

令和元年6月21日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16050

研究課題名(和文) Club細胞の直接運命転換に着目した肺腺癌の組織型転換の分子機構の解明

研究課題名(英文) Defining the mechanism underlying transformation from adenocarcinoma to small cell lung carcinoma focused on club cell fate conversion

研究代表者

松尾 顕 (Matsuo, Akira)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員

研究者番号：50735074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌の分子標的治療後再発機序に、肺腺癌から小細胞癌への組織型転換が知られているが、その分子機構は十分に解明されていない。本研究において、Hes1の不活性化が、肺腺癌の起源細胞の一つであるClub細胞から小細胞癌の起源細胞である神経内分泌細胞への運命転換を制御することを示した。細胞系譜解析により、Club細胞は神経内分泌細胞へ分化していた。しかし、Club細胞の神経内分泌細胞への分化能は、発生を経て失われた。発生期と成体期のHes1不活性化Club細胞は、神経内分泌細胞へ分化していた。これらの結果は、Hes1不活性化が、Club細胞から神経内分泌細胞への運命転換を制御することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子標的薬耐性獲得機構の一つとして、腺癌が小細胞癌に転換する症例が報告されており、その転換機構は不明な点が大きかった。今回、本研究において、肺腺癌の起源細胞の一つであるClub細胞から神経内分泌細胞への運命転換にHes1の不活性化が関与していることが明らかになった。本研究の知見は、恒常性及び癌におけるClub細胞の直接運命転換の理解及び組織型転換癌(耐性獲得癌)に対する新たな分子標的薬開発の基盤となる。さらに、組織型転換癌及び混合型癌における異なる組織型癌を生み出す癌起源細胞の分子機構解明へ貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Transformation of EGFR mutant lung adenocarcinoma to small cell lung carcinoma is known to one of the major resistant mechanisms for EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs). However, little is known about the mechanism underlying the transformation of adenocarcinoma to small cell lung carcinoma. Here, we show that club cells (a cell origin of adenocarcinoma) convert into neuroendocrine cells (a cell origin of small cell lung carcinoma) in the developing and adult lung. Using stringent lineage tracing, club cells gave rise to neuroendocrine cells before E14.5. But after E14.5, we did not observe lineage-labeled cells expressing the neuroendocrine cell maker CGRP, suggesting that club cells lost their ability to generate neuroendocrine cells. Furthermore, we found that Hes1 loss club cells convert into neuroendocrine cells after E14.5 and adulthood. Taken together, these results reveal that Hes1 inactivation can induce the lineage conversion of club cells into neuroendocrine cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：運命転換 幹細胞 肺癌

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体（*EGFR*）遺伝子変異型肺腺癌の多数の症例に対して、分子標的薬による治療が功を奏してきた。しかし、分子標的薬に対する耐性獲得による再発例が報告され、現在、耐性獲得癌に対する治療方法の確立が急務である。耐性獲得の分子機構は十分に解明されていないが、肺腺癌から小細胞癌への組織型転換が考えられている。耐性獲得癌（肺腺癌から小細胞癌）において、小細胞癌で高頻度に不活性化されている遺伝子（*RB1*など）が、同様に不活性化されていることが報告された(Niederst et al., 2015)。

耐性獲得（組織型転換）癌発症の分子機構を理解するために、経時的に標的病変を追跡し解析する必要がある。ヒト疾患検体では、小細胞癌の転移が早いためサンプルが得にくく、経時的に標的病変を追跡するのは不適である。そのため、遺伝子改変マウスを用いた解析が望まれている。しかしながら、これまで *EGFR* 遺伝子変異肺腺癌から小細胞癌に転換する転換癌マウスモデルは報告がなく、組織型転換癌の分子機構の解明は進んでいない。

(1) *Hes1* は非神経内分泌細胞と神経内分泌細胞の運命を決める

マウス肺の発生過程において、肺上皮前駆細胞から非神経内分泌細胞（Club 細胞含む）と神経内分泌細胞が分化する。この分化制御因子として、私達は Notch シグナルの標的遺伝子 *Hes1* を同定した(Ito et al., 2000) (図 1 A1、A2)。非神経内分泌細胞では、*Hes1* 遺伝子発現により、神経内分泌細胞系譜決定因子 *Ascl1* 遺伝子発現が抑制されている。一方で、神経内分泌細胞では、*Hes1* 遺伝子の発現抑制により、*Ascl1* 遺伝子の発現が亢進し、神経内分泌細胞に決定づけられている (図 1 A1、A2)。

