

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15091

研究課題名(和文) DLK遺伝子は肺癌における神経内分泌形質発現のトリガーか

研究課題名(英文) Is DLK gene a trigger for neuroendocrine differentiation of lung cancer?

研究代表者

石井 順 (Ishii, Jun)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80749599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の悪性化にはNeuro-Endocrine (NE) 形質が関与すると言われる。我々はNE形質が3/4型POU遺伝子により惹起されることを明らかにしたが、その発現機序は不明であった。研究代表者はNE形質がNotch受容体シグナルに抑制されること、またNE形質を有する肺癌細胞がNotchシグナルの抑制性リガンド・DLK1を高発現する点に着目し、「DLK1 Notch抑制 3/4型POU型転写因子 NE形質発現」というカスケードが存在すると考え検討した。その結果、DLK1発現がNE形質発現に与える影響は限定的であるが、増殖因子を介した別のルートから肺癌細胞の増殖に深く関与することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は致死率の高い悪性腫瘍であり、その悪性化に関与するNE形質の発現機序や、増殖機序の解明は急務である。本研究により、NE形質を有する肺癌が高度に発現するDLK1が、NE形質やその誘導因子である3/4型POU遺伝子発現に大きくは影響しないことが明らかとなり、NE形質発現メカニズムの全貌解明に一步近づいた。またMinor populationであるDLK1強発現肺癌細胞が、IGF2やNTSといった増殖因子の発現を介してNE形質を有する肺癌細胞集団全体の増殖に寄与する可能性が明らかにされた。本研究の発展により、増殖因子あるいはその供給細胞を標的とした新規治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuro-Endocrine differentiation (NE-def) is involved in the malignancy of lung cancer. We have shown that the NE-def is triggered by the class 3/4 POU genes, but its expression mechanism is unknown. In this study we focused on the fact that the NE-def is suppressed by the Notch receptor signal, and that lung cancer cells with the NE-def highly express the Notch signal inhibitory ligand DLK1. From the above, we hypothesized and studied that there may be a cascade that "DLK1 Notch inhibition 3/4 POU genes NE-def expression". As a result, it was found that DLK1 expression has a limited effect on NE-def, but it is deeply involved in the growth of lung cancer cells by another route mediated by growth factors.

研究分野：実験病理学

キーワード：神経内分泌形質 肺癌 悪性形質 DLK1 増殖因子 増殖活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日、肺癌は世界で最も致死率の高い悪性腫瘍であり、特に神経内分泌 (Neuro-Endocrine、NE) 形質を発現する肺癌は、非発現型の肺癌に比して予後不良と言われる¹。この NE 形質の発現は、肺癌の 4 大組織型の 1 つである小細胞肺癌の特徴であるが、腺癌や扁平上皮癌、大細胞癌といったその他の肺癌組織型の 20%程度においても種々の程度で認められる。また近年、分子標的治療により一度は縮小した肺腺癌が、NE 形質を発現する小細胞癌へと形質転換を起こして再発する例が相次いで報告された²。こうした事実は、肺癌の予後悪化因子である NE 形質発現が、条件が揃うことで非 NE 形質肺癌にも発現し得ることを示唆しており、そのメカニズムの解明は急務であるといえる。

研究代表者らはこれまで、NE 形質を有する肺癌細胞が、3 および 4 型に分類される 7 種類の POU 型遺伝子 (*POU3F1* および *POU3F2*, *POU3F3*, *POU3F4*, *POU4F1*, *POU4F2*, *POU4F3*) を高度に発現することを明らかにした。また肺癌細胞における NE 形質が、3/4 型 POU 遺伝子により誘導されること、さらに 3/4 型 POU 遺伝子が肺癌細胞に NE 形質を導く分子カスケードの上位に位置することを明らかにしてきた^{3,4}。一方で、3/4 型 POU 遺伝子群が NE 形質を有する肺癌細胞で特異的に発現する機序は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、NE 形質を有する肺癌における NE 形質発現が、Notch 受容体シグナルに抑制されるという先行研究結果と⁵、NE 形質を有する肺癌細胞が Notch シグナルの抑制性リガンド・*Delta like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1)* 遺伝子を高発現するという、予備実験および遺伝子発現データベース解析結果に着目した。そして NE 形質を発現する肺癌細胞において、「DLK1 発現 Notch シグナル抑制 3/4 型 POU 遺伝子発現 NE 形質発現」というカスケードが存在するとの仮説に至った。この仮説を検証するため、以下の目的で研究を行った。

