

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16139

研究課題名（和文）小細胞肺がんの運命制御転写因子の相互排他性に注目した新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Identifying novel vulnerability of small cell lung carcinoma based on the mutually exclusive expression of master transcriptional regulators

研究代表者

井上 裕介（Inoue, Yusuke）

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10795470

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：形質制御転写因子の発現プロファイルによる小細胞肺がんの分類が提唱されている。申請者は、形質制御転写因子が小細胞肺がんにおいて相互排他的に発現している可能性に注目し、この相互排他性の背景に腫瘍抑制性に働く転写因子の組み合わせが存在することにより選択や淘汰が生じていると仮説を立てた。我々は、最も代表的な形質制御転写因子であるASCL1とNEUROD1が高度に相互排他的に発現していること、およびASCL1とNEUROD1の共発現により、小細胞肺がん細胞株においてアポトーシスが誘導されることを見出した。この機序として細胞形質分化プログラムの破綻が示唆され、さらに詳細に検討を進めていく方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺がんの病態には未解明な部分が多く、その治療には過去40年間で大きな進歩が見られていない。その結果、その予後は依然として極めて不良である。しかし、最近になり小細胞肺がんの遺伝子異常の他、その分化に関わる形質制御転写因子の存在が明らかにされてきた。

本研究は、この形質制御転写因子の発現が小細胞肺がんにおいて相互排他的に生じる機構の一つを説明するものであり、小細胞肺がんの病態生理の理解を深めるとともに、この相互排他性を標的とした小細胞肺がんのサブタイプ特異的な新たな治療戦略の確立の契機となる可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The molecular classification of small cell lung carcinoma (SCLC) based on the mutually exclusive expression patterns of lineage-related transcription factors (TFs) has been proposed. Here, we hypothesized that SCLC cells might undergo selection during evolution by cytotoxic effects of dual positivity of these TFs. In this study, the mutual exclusivity was most strongly observed between ASCL1 and NEUROD1 in clinical SCLC specimens. In addition, we found that co-expression of ASCL1 and NEUROD1 caused apoptosis in both ASCL1-driven and NEUROD1-driven SCLC cells. Further, the disruption of lineage-specific transcriptional programming was considered as the mechanism of cell death in our model. We are currently clarifying more detailed mechanisms behind the mutually exclusive expression of lineage-related TFs, eventually to identify novel druggable vulnerability of SCLC.

研究分野：肺がん、呼吸器内科学、腫瘍学

キーワード：形質制御転写因子 小細胞肺がん 相互排他性 細胞分化 ASCL1 NEUROD1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺がんの病態には未解明な部分が多く、その治療には過去 40 年間で大きな進歩が見られていない。その結果、5 年生存率はわずか 7%とその予後は依然として極めて不良である。一方で、最近になり小細胞肺がんの遺伝子異常の他、その分化に関わる形質制御転写因子 (ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1、ATOH1) の存在が明らかにされ、この発現プロファイルに基づいた小細胞肺がんの分類 (引用) が提唱されるに至った。しかし、小細胞肺がんの形質制御転写因子の発現制御機構や相互作用、患者の予後や化学療法への反応性との関係等はほとんど明らかになっていない。小細胞肺がんにおいても個々の腫瘍のプロファイルに応じた治療標的の同定、治療薬の開発を進め、個別化治療を実現する必要があるが、そのためには形質制御転写因子の理解を深めることが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

「小細胞肺がんの形質制御転写因子はなぜ相互排他的に個別の小細胞肺がんに発現するのか？」が本研究課題の核心をなす「問い」であり、本研究では形質制御転写因子の共発現細胞株モデルを構築し、この相互排他性の背景にあるメカニズムを明らかにすることで、小細胞肺がんの新たな治療標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

形質制御転写因子のタンパク質レベルでの発現について、Tissue マイクロアレイを用いた免疫組織化学染色法により評価する。

各形質制御転写因子を特異的に発現している小細胞肺がん細胞株 (ASCL1 : H2107、H128 ; NEUROD1 : H82、H524 ; POU2F3 : H526、H211 ; YAP1 : SBC3、SBC5 ; ATOH1 : HCC33) に対して、他の転写因子を条件付きで発現させる実験系を構築する。条件付き発現モデルとしては、Tet-On advanced 発現誘導システムを有する p20Inducer レンチウィルスシステムを用いてテトラサイクリン存在下での厳格な発現制御を行う。これらの細胞株を用いて、マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を行い、各転写因子の標的となる遺伝子群、シグナル伝達経路がいかに関与するかの解析により影響を受けるかを明らかにする。また、細胞形態や増殖能、細胞周期、細胞死、細胞老化、遊走能、浸潤能、および抗がん薬への感受性などを検討する。

