

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08210

研究課題名(和文) 希少型肺腺癌の発生に関わる分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of tumorigenesis in pulmonary adenocarcinomas of rare histologic types

研究代表者

矢澤 華子(佐藤華子)(Yazawa, Hanako)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：60438132

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)：肺には、腸型肺腺癌や、高悪性度胎児型肺腺癌、肝型肺腺癌など多種の希少癌が発生する。本研究では種々の分化誘導関連遺伝子を通常組織型に由来する肺腺癌細胞に導入あるいは編集することにより希少組織型肺腺癌細胞への形質転換を試みた。通常型肺腺癌細胞、TP53遺伝子を不活化することで上皮間葉転換状態にした通常型肺腺癌細胞に対し、腸上皮分化に関与するCDX2あるいは肝細胞分化に関与するSALL4を導入することにより、腸上皮マーカーあるいは肝細胞マーカーの発現が誘導され、遺伝子導入腺癌細胞は不完全ながら細胞形質変化を示した。しかしいずれにおいても有意な形態変化までには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日の分子標的治療やがんゲノム医療の進歩は、腫瘍発生進展に深く関与するドライバー遺伝子の発見を基盤としており、中でも肺腺癌における分子標的治療は最も進歩している分野である。しかし希少組織型肺腺癌においては既知のドライバー遺伝子変異の頻度が低く腫瘍発生機序が不明であるため、分子標的治療が困難な状況にある。本研究では腸型肺腺癌、肝型肺腺癌の形成過程の一端が明らかになったが、本研究の更なる推進により、希少型肺腺癌細胞の分化機構や形質転換機構がより詳細に明らかになり、さらに治療上の分子標的が明らかになることで、有効性の高い新たな治療法の創生へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many kinds of adenocarcinomas, including that of rare histologic types, such as enteric type, high-grade fetal type, and hepatoid type, generate from the lung. In this investigation, we tried to transform ordinary types of lung adenocarcinoma cells to enteric or hepatoid adenocarcinoma cells through transduce or edit of differentiation-associated transcription factor genes. Lung adenocarcinoma cells of ordinary types with or without TP53 inactivation revealed partial enteric/hepatoid differentiation via CDX2 or SALL4 gene transfection, respectively. However, no significant morphological alteration suggesting complete transformation to enteric/hepatoid adenocarcinoma cells was observed in the inoculated tumor tissues of NOG-mice.

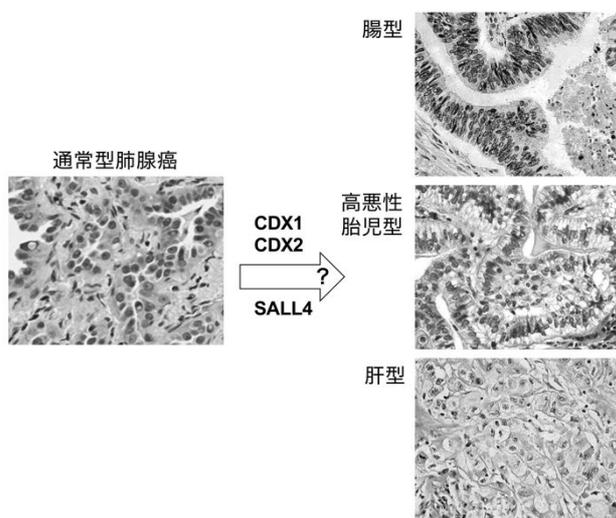
研究分野：病理学、分子病理学、呼吸器腫瘍病理学

キーワード：肺癌 希少型肺腺癌 転写因子 腸型肺腺癌 肝型肺腺癌 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

肺に発生する悪性腫瘍は多彩であり、高悪性度胎児型肺腺癌や腸型肺腺癌、肝型肺腺癌など多くの組織型が希少癌として存在するが、それらには少なからず通常型肺腺癌成分が含まれている。この事実は希少組織型肺腺癌細胞が通常型肺腺癌細胞から形質転換により発生する可能性を示唆している。今日の分子標的治療やがんゲノム医療の進歩は、腫瘍発生進展に深く関与するドライバー遺伝子の発見を基盤としており、中でも肺腺癌における分子標的治療は最も進歩している分野である。しかし希少組織型肺腺癌においては既知のドライバー遺伝子変異の頻度が低く腫瘍発生機序が不明であるため、分子標的治療が困難な状況にある。