(2) *Hes1* 遺伝子の不活性化は、Club 細胞から神経内分泌細胞への直接運命転換を引き起こす

申請者は、図 1 A の知見をもとに、マウス成体内において、Club 細胞で *Hes1* 遺伝子を不活性化し、直接運命転換を試みたところ、Club 細胞から神経内分泌細胞（induced neuroendocrine cell, iNE 細胞）の転換に成功した (図 1 B、図 2、図 3)。

(3) 癌の環境は、細胞の運命転換を引き起こす

癌の環境が、他細胞系譜への運命転換を誘導し、組織型が転換することが、マウス肝臓とマウス表皮で報告された (Sekiya and Suzuki, 2012; Youssef et al., 2012)。

以上より、マウスモデルを用いて、肺腺癌の小細胞癌への組織型転換は、分子標的治療により、Club 細胞（または肺腺癌）において *Hes1* 遺伝子（ヒトでは *HES1* 遺伝子）の発現が変化し、その結果、*Ascl1* 遺伝子（ヒトでは *ASCL1* 遺伝子）の発現が亢進し、神経内分泌細胞（または小細胞癌）へ直接運命転換し、小細胞癌を発症したものであるという仮説に至った (図 1 C)。

2. 研究の目的

組織型転換癌（耐性獲得癌）の分子機構の解明を目的として、*Hes1* 遺伝子の不活性化が Club 細胞（もしくは肺腺癌）から神経内分泌細胞（もしくは小細胞癌）への直接運命転換を制御しているか評価する。

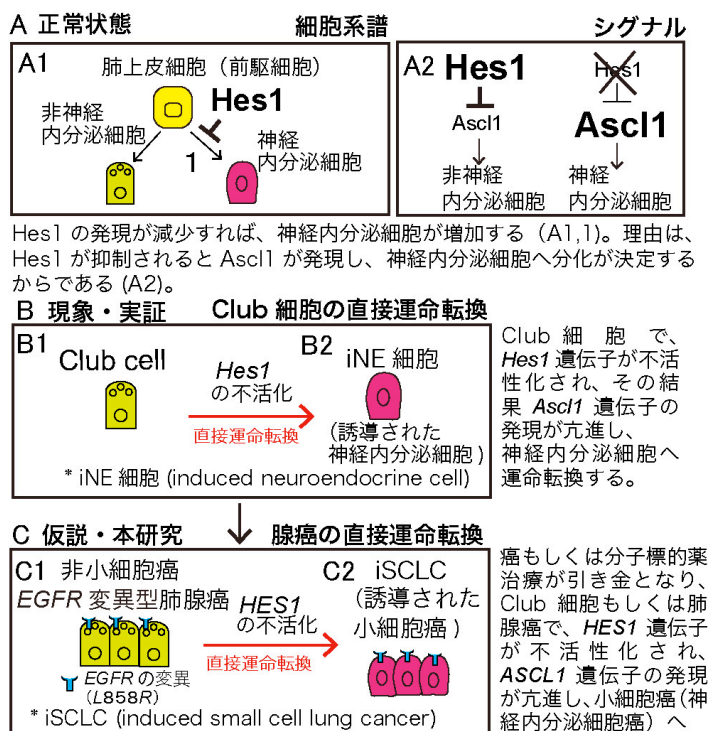


図 1 本研究における直接運命転換機構の仮説
Hes1 遺伝子の不活性化による *Ascl1* 遺伝子の発現亢進

3.研究の方法

Club 細胞の直接運命転換の評価は、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析実験で評価した。

(1) Club 細胞から神経内分泌細胞への直接運命転換を評価する

マウス発生期における Club 細胞の神経内分泌細胞系譜への運命転換機構の分子機構を理解する目的で、Club 細胞が神経内分泌細胞 (iNE 細胞) へ直接運命転換するか評価した。さらに、*Hes1* 遺伝子の不活性化が、Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換を制御するかを検証するための Club 細胞運命転換マウスを作製し、*Hes1* 遺伝子が不活性化された Club 細胞の細胞系譜解析を行った。

(2) マウス生体内で、腺癌から直接運命転換により、小細胞癌を誘導すを確立する

転換癌の発症は、肺腺癌から小細胞癌への直接運命転換によるものであるか評価した。小細胞癌の転換には、*Rb1* 遺伝子の不活性化が関与していることが知られているので、マウスモデルにおいて、Club 細胞運命転換マウス、*EGFR L858R* 遺伝子変異型肺腺癌マウス及び *Rb1 fl/fl* マウス (Cre 発現細胞特異的に *Rb1* 遺伝子を欠損する) を交配し、Club 細胞及び肺腺癌が小細胞癌に転換するか検証可能なマウスを作製し、細胞系譜解析を行った。さらに、*Hes1* 遺伝子の不活性化による Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換機構が肺腺癌の小細胞転換に関与するか肺腺癌運命転換マウスを作製し、検証を試みる。

