

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17691

研究課題名（和文）発生期の増殖・分化制御因子（Id遺伝子）を利用した肺癌治療への新規アプローチ

研究課題名（英文）Novel approach to lung cancer treatment by modulating the key proliferation regulator in tissue development, Id genes

研究代表者

清川 寛文（Hirofumi, Kiyokawa）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：40790621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺がんは癌死原因の第一を占め、未だ効果的な治療法のない難治性疾患である。多くの研究者の多大な努力にも関わらずがん細胞の増殖制御メカニズムはこれまで不明であったが、本研究では肺がん細胞の発生母地となる基底細胞の増殖がId遺伝子の多寡により制御されていることを見出した。またId2遺伝子の制御機構を詳細に解明すること成功し、Id2遺伝子の過剰発現が前癌状態である基底細胞の過増殖につながることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果は、難治性肺がんの一つである扁平上皮癌はId2遺伝子の過剰発現により出現することを示唆している。そのため気道上皮におけるId2遺伝子の発現を適切に制御することで、気管上皮細胞のがん化を防げることを示唆している。また肺がん細胞ではId2遺伝子が高発現していることを考えれば、Id2をターゲットした治療法が肺がん治療の新規治療として有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. However, the detailed mechanism underlying the proliferation of tumor cells, especially squamous lung cancer cells, still remains to be answered. In this research, we successfully revealed that Id2 regulates the proliferation of basal cells, which are known to be the origin of squamous lung cancer. In addition, we also demonstrated that how Id2 gene is regulated in tracheas of embryos and adults, showing that Id2 overexpression results in the basal cell hyperplasia, which is known as a precancerous condition.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：組織幹細胞 発生学 肺がん 呼吸器内科学

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

悪性度の高い癌細胞が示す未分化な性質は、胎児期の未分化細胞の振る舞いと比較されるが、実態としての分子挙動の共通性はわかっていない。本研究では『胎児期の未分化上皮細胞の増殖・分化制御機構と、癌細胞の増殖・未分化維持機構には共通性があり、癌細胞に対する新規治療ターゲットになりうる(図1 概念図)』との仮説のもと、胎児期末分化細胞と肺癌細胞に共通する分子メカニズムの同定を目指す。

多くの研究者の多大な努力にも関わらず肺癌は依然として癌死原因の第一位であり、中でも肺扁平上皮癌は未だ有望な分子標的治療薬がなく予後不良である。癌細胞の特徴は『未分化細胞の過剰増殖状態』で、肺扁平上皮癌では Sox2/p63 陽性未分化細胞の増殖が本態である (Watanabe H, et al. J Clin Invest. 2014)。興味深いことに胎児期の気管形成中にも同様の現象がみられ、Sox2/p63 陽性の未分化上皮細胞が増殖し、幹細胞として上皮組織内の細胞を供給する。しかし胎児期の未分化上皮細胞は癌細胞とは異なり、発生の過程で細胞増殖を停止し細胞分化へと進む。この増殖・分化の変化がいつどのような分子メカニズムにより制御されているかは不明であった。申請者は先行研究において、気管の未分化上皮細胞の増殖能・分化度の定量評価により胎生 15 日目 (E15) で急激な増殖停止と分化が生じることを見出した(図2)。

これは E15 が気管形成プログラム上の増殖・分化の大きな変換点であることを示している。一方発癌の際には、癌細胞はこの増殖・分化制御機構の解除により高い増殖能・未分化性を再獲得する(図1 概念図)。そのため発生期の増殖・分化制御メカニズムを解明することは、臓器形成における基本原理のみならず、癌細胞への新規アプローチをも可能にする。E15 周辺で働く増殖・分化制御メカニズムを解明するため、マウス胚の気道上皮細胞 (E12.5-E18.5) を用い scRNA-seq による網羅的トランスクリプトーム解析を行った。細胞系譜に依らず増殖・分化に同調して変化する因子に着目し、ID 遺伝子群が E14.5 以降に低下することを発見した (図3, 4)。ID 遺伝子の ID は Inhibitors of Differentiation の略で、文字通り多数の bHLH 型転写因子を阻害し組織特異的な分化メカニズムを抑制する。