- (1) NE 形質を有する肺癌が高度に発現する DLK1 が、3/4 型 POU 遺伝子発現および NE 形質発現に与える影響を明らかにする。
- (2) DLK1 高発現が NE 形質を発現する肺癌細胞 (小細胞肺癌細胞) に与える影響を明らかにする。

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 DLK1 および Notch シグナル関連遺伝子の発現解析：

正常不死化気道上皮細胞 2 株および NE 形質非発現肺癌細胞 13 株 (腺癌 6 株、扁平上皮癌 3 株、大細胞癌 4 株)、NE 形質発現肺癌細胞 (小細胞癌) 9 株における DLK1 および DLK2、Delta like canonical Notch ligand (DLL) 1、DLL3、DLL4、Jagged canonical Notch ligand (JAG) 1、JAG2、Notch receptor (NOTCH) 2、NOTCH3 の発現を RT-PCR 法を用いて解析した。また小細胞肺癌細胞株における DLK1 タンパクの発現を Western Blot 法および免疫組織化学を用いて解析した。

(2) 小細胞肺癌細胞株 (TKB12、TKB15、Lu135) に対する *DLK1* 遺伝子のノックアウト：

DLK1 遺伝子を標的とした guide-RNA と、CRISPR-Cas9 を同時に発現するベクターを構築し、DLK1 を高度に発現する小細胞肺癌細胞株 (TKB12、TKB15、Lu135) に遺伝子導入することで、*DLK1* 遺伝子のノックアウト株を樹立した。ノックアウトの成否を遺伝子シーケンス法および Western Blot 法により確認した。

(3) *DLK1* 遺伝子プロモーター+赤色蛍光遺伝子コンストラクトを用いた DLK1 高発現細胞のソーティング：

DLK1 遺伝子のプロモーター領域 (転写開始点を+1とした際の-788~+1) をクローニングし、その下流に赤色蛍光遺伝子 tdTomato を連結したベクターを構築した。このベクターを小細胞肺癌細胞株 (TKB15、Lu135) に導入し、DLK1 を特に高度に発現する小細胞肺癌細胞を赤色蛍光にて標識した。その後、赤色蛍光を強く発する Living cell をセルソーターにてソーティングし、DLK1 を高発現する小細胞肺癌細胞集団を得た。

(4) *DLK1* 遺伝子発現を変化させた小細胞肺癌細胞株における 3/4 型 POU 遺伝子および NE 形質マーカー遺伝子の発現解析：

樹立した *DLK1* 遺伝子ノックアウト小細胞肺癌細胞株および *DLK1* 遺伝子プロモーター+赤色蛍光遺伝子でソーティングした小細胞肺癌細胞株における、3/4 型 POU 遺伝子および NE 形質マーカー遺伝子 (*CHGA*, *SYP*, *NCAM1*) の発現を q (quantitative) RT-PCR 法にて解析した。

(5) *DLK1* 遺伝子ノックアウトが小細胞肺癌細胞株の増殖に与える影響の解析：

DLK1 遺伝子ノックアウト小細胞肺癌細胞株の増殖速度を、トリパンプルーを用いた生細胞数計測法により解析した。また同細胞の増殖活性を MTS アッセイにより解析した。

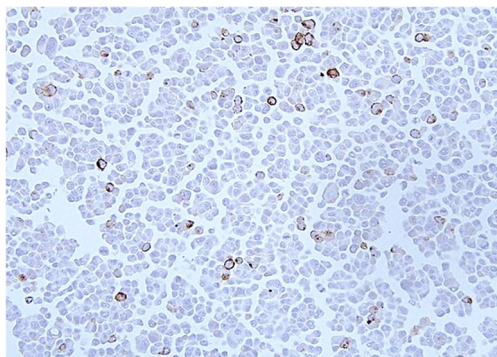
(6) *DLK1* 遺伝子ノックアウトが小細胞肺癌細胞株の増殖因子関連遺伝子の発現に与える影響の解析：

