

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16334

研究課題名（和文）小細胞肺癌におけるDraxin-Neogeninの細胞形成性関連蛋白・遺伝子解析

研究課題名（英文）Cytogenic-related protein and gene analysis of Draxin-Neogenin in small cell lung cancer

研究代表者

佐藤 陽之輔（Sato, Younosuke）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：00823311

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ガイドランス分子Draxinと受容体Neogeninによる経路が小細胞肺癌の腫瘍形成性に及ぼす影響を検討するために、作成したNeogenin遺伝子欠損細胞株H69ARと及びSBC5を用いてRNA-seqによる遺伝子発現の変動やデコイタンパクによる結合阻害、Draxin投与による影響の解析を行った。結果として、DraxinやNeogeninは小細胞肺癌での増殖能やアポトーシス関連因子の発現に関与している可能性が分かり、特にNeogeninは浸潤能の変動に関与していることが分かった。またNeogeninは小細胞肺癌の細胞株毎に細胞骨格や細胞接着を介して浸潤能の増減させることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は高悪性度腫瘍であるが、従来の化学療法では治療効果が不十分であり、新規治療法の開発が求められている。ガイドランス分子は受容体との結合により細胞増殖やアポトーシスを調節することから、新しい癌治療のターゲットとして注目されているが、Draxin-Neogenin経路と小細胞肺癌に関する報告はこれまで存在しなかった。本研究によりDraxin-Neogenin経路は小細胞肺癌の腫瘍形成性においてアポトーシス関連因子の発現や腫瘍の浸潤・転移能に関与している可能性が示唆され、Draxin-Neogenin間の結合をターゲットとして小細胞肺癌の腫瘍形成性や浸潤能へ影響できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effects of the guidance molecule Draxin and the receptor Neogenin pathway on tumorigenicity of small cell lung cancer, we used the Neogenin gene-deficient cell lines H69AR and SBC5, and analyzed the changes in gene expression by RNA-seq and binding inhibition by decoy proteins. The effects of Draxin administration were analyzed. The results showed that Draxin and Neogenin may be involved in the expression of proliferative potential and apoptosis-related factors in small cell lung cancer, and Neogenin in particular is involved in the variation of invasive potential. Neogenin also increases or decreases the invasive potential of each cell line of small cell lung cancer through the cytoskeleton and cell adhesion.

研究分野：発癌

キーワード：小細胞肺癌 神経ガイドランス分子 Draxin Neogenin

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は高悪性度な腫瘍で、新たな治療法の開発が望まれる。ガイダンス分子は受容体との結合により細胞増殖やアポトーシスを調節することから、新しい癌治療のターゲットとして注目されている。申請者はガイダンス分子 Draxin に着目し、肺癌細胞では Draxin やその受容体である Neogenin や DCC が高頻度に発現することや、Draxin 遺伝子の抑制により、細胞増殖関連因子の発現上昇やアポトーシス関連因子の発現が抑制されること、Neogenin 遺伝子の抑制により細胞接着因子が抑制されることを明らかにした。本研究では、小細胞肺癌で Draxin と Neogenin の遺伝子解析を行うとともに、Draxin-Neogenin 結合を干渉する decoy 蛋白質及び Draxin-22-amino-acid peptide の投与実験、小細胞肺癌モデルマウスと Draxin、Neogenin 遺伝子欠損マウスを用いた発癌実験から小細胞肺癌における役割を明らかにし、Draxin-Neogenin が新しい治療法開発のターゲットとなる可能性を模索するものである