図2 胎児期の気管上皮細胞の増殖率

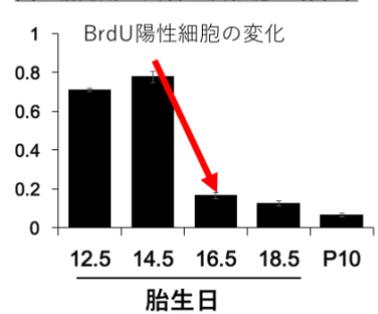


図3 ID2遺伝子の経時的変化

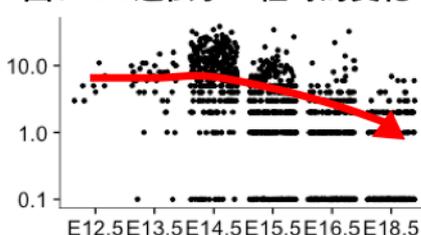
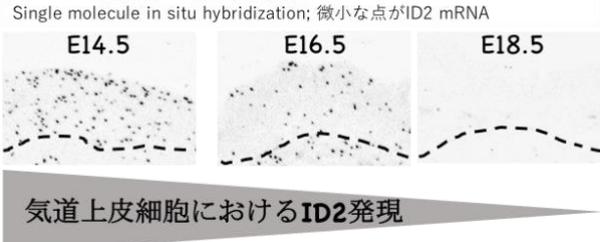


図4 ID2遺伝子の経時的変化



また同時に Rb などの細胞周期制御因子とも協働し、細胞増殖を促進する (Wang LH, et al. Dev Cell. 2015)。そこで ID2 欠損マウスを用い ID 遺伝子の増殖・分化に対する影響を検証したところ、ID2 欠損マウスでは気管上皮細胞の増殖能の早期低下・分化パターンの異常が生じていた。特に分化については扁平上皮癌の起源細胞である基底細胞の減少がみられ、癌化に必須な基底細胞の分化・維持に ID2 が関与していることが示唆された。以上のことから ID タンパクは初期の未分化上皮細胞の増殖能・未分化性維持に深く関与し、臓器発生の進行に同調した ID タンパクの喪失が未分化上皮細胞の分化と増殖低下の本態であると推察される。一方、最近の研究では ID タンパクが多数の癌種において高発現し、癌細胞に特徴的な高い増殖能・未分化性の維持に寄与していることが示されている (Roschger C, et al. Cell Commun Signal. 2017)。このことから ID タンパクはまさに我々の仮説にふさわしい、胎児期の未分化細胞と癌細胞とを繋ぐ理想的な候補因子と考えられる(図5)。

図5 IDタンパクは発生と癌を繋ぐ



2. 研究の目的

本研究では胎児期の気管上皮前駆細胞の増殖を制御していた *Id2* 遺伝子が、肺扁平上皮ガンの発生母地として知られる成熟した基底細胞の増殖制御に関連するかを検討する。また *Id2* の過剰発現が扁平上皮癌の出現・形成に寄与するのか検討を行った。