DLK1 遺伝子をノックアウトした小細胞肺癌細胞株を対象に、小細胞肺癌の増殖因子として報告のある遺伝子⁶ (*GRP*, *IGF1*, *IGF2*, *POMC*, *NTS*, *GAL*, *SST*, *CCK*, *TF*) の発現を RT-PCR 法および qRT-PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 肺癌細胞株における *DLK1* および Notch シグナル関連遺伝子の発現を RT-PCR 法で解析したところ、NE 形質を有する小細胞肺癌細胞は、*DLK1* を含めた Notch シグナルのリガンド遺伝子 (*DLL1*, *DLL3*, *DLL4*) を高度に発現する傾向がみられた。中でも *DLK1* は、NE 形質を有さない肺癌細胞株では発現がほとんど認められず、*DLK1* 発現と NE 形質発現に高い相関がみられた。続いて小細胞肺癌細胞株における *DLK1* タンパク発現を Western blot 法および免疫組織化学により解析すると、小細胞肺癌細胞株は *DLK1* タンパク質を高度に発現しており、また *DLK1* 高発現細胞は小細胞肺癌細胞集団中のごく一部 (~5%) であることが明らかとなった [図 1]。

[図 1] 小細胞肺癌細胞株 TKB15 の *DLK1* 免疫組織化学



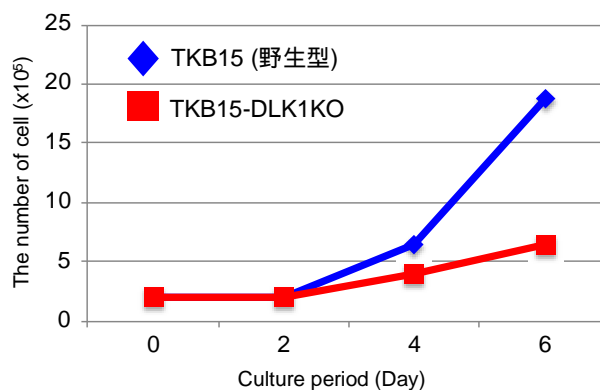
(2) 小細胞肺癌細胞株 (TKB12、TKB15、Lu135) に対し、*DLK1* 遺伝子を標的とする guide-RNA および CRISPR-Cas9 を発現するベクターを導入することで、*DLK1* をノックアウトした小細胞肺癌細胞株を樹立することに成功した (TKB12-DLK1KO、TKB15-DLK1KO、Lu135-DLK1KO)。*DLK1* ノックアウト細胞よりゲノム DNA を抽出して *DLK1* 遺伝子配列を解読し、機能喪失を誘導すると考えられる遺伝子編集が起きていることを確認した。また *DLK1* ノックアウト細胞より抽出したタンパク質において、*DLK1* 発現を示すシグナルの消失を確認した。

(3) *DLK1* 遺伝子プロモーター+tdTomato 遺伝子を小細胞肺癌細胞株 (TKB15、Lu135) に導入したところ、細胞全体のうち一部の細胞 (~5%) が強い赤色蛍光を示した。一方、同じ遺伝子コンストラクトを *DLK1* 発現のみられない細胞株に導入すると、小細胞肺癌細胞株と同等の赤色蛍光を発する細胞は認められなかった。小細胞肺癌細胞株で認められた強い赤色蛍光を発する細胞の割合は、小細胞肺癌細胞株が免疫組織化学で示した陽性細胞の割合と同等であった。このことから、*DLK1* 遺伝子プロモーター+tdTomato 遺伝子の導入により、小細胞肺癌細胞集団中の *DLK1* 高発現細胞が標識された可能性が考えられた。その後、*DLK1* 高発現細胞をソーティングし、強い赤色蛍光を発する細胞が細胞集団中の大多数を占める小細胞肺癌細胞株を得た。