2. 研究の目的

小細胞肺癌は高悪性度な予後不良の腫瘍で、外科手術の適応がなく、化学療法による治療効果が不十分なことから、新たな癌治療法の開発が求められている。小細胞肺癌症例を用いた大規模な driver mutation 探索研究では、ガイダンス分子が候補の一つに挙げられており、ガイダンス分子は各種腫瘍において、特異的に結合する受容体とともに発現していることが判明している。ガイダンス分子は受容体と結合すると細胞の増殖や遊走、分化を促進するが、結合がないとアポトーシスへ誘導する特徴がある。肺癌では、ガイダンス分子 Netrin-1 と受容体の DCC、Neogenin の結合を阻害することで、非小細胞肺癌の生存を阻害することが報告されたが、小細胞肺癌でのガイダンス分子-受容体間の干渉した研究は報告されていない。申請者はガイダンス分子 Netrin-1 と受容体を共通した別のガイダンス分子 Draxin を非小細胞肺癌で解析し、肺癌細胞では Draxin やその受容体 Neogenin や DCC が高頻度に発現していることや Draxin 遺伝子の抑制により、細胞増殖関連因子の発現の上昇やアポトーシス関連因子の発現が抑制されることを明らかにした。小細胞肺癌でも Draxin の発現や受容体 Neogenin の発現を確認して、小細胞肺癌でのガイダンス分子-受容体のターゲットとして、Draxin-Neogenin の干渉がある可能性が考えられる。また、Draxin は Netrin-1 と Draxin-22-amino-acid を介して結合することや、それによってガイダンス分子-受容体によるシグナル伝達調節している可能性が報告されており、Draxin が他のガイダンス分子の調節因子として、腫瘍でも関与している可能性を示唆する。本研究は Draxin が小細胞肺癌の生存や腫瘍形成に及ぼす影響 Neogenin が小細胞肺癌の浸潤、転移能へ与える影響を解析するとともに、Draxin と Neogenin の結合阻害による小細胞肺癌の増殖抑制やアポトーシス誘導を検証することである。

3. 研究の方法

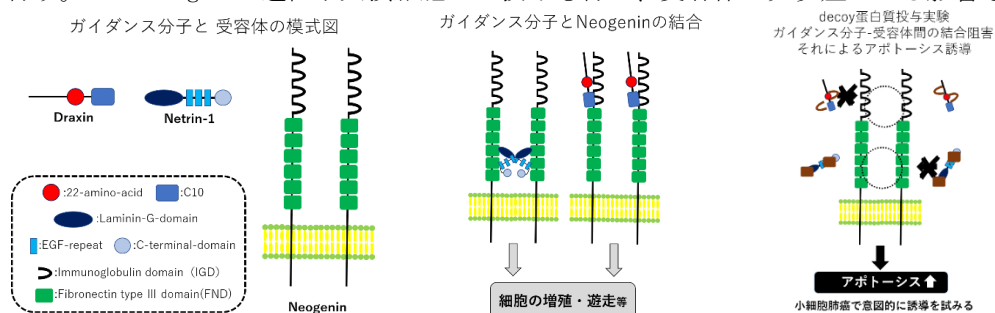
小細胞肺癌での Draxin・Neogenin の機能を解明するとともに、Draxin-Neogenin の干渉による小細胞肺癌の腫瘍形成性や細胞増殖能、アポトーシスシグナル経路の変動、浸潤能、転移能への影響を検証する。

① 小細胞肺癌細胞に対する Draxin、Neogenin の遺伝子解析

本研究室では、小細胞肺癌 H69AR・Draxin 遺伝子欠損細胞株及び Neogenin 遺伝子欠損細胞株、同じく小細胞肺癌 SBC5・Draxin 遺伝子欠損細胞株及び Neogenin 遺伝子欠損細胞株を作成・複数の株をそれぞれ保有している。これらの細胞株は RNA-seq 解析による検討を行う。遺伝子発現解析による Draxin 遺伝子及び Neogenin 遺伝子欠損によるコントロール群との遺伝子発現の差、トランスクリプトーム解析による Draxin 遺伝子・Neogenin 遺伝子に関係する遺伝子群の網羅的解析を目指す。

② 小細胞肺癌細胞に対する Decoy 蛋白質の大量投与・長期投与による影響の解析

培養中の小細胞肺癌株 H69AR に対して作成・精製した Decoy 蛋白(IG domain と FN domain の2種類)の大量・長期投与を行う。小細胞肺癌への Decoy 蛋白の投与の先行実験では、少量・短期間(5~7day)の培養でも、アポトーシス蛋白の変動が認められた。この結果を踏まえて、Decoy 蛋白をより大量且つ長期間の投与を行い、癌細胞のアポトーシス関連因子や他の蛋白の変化の検討を行う。また Neogenin 遺伝子欠損細胞への投与も行い、受容体の発現差による影響も検討する。