3. 研究の方法

マウス成体の成熟した気道上皮組織においても、*Id2* 遺伝子の発現が基底細胞の増殖制御に寄与しているかを以下の二つの手法により検討した。

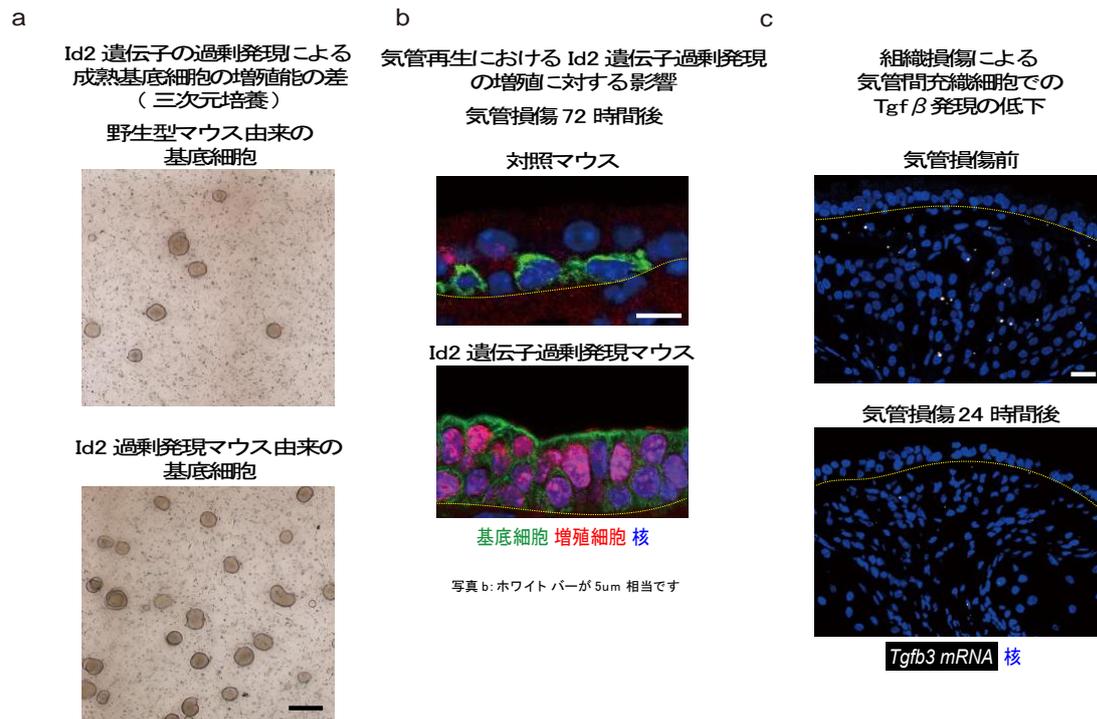
- ・成体の気道上皮から分離した基底細胞の増殖能を三次元培養により評価
- ・成体マウスを用いて気道傷害・再生の実験を行い、組織幹細胞として機能する基底細胞の増殖能に対する

また *Id2* 遺伝子の制御を行なっている上流因子を同定するために、*Id2* 遺伝子の抑制因子として知られる *Tgfb* pathway の胎児マウス・成体マウスにおける関与の検討を行なった。

4. 研究成果

マウス成体の成熟した組織幹細胞においても、*Id2* 遺伝子の発現が基底細胞の増殖制御に寄与しているかを調べる目的で、*Id2* 遺伝子を過剰に発現する遺伝子改変マウス (*Id2* 過剰発現マウス: *ShhCre Rosa26^{LSL-Id2/LSL-Id2}*) を作製した。次に成体の気道上皮から分離した基底細胞の増殖能を三次元培養を用いて評価したところ、野生型マウス由来の基底細胞と比べ *Id2* 過剰発現マウス由来の基底細胞はより高い増殖能を示しており (図 6a)、これは *Id2* 遺伝子が成熟した基底細胞においても増殖促進効果を有することを示している。