(4) *DLK1* ノックアウト小細胞肺癌細胞株における 3/4 型 POU 遺伝子および NE 形質マーカー遺伝子発現を qRT-PCR で解析したところ、野生型株と比較して有意な発現変化は認められなかった。また *DLK1* 遺伝子プロモーター+tdTomato 遺伝子でソーティングした強蛍光細胞においては、野生型に比して幼弱な神経細胞に発現する *ASCL1* 発現が高い傾向がみられたが、その他の遺伝子に関しては有意な発現変化が認められなかった。この結果より、小細胞肺癌細胞で高度に発現する *DLK1* が、3/4 型 POU 遺伝子発現および神経内分泌形質発現に与える影響は大きくないことが示唆された。

(5) *DLK1* 遺伝子ノックアウトが小細胞肺癌細胞株の増殖に与える影響を増殖アッセイにて解析したところ、*DLK1* 遺伝子ノックアウト株 (TKB12-DLK1KO、TKB15-DLK1KO、Lu135-DLK1KO) はいずれも、野生型株に比して増殖速度および増殖活性が低下していた [図 2]。また小細胞肺癌の増殖に関わるとされる遺伝子発現を解析すると、*DLK1* 遺伝子ノックアウト株では *cyclin D1* (*CCND1*) 遺伝子発現が減少していた。このことから、*DLK1* 発現は小細胞肺癌細胞株の増殖亢進に寄与している可能性が考えられた。

[図 2] *DLK1* 遺伝子をノックアウトした TKB15 の増殖アッセイ



(6) *DLK1* を高発現する population は小細胞肺癌細胞集団中の 5%程度に留まる一方で、*DLK1* の高発現は細胞集団全体の増殖に寄与すると考えられたことから、*DLK1* 高発現細胞が何らかの増殖因子を産生している可能性を考えた。*DLK1* 遺伝子ノックアウト小細胞肺癌細胞株を対象に、小細胞肺癌の増殖因子として報告のある遺伝子の発現を RT-PCR 法および qRT-PCR 法により解析したところ、*DLK1* 遺伝子ノックアウト株は野生型株に比して *IGF2* (*insulin like growth factor 2*) および *NTS* (*neurotensin*) 発現が減少していた。小細胞肺癌細胞株の minor population が高度に発現する *DLK1* は、*IGF2* や *NTS* といった増殖因子の発現誘導を介することで、細胞集団全体の増殖に寄与している可能性が考えられた。

<引用文献>

1. Feng J, Sheng H, Zhu C, *et al.* Correlation of neuroendocrine features with prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(44):71727-71736.
2. Lee JK, Lee J, Kim S, *et al.* Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas. *J Clin Oncol*. 2017;35(26):3065-3074.
3. Ishii J, Sato H, Sakaeda M, *et al.* POU domain transcription factor BRN2 is crucial for expression of ASCL1, ND1 and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer. *Pathol Int*. 2013;63(3):158-168.
4. Ishii J, Sato H, Yazawa T, *et al.* Class III/IV POU transcription factors expressed in small cell lung cancer cells are involved in proneural/neuroendocrine differentiation. *Pathol Int*. 2014;64(9):415-422.
5. Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, *et al.* Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61(7):3200-3205.
6. Woll PJ. New perspectives in lung cancer. 2. Growth factors and lung cancer. *Thorax*. 1991;46(12):924-929.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井順、矢澤華子、柏木維人、平松千恵、岩本雅美、正和明哲、矢澤卓也
2. 発表標題 小細胞肺癌細胞集団中のDLK1強陽性細胞は幼若神経マーカーを発現する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井順、矢澤華子、柏木維人、鈴木盛一郎、平松千恵、岩本雅美、太田昌幸、正和明哲、矢澤卓也
2. 発表標題 小細胞肺癌細胞集団におけるDLK1陽性細胞は増殖に寄与する
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 石井 順、矢澤華子、柏木維人、鈴木盛一郎、平松千恵、矢澤 卓也
2. 発表標題 DLK1が肺癌細胞における神経内分泌特異的POU遺伝子発現のトリガーである可能性について
3. 学会等名 第107回 日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------