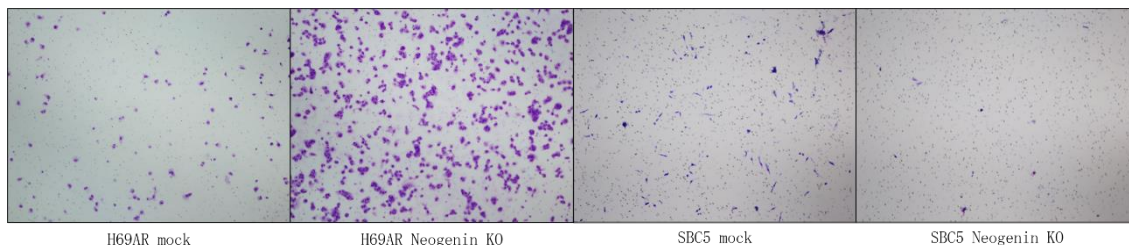
③ Draxin-Recombinant protein によるガイダンス分子-受容体結合への影響の解析
 Netrin-1 と結合し、シグナル伝達を阻害する Draxin-Recombinant protein により小細胞肺癌のコントロール細胞と Draxin 遺伝子欠損細胞、Neogenin 遺伝子欠損細胞にそれぞれ投与培養実験を行い、小細胞肺癌での細胞増殖やアポトーシス関連因子、浸潤・転移関連蛋白の検討を行う。

④ p53・Rb1 遺伝子及び Draxin、Neogenin 遺伝子欠損マウスを用いた小細胞肺癌の発癌実験及び Draxin 遺伝子・Neogenin 遺伝子欠損細胞の皮下移植実験とその解析
 小細胞肺癌発癌モデルマウス (p53^{-/-}/Rb1^{-/-}) 及び変異 EGFR/Rb1^{-/-} マウスと Draxin 遺伝子欠損マウス、Neogenin 遺伝子欠損マウスを掛け合わせて作成したマウスに doxycycline を飲水投与して小細胞肺癌を誘導して、コントロール群と比較し、Draxin-Neogenin の小細胞肺癌発生への影響を腫瘍形成性の点で検討する。発生した腫瘍は病理学的な検討を行う。採取した腫瘍の一部は、ウエスタンブロッティング等により細胞単位での蛋白発現やリン酸化シグナルの差を確認するとともに RNA-seq による解析を行い、細胞増殖や浸潤・転移関連の遺伝子の発現に違いが認められるか検討する。

4. 研究成果

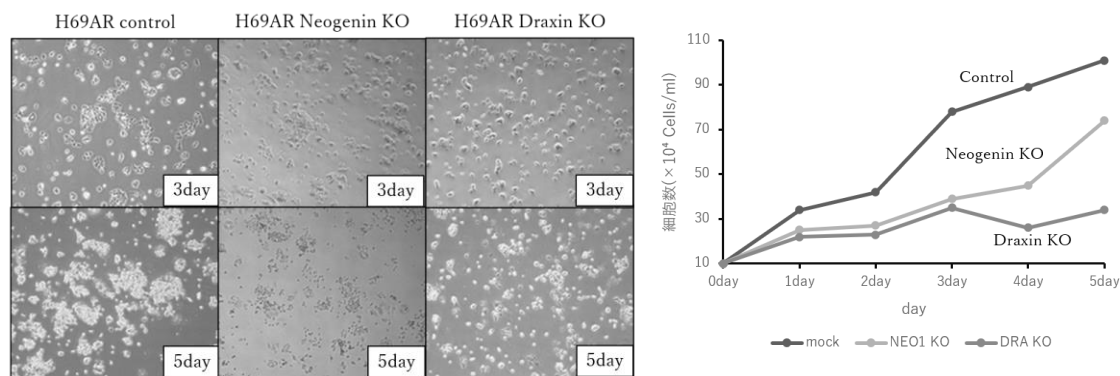
1. H69AR 及び SBC5 Neogenin 遺伝子欠損細胞を用いた Cell-invasion assay

H69AR と SBC5 のコントロールとそれぞれの Neogenin 遺伝子欠損細胞株を用いて Cell Invasion assay を行い、コントロールと比較して H69AR・Neogenin 遺伝子欠損細胞株では浸潤している細胞が明らかに増加していることが分かった。一方で、SBC5・Neogenin 遺伝子欠損細胞株で浸潤している細胞が明らかに減少していることが分かった。



2. Draxin 及び Neogenin 遺伝子欠損による小細胞肺癌の増殖能への影響の検討

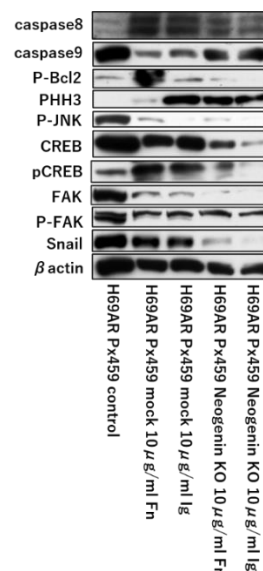
H69AR のコントロールと Draxin 及び Neogenin 遺伝子欠損細胞株を用いた細胞増殖試験では、コントロールと比較して Draxin 及び Neogenin 遺伝子欠損細胞株群で細胞数が減少する傾向が認められた。