4.研究成果 (1) Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換を評価した。まず発生肺及び成体肺において、肺腺癌の起源細胞の一つである Club 細胞と小細胞癌の起源細胞である神経内分泌細胞の細胞系譜関係を評価した。この目的のために、Club 細胞を特異的に標識する *Scgb1a1-rtTA; tetO-cre; R26R-tdTomato* マウスを用いて、細胞系譜解析を行った。その結果、胎生 13.5 日目までの Club 細胞は神経内分泌細胞に分化することが明らかになった。その分化能は発生が進んだ胎生 14.5 日目以降及び成体では消失していた。よって、我々の実験系において、Club 細胞は、神経内分泌細胞分化能を有するが、発生とともにその分化能は失われることが示唆された。神経内分泌細胞の中には、一定箇所に集まり、神経内分泌細胞クラスター (Neuroepithelial bodies, NEBs) を形成することが知られている (Kuo and Krasnow, 2015; Noguchi et al., 2015)。そこで、Club 細胞由来の神経内分泌細胞を、1 細胞レベルで細胞系譜解析可能な *Scgb1a1-rtTA; tetO-cre; R26R-Confetti* マウスを作製した。このマウスは、4 色 (nGFP, YFP, RFP, mCFP) の蛍光タンパク質コードしている遺伝子を搭載し、Cre/*loxP* システムによる組み替えにより、4 色のうち 1 色を発色することが可能である。Club 細胞の 1 細胞系譜解析を行ったところ、iNE 細胞による NEB はモザイク状の標識をしていた。この標識パターンから、iNE 細胞が内在性の神経内分泌細胞と同様に集まって NEB を形成したことが示唆された。

(2) マウス肺の発生過程において、肺上皮前駆細胞から、非神経内分泌細胞 (Club 細胞含む) と神経内分泌細胞が分化する。この時、Notch シグナルが不活性化されることにより、肺上皮前駆細胞から、神経内分泌細胞が分化する (Rock and Hogan, 2011) そこで、Notch シグナルの不活性化が、Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換に関与しているか検証した。この目的のために、*Scgb1a1-rtTA; tetO-cre;*

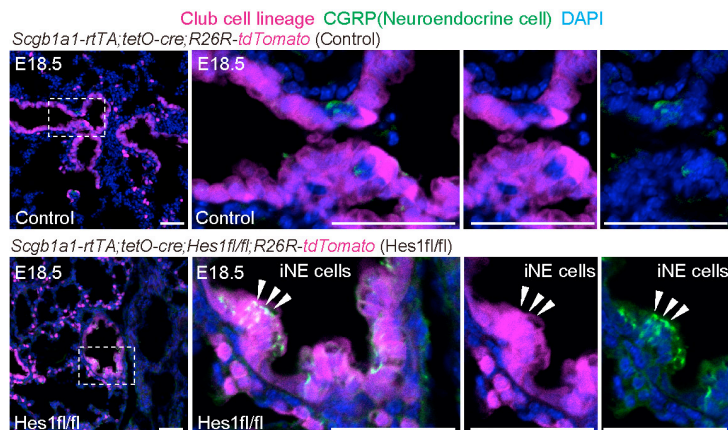


図2 *Hes1* 遺伝子不活性化は Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換を制御する。下段の矢頭は、iNE 細胞を示す。

Hes1 fl/fl; R26R-tdTomato マウスを作製した。Notch シグナル標的遺伝子 *Hes1* が不活性化された Club 細胞の細胞系譜解析を行ったところ、胎生期及び成体期の Club

細胞は、神経内分泌細胞へ運命転換した(iNE 細胞、induced Neuroendocrine cell)。この結果により、*Hes1* 遺伝子の不活性化が Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換をリプログラミングするのに重要であることが示唆された (図2は発生期の胎生 14.5-15.5 日目の Club 細胞を運命転換させ、胎生 18.5 日目の iNE 細胞である。図3は成体 Club 細胞の運命転換により生じた iNE 細胞である。)

(3) 肺小細胞癌において、*TP53* 遺伝子と *RB1* 遺伝子の不活性化が見られる (George et al., 2015)。マウス肺発生において、*Rb1* 遺伝子不活性化が神経内分泌細胞分化を制御すること関係性が報告されている (Wikenheiser-Brokamp, 2004)。そこで、*Scgb1a1rt-TA;tetO-cre;R*