肺癌、特に肺腺癌はドライバー遺伝子変異解析が最も進んでいる癌腫である。本邦において *EGFR* 変異症例は肺腺癌の 50% ほどを占めており、他に *KRAS* 変異症例、*EML4-ALK* 転座症例などが存在する。肺腺癌には多種の病理組織型が存在しており、最新の WHO 分類においても通常組織型の肺腺癌に加え、胎児型腺癌、腸型腺癌、コロイド腺癌など発生頻度の低い組織型が特殊型として掲載されている。また肺からは胃などにも発生し AFP 産生を特徴とする肝型腺癌も極めて稀ながら発生する。これらのいわゆる「希少型肺腺癌」組織内には通常型肺腺癌成分が minor element として存在しており、既知のドライバー遺伝子変異症例は少ないと報告されている。我々もこれまで高悪性度胎児型肺腺癌 20 例、腸型肺腺癌 7 例について遺伝子変異検索を施行し、*EGFR* 遺伝子異常症例は 4/20 および 0/7、*KRAS* 遺伝子異常は 0/20 および 1/7 であり、通常型肺腺癌で見られる *EGFR/KRAS* 遺伝子異常頻度に比して著しく低率であったと報告した (*Histopathology* 67:806-816, 2015; *Hum Pathol* 64:179-185, 2017)。このような報告は、希少型肺腺癌は通常型肺腺癌とは異なる腫瘍発生機序を有している可能性、あるいは通常型肺腺癌細胞が希少型肺腺癌細胞に形質転換することにより形成される可能性を示唆している。



2. 研究の目的

そこで本研究では、種々の分化誘導遺伝子を通常組織型に由来する肺腺癌細胞に導入あるいは編集することにより、希少組織型肺腺癌細胞への形質転換を試み、その組織発生機序を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

まず複数種の通常型肺腺癌株に腸上皮分化に関与する転写因子 CDX2 (Caudal type homeobox protein 2)、CDX1、肝細胞分化に関与する転写因子 SALL4 (Spalt-like 4) を単独、あるいは複数遺伝子導入することにより強制発現株を樹立し、その形態変化や分子生物学的変化について検索し、癌細胞のバックグラウンド(例えばドライバー遺伝子変異の違いなど)との関連性について解析を行った。また樹立した遺伝子導入株を NOG マウス皮下に移植し、形成される腫瘍の組織学的、免疫組織化学的検索を行い、細胞種による形質転換状態の違いについて検討した。

次に *TP53* 遺伝子のノックアウトにより分化脆弱性、幼若性を獲得した通常型肺腺癌株を作成し、これに上記の転写因子遺伝子を単独あるいは共導入することによる形質転換状態の変化を検討した。

(1) 通常型肺腺癌細胞への CDX2, CDX1, SALL4 遺伝子導入 :

我々の研究室で保有する通常型肺腺癌細胞株に対し CDX2、CDX1、SALL4 cDNA を挿入したウイルス発現ベクターを導入し、薬剤選択後、シングルセルクローニング装置を用いて遺伝子導入株を樹立した。遺伝子の共導入には 2A 遺伝子を用い、複数の cDNA をタンデムに配置した発現ベクターを用いた。樹立した遺伝子導入細胞株における分子生物学的変化について、リアルタイム PCR 法を用いて腸上皮マーカーである CK (Cytokeratin) 20 や MUC (Mucin) 2 発現お