3. 小細胞肺癌細胞と Neogenin 遺伝子欠損細胞に対する Decoy 蛋白質の投与による影響の解析

Neogenin の細胞外ドメインである Immunoglobulin ドメイン (IGD) 及び Fibronectin ドメイン (FND) を decoy 蛋白質として H69AR に大量投与実験を行った。結果、コントロール群では細胞接着に關与する Focal adhesion kinase (FAK) やリン酸化 FAK (p-FAK) の発現減少やアポトーシス因子である Caspase8 や Caspase9、ストレス応答性に働く MAPK 関連蛋白 MAPK である JNK や cAMP 応答配列結合蛋白 (CREB) の変化等多数の蛋白で発現変動が認められた。

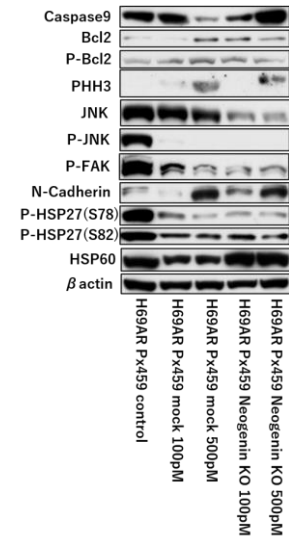
また、Neogenin 遺伝子欠損群ではコントロール群と比較して上皮の形態形成や上皮間葉転換に關与する Snail の発現がコントロール群で変動が認められなかったのに対して、Neogenin 遺伝子欠損群では有意に減少が認められた。