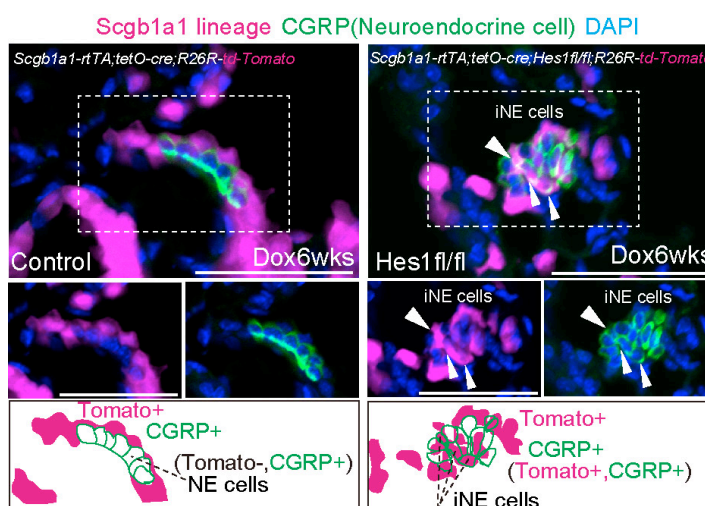


図3 *Hes1* 遺伝子不活性化は成体の Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換を制御する 下段の矢頭は、iNE 細胞を示す。

b1fl/fl; R26R-tdTomato マウスを用いて、Club 細胞特異的に *Rb1* 遺伝子を不活性化し、細胞系譜を解析した。Club 細胞由来の神経内分泌細胞は胎生 18.5 日目の発生肺に確認できた。しかし、我々の実験系を用いた解析の結果、Club 細胞から、神経内分泌細胞への運命転換には、*Hes1* 遺伝子不活性化の方が *Rb1* 遺伝子不活性化よりも優位的に関与していることが示唆された。本研究により、Club 細胞から神経内分泌細胞への運命転換マウスの作製に成功した。現在、運命転換マウスを用いて、直接運命転換中の Club 細胞の細胞系譜解析及び単 1 細胞 RNA-Seq を用いた遺伝子発現解析を行い、転換過程の遺伝子変化を明らかにし、直接運命転換の分子機構の解明を行う。現在、単 1 細胞 RNA-Seq を用いて解析のため、胎児肺からの Club 細胞、NE 細胞及び iNE 細胞のセルソーターを用いた細胞単離に成功している。

(4) 近年、肺腺癌の分子標的薬治療後再発機構に、肺腺癌の小細胞癌への組織型転換が報告されている。本研究申請時において、組織型転換症例の中に、特に、*EGFR L858R* 遺伝子変異型肺腺癌から *RB1* 遺伝子欠損が原因で、小細胞癌へ転換する症例が報告された (Niederst et al., 2015)。そこで、マウスモデルを用いて、*Scgb1a1-rtTA;tetO-cre; tetO-EGFR L858R ;Rb1 fl/fl; R26R-tdTomato* マウスを用いて、組織型転換症例の再現を試みた。このマウスは、Dox 水添加により、Club 細胞で (*Scgb1a1-rtTA,tet-Ocre*)、*EGFR L858R* 遺伝子変異型肺腺癌が誘導され (*tetO-EGFR L858R*)、*Rb1* 遺伝子 (マウス) の不活性化による直接運命転換 (*Rb1 fl/fl*) が起こり、その細胞系譜を追跡可能である (*R26R-tdTomato*)。我々が試みた限りでは、小細胞癌は、発見できなかったが、Tomato 標識された神経内分泌細胞を発見した。さらに、その一部は、過形成 (hyperplasia) を示していた。我々の実験系を基にして、肺腺癌から小細胞癌への組織型転換には、*Rb1* 以外の遺伝子の関与の可能性を考えた。

小細胞癌と Notch シグナルの関係が報告された (George et al., 2015; Lim et al., 2017)。そこで、肺腺癌の小細胞癌への運命転換にも、*HES1* 遺伝子の不活性化が関与しているかを評価する。この目的のために、現在、*Scgb1a1-rtTA;tetO-cre; tetO-EGFR L858R ;Hes1 fl/fl; R26R-tdTomato* マウスの作製を行っている。このマウスは、Dox 水添加により、Club 細胞で (*Scgb1a1-rtTA,tet-Ocre*)、*EGFR L858R* 遺伝子変異型肺腺癌が誘導され (*tetO-EGFR L858R*)、*Hes1* 遺伝子の不活性化による直接運命転換 (*Hes1 fl/fl*) が起こり、その細胞系譜を追跡できる (*R26R-tdTomato*)。現在、*Hes1* 遺伝子の不活性化による Club 細胞 (肺腺癌) から小細胞癌への運命転換を解析中である。