よび、肺上皮に発現される CK(Cytokeratin)7 の発現変化について解析した。

(2)NOG マウス皮下腫瘍における病理組織学的検討：

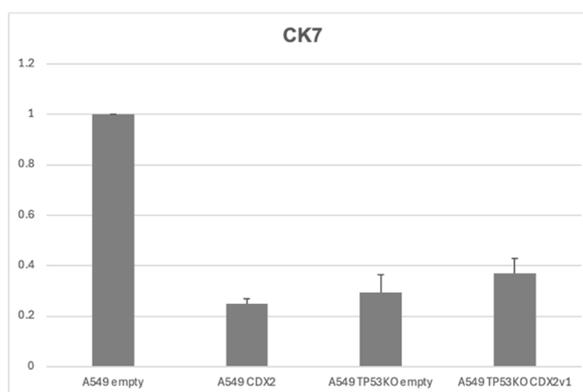
上記(1)で樹立した細胞株を NOG マウス背側部皮下に移植することにより形成される腫瘍について病理組織学的に解析し、導入遺伝子が癌細胞の分化に与える影響について検討した。

(3)TP53 遺伝子をノックアウトした通常型肺腺癌細胞株の作成と CDX2, SALL4 遺伝子導入：

分化脆弱性、幼若性を獲得した状態の通常型肺腺癌細胞株に対し転写因子遺伝子を単独あるいは共導入することによる形質転換状態を解析するため、まず CRISPR Cas9 システムを用いて TP53 遺伝子をノックアウトした細胞株を樹立し、樹立した細胞株における EMT 関連マーカーの発現変化について解析した。次に TP53 ノックアウト細胞に対し CDX2 や SALL4 遺伝子を単独または共導入した細胞株における CK20、MUC2、CK7、AFP の発現変化についてリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて解析した。

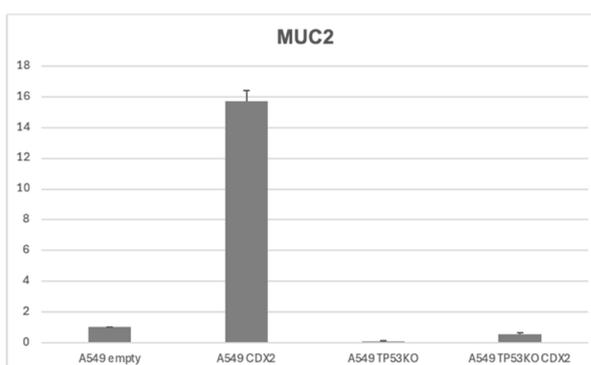
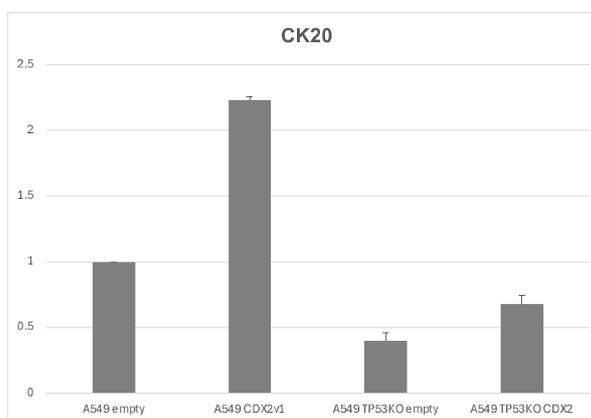
4. 研究成果

(1)複数種の通常型肺腺癌細胞株に対し、腸上皮分化、肝細胞分化に与えることが報告されている転写因子 CDX2、CDX1、SALL4 を遺伝子導入し、その分子生物学的変化について検索した。その結果 KRAS 変異腺癌細胞株、EGFR 変異腺癌細胞株いずれにおいても CDX2 あるいは CDX1 導入により腸上皮マーカーである CK20 や MUC2 発現亢進、及び肺上皮に発現される CK7 の発現抑制が確認された。また SALL4 導入により AFP の発現亢進が一部の腺癌細胞株で確認された。これらの結果から、腺癌細胞への分化誘導転写因子の導入が腸上皮や肝細胞への分化をある程度誘導していることが示唆された。