4. 小細胞肺癌細胞と Neogenin 遺伝子欠損細胞に対する Draxin-

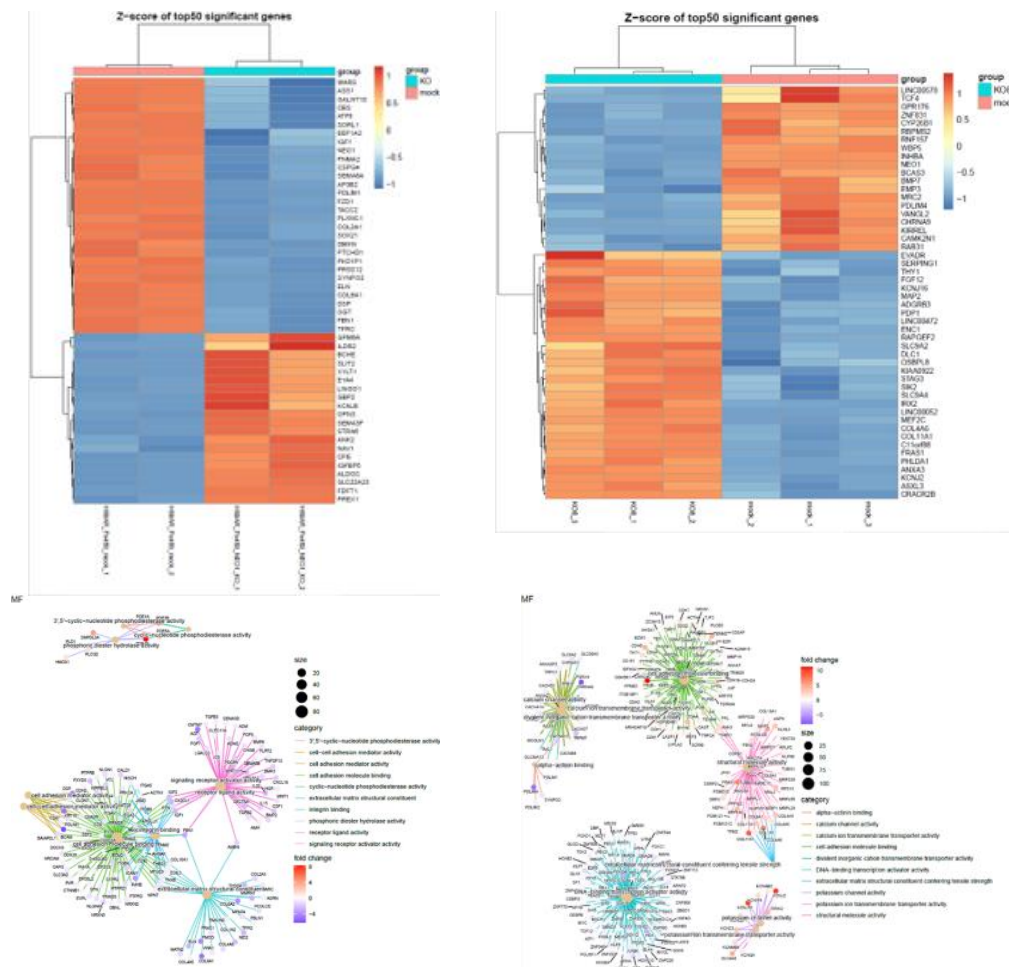
Recombinant protein 投与による影響の解析

H69AR のコントロール群と Neogenin 遺伝子欠損群にそれぞれ Draxin-Recombinant protein の投与実験を行った。結果、H69AR のコントロール群では Draxin 投与量に応じてアポトーシス関連因子である Caspase9 と細胞接着因子である p-FAK、熱ショック蛋白 p-HSP27 や HSP60、ストレス応答性に働く MAPK 関連蛋白 JNK や p-JNK の発現低下が認められた。また、細胞接着に関与する N-cadherin や細胞増殖に関与する p-Bcl2 や Bcl2、pHH3 の軽度な発現増加が認められた。一方で、Neogenin 遺伝子欠損株では、投与量の増加に依存して JNK や p-JNK、p-HSP27 の発現低下が認められた。また、N-cadherin や Bcl-2、pHH3 の発現増加が認められた。



5. RNA-seq を用いた小細胞肺癌に対する Neogenin 遺伝子欠損による遺伝子発現変動の解析

H69AR・Neogenin 遺伝子欠損細胞株に RNA-seq を行った結果、有意な発現差異が認められた遺伝子群の中でも、cell adhesion molecule binding や cell adhesion mediator activity、cell-cell adhesion mediator activity、integrin binding 関連に集中していることが判明した。これらの遺伝子群の発現には減少傾向がみられた。一方で SBC5・Neogenin 遺伝子欠損細胞株に RNA-seq を行った結果、有意な発現差異が認められた遺伝子群の中でも、cell adhesion molecule binding や structural molecule activity 関連に集中していることが判明した。これらの遺伝子群の発現には増加傾向がみられた。これらの結果から、小細胞肺癌では Neogenin 遺伝子の欠損により細胞-細胞間接着や細胞骨格に関わる遺伝子群の発現が変動することが明らかになった。



6. p53・Rb1 遺伝子・Draxin、Neogenin 遺伝子欠損マウス作成と小細胞肺癌誘導実験

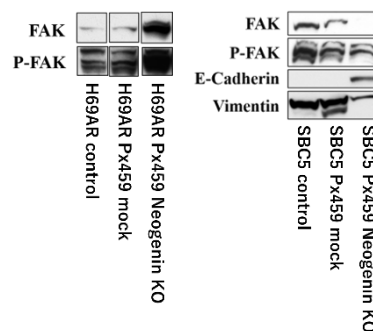
小細胞肺癌発癌モデルマウスとして p53 遺伝子欠損・Rb1 遺伝子欠損による古典的発癌モデルマウスと変異 EGFR 遺伝子・Rb1 遺伝子欠損の非古典的発癌モデルマウスを、Draxin 遺伝子欠損マウス、Neogenin 遺伝子欠損マウスとそれぞれ掛け合わせて、小細胞肺癌発癌モデルマウスを作成した。

胞肺癌発癌モデル+Draxin(-/-) and/or Neogenin(-/-)マウスを作製し、小細胞肺癌の発癌・腫瘍形成性への影響を解析しようと試みたが、実験頭数分確保することはできなかった。Draxin-Neogenin 経路の遺伝子(-/-)マウスはほぼ死亡、継代や実験に使用するまで成長することができでいない。引き続きこれら発癌モデルマウス作成は継続していく予定であるが、マウス作成の外注に依頼して用意する必要があると考えている。