肺腺癌から小細胞癌へ転換する症例において、小細胞癌で変異している *TP53* 遺伝子及び *RB1* 遺伝子の変異が報告された (Lee et al., 2017)。当初は、マウスモデルに

において、*Rb1* 遺伝子不活性化により肺腺癌から小細胞癌への組織型転換が起こるので
はと仮説を立てていた。現在では、最新の疾患報告及び本申請の実験結果を基にして、
肺腺癌から小細胞癌への組織型転換には、*RB1* 遺伝子不活性化及び *TRP53* 遺伝子不
活性化が重要であるという仮説を発展させている。現在、マウスモデルにおいて Club
細胞運命転換マウス (*Scgb1a1rt-TA;tetO-cre;Hes1fl/fl;R26R-tdTomato*)、*Trp53*
遺伝子欠損マウス、*Rb1fl/fl* マウスを組み合わせ、肺腺癌から小細胞癌への組織型
転換の分子機構解明を目指している。

5.主な発表論文等

(雑誌論文) (計 4 件)

(1)Seiji, Y., Ito, T., Nakamura, Y., Nakaishi-Fukuchi, Y., **Matsuo, A.**, Sato, N., and
Nogawa, H. (2019). Alveolus-like organoid from isolated tip epithelium of embryonic
mouse lung. *Hum Cell* 32, 103-113.

(2)Yamada, T., Ohta, K., Motooka, Y., Fujino, K., Kudoh, S., Tenjin, Y., Sato, Y., **Matsuo,
A.**, Ikeda, K., Suzuki, M., et al. (2019). Significance of Tsukushi in lung cancer. *Lung
Cancer* 131, 104-111.

(3)Sato, Y., **Matsuo, A.**, Kudoh, S., Fang, L., Hasegawa, K., Shinmyo, Y., and Ito, T.
(2018). Expression of Draxin in Lung Carcinomas. *Acta histochemica et cytochemica*
51, 53-62.

(4)Kameyama, H., Kudoh, S., Hatakeyama, J., **Matuo, A.**, and Ito, T. (2017).
Significance of Stat3 Signaling in Epithelial Cell Differentiation of Fetal Mouse Lungs.
Acta histochemica et cytochemica 50, 1-9.

(学会発表) (計 8 件)

(1)**Matsuo A**, Ito T

Club cell dedifferentiation induced by Notch inactivation
第 52 回発生生物学会大会 2018 年 5 月 15・16 日、大阪

(2)**松尾 顕**、伊藤 隆明

Club cell からの基底細胞への基底細胞への脱分化機構の解明
第 41 回分子生物学会大会、2018 年 11 月 30 日、横浜

(3)**松尾 顕**、伊藤 隆明

Club cell からの神経内分泌細胞への運命転換、
第 107 回病理学会総会 2018(口頭発表)、北海道

(4)**Matsuo A**, Ito T

Defining the mechanism underlying dedifferentiation of committed secretory cells
into basal stem cells.
第 51 回発生生物学会大会 2018 年 5 月 8 日、東京

(5)**松尾 顕**、伊藤 隆明

Club 細胞の可塑性を明らかにする、
第 40 回分子生物学会大会 2017 年 12 月 7 日、神戸

(6)**Matsuo A**

Defining the mechanism of club cell plasticity in lung development, homeostasis and
cancer.
第 1 回若手呼吸器研究者による研究会、2017、東京 (招待講演講演)

(7)**Matsuo A**

Defining the mechanism of Club cell plasticity in the lifetime by genetically engineered mouse models. (マウス遺伝子工学技術を用いて、Club 細胞の可塑性を明らかにする)

第 8 回 中九州 Research Retreat、2017 年 7 月 15 日、宮崎 (口頭発表)

(8)松尾 顕

肺発生及び恒常性維持における Club 細胞の可塑性、

第 3 回呼吸器基礎研究基礎研究を加速するための若手研究会議、細胞・分子生物学学術部会、

第 57 回日本呼吸器学会学術講演会、2017 年 4 月 21 日、東京 (口頭発表)

(図書) (計 件)

該当なし

(産業財産権)

○出願状況 (計 件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

(その他)

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/patho1/outline.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名: 松尾 顕

ローマ字氏名: MATSUO Akira

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 生命科学研究部

職名: 研究員

研究者番号 (8 桁): 50735074

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます