki K, Onishi H, Koga S, Ichimiya S, Nakayama K, Oyama Y, Kawamoto M, Sakihama K, Yamamoto T, Matsuda R, Miyasaka Y, Nakamura M, Oda Y	4. 巻 11(8)
2. 論文標題 FAM115C could be a novel tumor suppressor associated with prolonged survival in pancreatic cancer patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cancer	6. 最初と最後の頁 2289-2302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/jca.38399	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 -
1. 著者名 Nakamura S, Sadakari Y, Ohtsuka T, Okayama T, Nakashima Y, Gotoh Y, Saeki K, Mori Y, Nakata K, Miyasaka Y, Onishi H, Oda Y, Goggins M, Nakamura M	4. 巻 26(7)
2. 論文標題 Pancreatic juice exosomal microRNAs as sensitive biomarkers for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 2104-2111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07269-z	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 -
1. 著者名 Onishi H, Yamasaki A, Nakamura K, Ichimiya S, Yanai K, Umebayashi M, Nagai S, Morisaki T	4. 巻 39(3)
2. 論文標題 Liprin-alpha4 as a new therapeutic target for SCLC as an upstream mediator of HIF1alpha	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 1179-1184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13227	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 -

1. 著者名 Onishi H, Ichimiya S, Yanai K, Umebayashi M, Nakamura K, Yamasaki A, Imaizumi A, Nagai S, Murahashi M, Ogata H, Morisaki T	4. 巻 38(5)
2. 論文標題 RBPJ and MAML3: Potential therapeutic targets for small cell lung cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4543-4547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12758	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 -

1. 著者名 Onishi H, Yamasaki A, Nakamura K, Ichimiya S, Yanai K, Umebayashi M, Nagai S, Morisaki T	4. 巻 39(3)
2. 論文標題 Liprin-alpha4 as a new therapeutic target for SCLC as an upstream mediator of HIF1alpha	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1179-1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13227	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 -

1. 著者名 Kawamoto M, Onishi H, Ozono K, Yamasaki A, Imaizumi A, Kamakura S, Nakano K, Oda Y, Sumimoto H, Nakamura M.	4. 巻 8 (2 2)
2. 論文標題 Tropomyosin-related kinase B mediated signaling contributes to the induction of malignant phenotype of gallbladder cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 36211 - 36224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.16063.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozono K, Ohishi Y, Onishi H, Nakamura K, Motoshita J, Kato M, Nakanishi Y, Nakamura M, Oda Y.	4. 巻 9 7 (1 1)
2. 論文標題 Brain-derived neurotrophic factor / tropomyosin-related kinase B signaling pathway contributes to the aggressive behavior of lung squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 1332 - 1342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/labinvest.2017.45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onishi H, Nakamura K, Nagai S, Yanai K, Yamasaki A, Kawamoto M, Imaizumi A, Morisaki T	4. 巻 37(9)
2. 論文標題 Hedgehog inhibition upregulates TRK expression to antagonize tumor suppression in small cell lung cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4987-4992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 一宮 脩、大西秀哉、松下章次郎、古賀智子、藤岡 寛、中山和典、大山康博、藤村晶子、中村雅史
2. 発表標題 胆嚢癌におけるHedgehog(Hh)シグナル経路：GLI2-Hhシグナル経路の生物学的意義の解析 (第2報)
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀智子、大西秀哉、一宮 脩、藤岡 寛、中山和典、藤村晶子、大山康博、中村雅史
2. 発表標題 小細胞肺癌、胸腺癌におけるチロシン脱リン酸化酵素PTPN3の生物学的意義の網羅的解析
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎章生、一宮 脩、中山和典、大山康博、藤村晶子、大西秀哉
2. 発表標題 低酸素環境で発現亢進するLiprin-a4を標的とした難治性固形癌に対する包括的治療法開発
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西秀哉、佐伯 潔、山崎章生、中村雅史
2. 発表標題 FAM115cの膵癌予後予測バイオマーカーとしての意義
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎章生、大西秀哉、川元 真、佐伯 潔、中村雅史、
2. 発表標題 新規治療法開発のための癌低酸素環境における癌病態解析
3. 学会等名 第40回 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村勝也、大西秀哉、中村雅史
2. 発表標題 RBPJおよびMAML3の小細胞肺癌の新規治療標的分子としての可能性
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一宮 脩、大西秀哉、松下章次郎、中山和典、大山康博、藤村晶子、今泉 晃、中村雅史
2. 発表標題 胆嚢癌における非古典的Hedgehog(Hh)シグナル経路：GLI2-Hhシグナル経路を標的とした治療法開発
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎章生、大西秀哉、中村雅史
2. 発表標題 低酸素環境を考慮した小細胞肺癌の新規治療法開発
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村勝也、大西秀哉、尾立西市、大園慶吾、梁井公輔、中村雅史
2. 発表標題 肺癌における神経栄養因子受容体TrkBの治療標的としての可能性の検討
3. 学会等名 第31回 日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎章生、大西秀哉、中山和典、大山康博、藤村晶子、川元 真、中村雅史
2. 発表標題 低酸素環境下の肺小細胞肺癌における足場タンパク質Liprin a4の役割に関する検討
3. 学会等名 第31回 日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura K, Onishi H, Odate S, Ozono K, Yanai K, Nakamura M
2. 発表標題 TrkB/BDNF signaling pathway could be a therapeutic target for lung cancer
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Onishi H, Yamasaki A, Nakamura M
2. 発表標題 RBPJ could be a new therapeutic target for refractory solid neuroendocrine type tumors
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西秀哉、山崎章生、川元 真、今泉 晃、大山康博、藤村晶子、中山和典、今泉 晃
2. 発表標題 小細胞肺癌におけるRBPJおよびMAML3の生物学的意義解析
3. 学会等名 第27回 日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西秀哉、中村勝也、梁井公輔、川元 真、大山康博、中山和典、山崎章生、三好 圭、中村雅史
2. 発表標題 TrkBシグナルとHedgehogシグナルの負のクロストークを考慮した小細胞肺癌に対する新たな治療法の開発
3. 学会等名 第118回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Onishi H, Yamasaki A, Kawamoto M,
2. 発表標題 Liprin alpha4 contributes to increased proliferation and decreased chemosensitivity under hypoxia for small cell lung cancer as a downstream mediator of HIF-1a
3. 学会等名 ESMO 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西秀哉、中村勝也、梁井公輔、川元 真、藤村晶子、大山康弘、中山和典、山崎章生、中村雅史
2. 発表標題 HedgehogシグナルとTrkBシグナルとのクロストークの視点に立った小細胞肺癌に対する新規治療法開発
3. 学会等名 第30回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川元 真、大西秀哉、森崎 隆、中村雅史
2. 発表標題 選択的汎Trk阻害剤 (ONO-8560570) は胆嚢癌に対し抗腫瘍効果を示すか
3. 学会等名 第21回バイオ治療法研究会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院医学研究院 腫瘍制御学分野 ホームページ http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/ 九州大学大学院医学研究院 腫瘍制御学分野 http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/

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	中村 雅史 (NAKAMURA Masafumi) (30372741)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大西 秀哉 (ONISHI Hideya) (30553276)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	三好 圭 (MIYOSHI Kei) (70755272)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	