今後の実験の展望に関して、Neogenin 遺伝子欠損株に続けて H69AR と SBC5 で樹立した Draxin 遺伝子欠損細胞株でも RNA-seq による遺伝子の発現変動を検討したいと考えている。本研究による Draxin(Recombinant protein)投与からの蛋白発現解析や Neogenin 遺伝子欠損からの RNA 発現解析を通して、Draxin と Neogenin それぞれが細胞接着因子やアポトーシス関連因子の蛋白発現に関与しており、デコイタンパクによる Draxin-Neogenin 間結合の阻害は癌の浸潤・転移やアポトーシス関連など腫瘍生存に関与する蛋白発現へ影響しており、Draxin-Neogenin 間の結合とそのシグナル経路は癌の腫瘍生存や腫瘍形成、浸潤などに関与している可能性が示唆された。他に H69AR 及び SBC5 Neogenin 遺伝子欠損細胞を用いた Cell-invasion assay により細胞培養実験レベルでも小細胞肺癌の浸潤能に影響することが分かった。また Neogenin 遺伝子欠損細胞株を用いた RNA-seq 解析により cell adhesion molecule binding 等に関連する細胞-細胞間接着や細胞骨格に関わる遺伝子群の発現が変動することが明らかになった。

一方で Neogenin 遺伝子の欠損により H69AR と SBC5 の細胞接着や細胞骨格に関わる遺伝子、それらの遺伝子群の発現に影響されると思われる小細胞肺癌の浸潤能がそれぞれ全く正反対の影響を受けることが判明した。H69AR では細胞接着や細胞骨格に関わる遺伝子の発現が低下し、浸潤能が増加したのに対して、SBC5 では細胞接着や細胞骨格に関わる遺伝子の発現が増加し、浸潤能が低下した。Neogenin は小細胞肺癌において浸潤能に関与していると考えられるが、細胞株によって positive な影響を受けるか、negative な影響を受けるか違う可能性が出てきた。

これらは蛋白発現の段階でも示唆されており、H69AR・Neogenin 遺伝子欠損細胞株では細胞接着因子である FAK や p-FAK の発現が増加するのに対して、SBC5・Neogenin 遺伝子欠損細胞株では FAK や p-FAK、細胞の形態の維持を担う主要な構造蛋白の Vimentin の発現が低下し、E-cadherin の発現の増加が認められた



(右図参照)。細胞株によって Neogenin 遺伝子の影響が異なる理由として、今回用いた小細胞肺癌細胞株は

いずれも化学療法後に確立された細胞株であることである。化学療法後の小細胞肺癌細胞株は本来有するはずの神経内分泌能を失われており、薬剤耐性能を有する傾向が報告されている。また、これらの変化には NeuroD1 や Pou2F3、YAP1 遺伝子の発現が関与している可能性も報告されている。H69AR や SBC5 において NeuroD1 や Pou2F3、YAP1 遺伝子の発現差異が Neogenin 遺伝子の作用にも影響しているのかもしれない。今後の研究では小細胞肺癌細胞株毎の影響も考慮する必要があると考えられる。

マウスを用いた実験として、小細胞肺癌発癌モデルと Draxin-Neogenin 遺伝子欠損モデルとの掛け合わせによる実験モデル作成は引き続き継続中であるが、Neogenin (-/-) マウスの生存は厳しく、実験に耐えうることや実験を行える数のマウスを自作して用意することは難しいのが現状である。対策として熊本大学内に存在するマウスバンクではマウスの交配を有料ではあるが、マウスの交配・作成を依頼することができるので、外注することも視野に入れたい。またマウスの胚・精子を液体窒素下に凍結保存し、必要時にそれらからマウス個体を有料で作製することができるので生存が難しい Neogenin (-/-) マウスの管理も可能と考えられる。これら発癌モデルマウスには doxycycline を飲水投与することで小細胞肺癌を誘導できるので、コントロール群と比較し、Draxin-Neogenin 経路の小細胞肺癌発生への影響を検討することができる。発生した腫瘍は病理学的な検討も行い、採取した腫瘍の一部は、ウェスタンブロットティングのサンプルへ回し細胞レベルでの蛋白発現やリン酸化シグナルの差を確認するとともに、可能であれば RNA-seq による解析を行い、遺伝子レベルでの細胞増殖や浸潤・転移関連の遺伝子の発現に違いが認められるか検討したい。

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 1件）

1. 著者名 Younosuke Sato , Isamu Okamoto , Hiroki Kameyama , Shinji Kudoh , Haruki Saito , Mune Sanada , Noritaka Kudo , Joeji Wakimoto , Kosuke Fujino , Yuki Ikematsu , Kentaro Tanaka , Ayako Nishikawa , Ryo Sakaguchi , Takaaki Ito	4. 巻 10
2. 論文標題 Integrated Immunohistochemical Study on Small-Cell Carcinoma of the Lung Focusing on Transcription and Co-Transcription Factors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics101109	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------