(2)樹立した3種の目的遺伝子(CDX2, CDX1, SALL4)を発現する KRAS 変異腺癌細胞株(A549)および EGFR 変異腺癌細胞株(H1975)における形質転換状態が、形態像に現れているか否かを確認するため、遺伝子導入株を NOG マウス皮下に移植し、形成された移植腫瘍について病理組織学的に検討した。その結果、目的遺伝子を遺伝子導入した細胞株において、杯細胞形成や肝細胞様形態などの著しい形質転換像は認められないことが明らかになった。

(3)分化脆弱性、幼若性を獲得した状態の通常型肺腺癌細胞株に対し転写因子遺伝子を単独あるいは共導入することによる形質転換状態を検討するため、まず CRISPR Cas9 システムを用いて TP53 遺伝子をノックアウトした細胞株の樹立を試み、樹立した TP53 ノックアウト細胞株の上皮間葉転換(EMT)状態について確認した。その結果 TP53 ノックアウトにより複数の EMT 関連遺伝子の発現誘導が確認された。そこで、TP53 遺伝子をノックアウトした細胞株に対し CDX2 を導入し、腸上皮マーカーである CK20 や MUC2 と共に、肺上皮に発現される CK7 の発現変化についてリアルタイム PCR にて検討した。その結果、CK7、CK20 や MUC2 の著しい発現変化は認められなかった。また、樹立した細胞株を NOG マウスの皮下へ移植し、形成された移植腫瘍について病理組織学的に検討したところ、腸上皮への著しい形質転換は認められなかった。



以上の結果から、CDX2/1 あるいは SALL4 発現誘導により、部分的には腸上皮あるいは肝細胞への形質を付与すること

が可能であることが判明したが、ヒト癌組織に見られるまでの形質転換には至っていないものと判断した。近年、細胞分化の運命付け、細胞分化の可塑性にはエピジェネティックな要因が深く関与していることが報告されていることから、今後は細胞分化の可塑性に関与する遺伝子発現を調節することにより、腸型肺腺癌、肝型肺腺癌の分子発生機序について、さらに研究を進めていきたい。

[参考文献]

1. Suzuki M, Yazawa T, et al. High-grade fetal adenocarcinoma of the lung is a tumor with a fetal phenotype that shows diverse differentiation, including high-grade neuroendocrine carcinoma: a clinicopathological, immunohistochemical and mutational study of 20 cases. *Histopathology* 67:806-816, 2015.
2. Matsushima J, Yazawa T, et al. Clinicopathological, immunohistochemical, and mutational analyses of pulmonary enteric adenocarcinoma: usefulness of SATB2 and b-catenin immunostaining for differentiation metastatic colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 64:179-185, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Masawa Meitetsu, Sato-Yazawa Hanako, Kashiwagi Korehito, Ishii Jun, Miyata-Hiramatsu Chie, Iwamoto Masami, Kohno Kakeru, Miyazawa Tadasuke, Onozaki Masato, Noda Shuhei, Shimizu Yasuo, Niho Seiji, Yazawa Takuya | 4. 巻 192 |
| 2. 論文標題 REST Inactivation and Coexpression of ASCL1 and POU3F4 Are Necessary for the Complete Transformation of RB1/TP53-Inactivated Lung Adenocarcinoma into Neuroendocrine Carcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The American Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 847 ~ 861 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2022.03.007 | 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 Ishii Jun, Sato-Yazawa Hanako, Kashiwagi Korehito, Nakadate Kazuhiko, Iwamoto Masami, Kohno Kakeru, Miyata-Hiramatsu Chie, Masawa Meitetsu, Onozaki Masato, Noda Shuhei, Miyazawa Tadasuke, Takagi Megumi, Yazawa Takuya | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Endocrine secretory granule production is caused by a lack of REST and intragranular secretory content and accelerated by PROX1 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Molecular Histology | 6. 最初と最後の頁 437 ~ 448 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10735-021-10055-5 | 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 Kashiwagi K, Sato-Yazawa H, Ishii J, Kohno K, Tatsuka I, Miyazawa T, Takagi M, Chiba H, Yazawa T | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 LXR Activation Inhibits the Proliferation of Small-cell Lung Cancer Cells by Depleting Cellular Cholesterol | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 2923 ~ 2930 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15774 | 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 Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Ishii J, Masawa M, Onozaki J, Miyata-Hiramatsu C, Miyazawa T, Sakaguchi M, Yazawa T | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Utility of a single particle isolation system in genome-editing and gene-transfection experiments | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Dokkyo Journal of Medical Sciences | 6. 最初と最後の頁 75-80 |
| 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 - |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Matsudera S, Sato-Yazawa H, Terada M, Yamaguchi T, Tani Y, Watanabe S, Kashiwagi K, Ishii J, Ito Y, Ogino K, Okamoto K, Nakajima M, Morita S, Yamaguchi S, Kuroda H, Tsuchioka T, Kojima K, Yazawa T | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Histopathological evaluation of the effectiveness of oral Eppikajutsuto treatment for lymphatic malformation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery | 6. 最初と最後の頁 1668-1672 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2020.09.007 | 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 Ishii J, Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Nakadate K, Iwamoto M, Kohno K, Miyata-Hiramatsu C, Masawa M, Onozaki M, Noda S, Miyazawa T, Takagi M, Yazawa T | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Endocrine secretory granule production is caused by a lack of REST and intragranular secretory content and accelerated by PROX1 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Molecular Histology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10735-021-10055-5 | 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 Masawa M, Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Ishii J, Miyata-Hiramatsu C, Iwamoto M, Kohno K, Miyazawa T, Onozaki M, Noda S, Shimizu Y, Niho S, Yazawa T | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 REST inactivation and coexpression of ASCL1 and POU3F4 are necessary for the complete transformation of RB1/TP53-inactivated lung adenocarcinoma into neuroendocrine carcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 America Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2022.03.007 | 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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 矢澤華子、柏木維人、石井 順、河野 翔、小野崎聖人、野田修平、金野晃大、宮澤公輔、矢澤卓也 |
| 2. 発表標題 RB1/TP53不活化肺腺癌細胞はREST不活化と神経特異的転写因子共発現により神経内分泌癌に形質転換する |
| 3. 学会等名 第26回日本臨床内分泌病理学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 正和明哲, 矢澤華子, 柏木維人, 石井順, 宮澤公輔, 清水泰生, 仁保誠治, 矢澤卓也 |
| 2. 発表標題 肺腺癌から神経内分泌癌への形質転換現象に関わる分子メカニズム |
| 3. 学会等名 第49回獨協医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 小野崎聖人, 矢澤華子, 柏木維人, 石井順, 平松千恵, 野田修平, 野沢友美, 石田和之, 矢澤卓也 |
| 2. 発表標題 肺腺癌細胞への腸上皮マーカーCDX2遺伝子導入に伴う形質変化 |
| 3. 学会等名 第49回獨協医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高木恵美, 宮澤公輔, 上村 任, 石井 順, 矢澤華子, 柏木維人, 河野翔, 平松千恵, 鈴木盛一郎, 矢澤卓也 |
| 2. 発表標題 REST遺伝子の抑制およびPROX1、POMC遺伝子の強制発現は非内分泌細胞株H1299に内分泌顆粒様構造物の形成を誘導する |
| 3. 学会等名 第25回日本臨床内分泌病理学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 石井順, 矢澤華子, 柏木維人, 河野翔, 平松千恵, 鈴木盛一郎, 矢澤卓也 |
| 2. 発表標題 小細胞肺癌細胞の増殖にDLK1が増殖因子を介して関与する可能性について |
| 3. 学会等名 第25回日本臨床内分泌病理学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|-------------------------------------------------|------------------------------|----|
| 研究分担者 | 矢澤 卓也 (Yazawa Takuya) (50251054) | 獨協医科大学・医学部・教授 (32203) | |
| 研究分担者 | 柏木 維人 (Kashiwagi Korehito) (50722451) | 獨協医科大学・医学部・助教 (32203) | |
| 研究分担者 | 石井 順 (Ishii Jun) (80749599) | 獨協医科大学・医学部・助教 (32203) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|