図 6



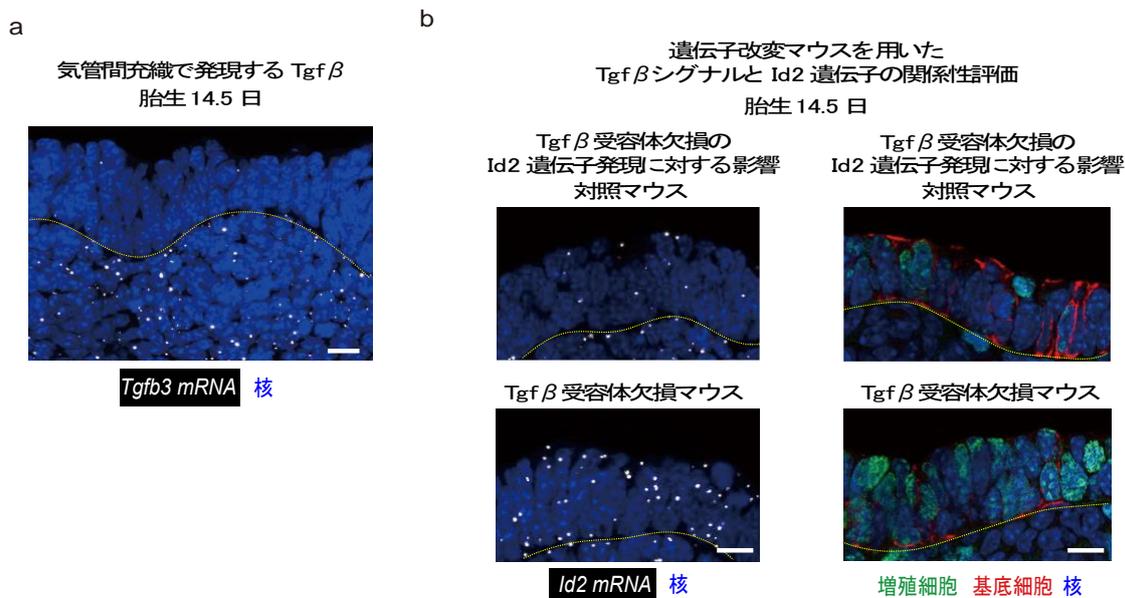
個体レベルでも同様の現象が生じているかを調べるため、成体マウスを用いて SO_2 ガスを用いた気道傷害・再生の実験を行なった。組織再生と *Id2* 遺伝子発現の関係性について解析した結果、*Id2* 遺伝子発現の増加は細胞増殖に先行していることが見出された。また、*Id2* 過剰発現マウスで同様に傷害・再生実験を行うと、傷害を受けてから細胞増殖に至るまでの時間が早まり、かつ基底細胞の過形成 (過剰増殖状態) が認められました (図 6b)。基底細胞の過形成は前癌状態として知られているため、これは *Id2* の過剰発現が癌化過程に寄与していることを示唆していた。

次に *Id2* 遺伝子の発現が組織再生時に再上昇する仕組みを解明するため、*Id2* 遺伝子の抑制因子として知られる分泌タンパク質 *Tgfβ* に着目した。その結果、組織障害に応じて間充細胞の *Tgfβ* の発現は低下し、*Id2* 遺伝子発現の再上昇が生じていることがわかった (図 6c)。さらに、*Tgfβ* 受容体欠損上皮マウス (*ShhCre Tgfb2^{fllox/fllox}*) に対して気道傷害・再生実験を行うと、*Id2* 過剰発現マウスと同様の基底細胞過形成を起こした。これらの結果は、組織再生時に見られる基底細胞の *Id2* 遺伝子発現の再上昇と、それに続く細胞増殖が、間充細胞から分泌される *Tgfβ* の低

下により引き起こされることを示しています。また、過剰な *Id2* 遺伝子の発現は前がん状態である基底細胞の過形成につながるため、*Id2* 遺伝子の厳格な発現制御が組織再生においては必須であることが示されました。

最後に、これらの気道の再生過程にみられる *gfb-Id2* の関係性が、胎児期気道上皮の細胞増殖にも寄与しているのかを検証した。すると上皮細胞を裏打ちする間充織細胞で胎生 14.5 日に強く発現していることが確認された (図 7a)。間充織細胞から分泌された *Tgfb* が上皮細胞に作用し、*Id2* 遺伝子の発現を抑制している可能性を検証するため、*Tgfb* 受容体欠損上皮マウスを使用した。このマウスでは、胎生 14.5 日の上皮細胞での *Id2* 遺伝子発現低下が起こらず、細胞増殖の亢進および基底細胞への分化阻害が認められた (図 7b)。これらの結果から、間充織細胞から分泌される *Tgfβ* が上皮細胞の *Id2* 遺伝子発現を調節し、胎生期における上皮の細胞増殖と分化を制御していることが示された。

図 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清川寛文
2. 発表標題 Single-cell RNA-seq illustrated the trajectories of basal progenitors in mouse developing trachea
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清川寛文
2. 発表標題 An inherited regulator for stemness capacity from epithelial progenitors to tissue stem cells in mice airway.
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------