形質制御転写因子の共発現がゲノムワイドに細胞分化プログラムに与える影響を ATAC-seq により明らかにする。

4. 研究成果

(1) 小細胞肺がん臨床検体における形質制御転写因子発現の解析

我々は、多施設より 151 例の小細胞肺がんの切除検体を集積し、各形質制御転写因子発現の相互排他性を免疫組織化学染色法により確認した。特に、ASCL1 と NEUROD1 においては、組織レベルでは両者を発現している例外的な腫瘍でも、個々の細胞レベルではそれぞれの転写因子を高度に相互排他的に発現していることを 2 重蛍光免疫染色法で確認した。

(2) 形質制御転写因子の共発現が細胞株に及ぼす影響の解析

我々は、10 個の小細胞肺がん細胞株を用いて形質制御転写因子 (ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1、ATOH1) の相互排他的な発現を Western blot により確認した。転写因子の共発現が細胞毒性を来す可能性を考慮して遺伝子発現誘導システムを採用し、テトラサイクリン応答性に遺伝子発現を厳密に誘導するレンチウィルスプラスミド pInducer20 に上記 5 個の転写因子とコントロールとして EGFP を組み込み、全ての組み合わせの転写因子共発現細胞株を樹立した。興味深いことに、ASCL1+NEUROD1、ASCL1+YAP1、NEUROD1+ASCL1、NEUROD1+ATOH1 の組み合わせを中心に、内因性に発現している形質制御転写因子の発現が抑制され、かつ Viability の著しい低下とアポトーシスを生じることを見出した。このアポトーシスの誘導は、テトラサイクリンの濃度、すなわち外因性に導入された転写因子の発現量に依存していた。個々の転写因子がタンパク質レベルで直接に接触しないことを Proximity ligation assay で確認した。以下の研究は、最も強く細胞死が確認された ASCL1 と NEUROD1 の組み合わせに焦点を当てて実施した。

(3) 小細胞肺がん細胞株における ASCL1・NEUROD1 共発現による細胞死のメカニズムの解明

発現遺伝子の網羅的解析により、外因性の ASCL1 あるいは NEUROD1 の導入後に内因性の他方の転写因子の標的遺伝子群の発現が高度に抑制される結果を得た。この結果は、小細胞肺がんにおいて同一細胞に ASCL1 と NEUROD1 が共発現することで、もともとの細胞形質分化プログラムが破綻し細胞死が誘導されることを示唆していると考えられた。このアポトーシスの原因が、外因

性の形質制御転写因子導入による内因性形質制御転写因子の発現低下であるかを確認するため、CRISPR activation システムを用いて内因性の形質制御転写因子の発現を増強し、致死的な転写因子共発現の影響が救済されるかを確認した。しかし、内因性形質制御転写因子の発現救済は Viability 低下の約 10%を救済するのみであった。以上より、我々のモデルにおける細胞毒性には、内因性形質制御転写因子の発現抑制はごく一部に関与するのみで、大部分はゲノムワイドに生じる細胞分化プログラムの変化であると予想した。ASCL1 や NEUROD1 は Pioneer factor として知られることから、共発現したこれらの転写因子がクロマチン構造を直接的に改変して遺伝子発現プログラムを変化させている可能性が考えられるため、ASCL1 と NEUROD1 の共発現によるクロマチン構造のゲノムレベルでの変化を ATAC-seq 解析により明らかにし、これが特定のヒストン修飾因子と関連するかを含めて今後明らかにしていく予定である。また、ASCL1 と NEUROD1 が相互にゲノム上で直接的な Repressor として機能しているかどうか、およびこれらの転写因子が単独または共発現した際にクロマチン DNA との結合部位がどのように変化するかを、それぞれに対する抗体を用いた ChIP-seq 解析により確認する予定である。これらの結果を統合し、細胞形質維持に適さないクロマチンの構造改変と予想している我々のモデルにおける細胞死のメカニズムを解明し、それに関与するヒストン修飾酵素といった治療標的となりうる因子を同定することを引き続き目指す。

以上、本研究によって得られた成果により、小細胞肺癌において形質制御転写因子が相互排他的に発現している理由の一つとして、これらの転写因子が共発現することによる細胞分化プログラムの破綻が考えられた。これは、小細胞肺癌の臨床検体において大半を占める主要なサブタイプである ASCL1 および NEUROD1 の組み合わせで顕著な現象であり、臨床的な意義は大きいと考えられる。今後の研究でさらなる解析を進め、細胞分化プログラムの破綻をメカニズムとする新規の小細胞肺癌の治療法の開発に結実させたい。

<引用文献>

Rudin CM, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. Nat Rev Cancer. 2019;19;289-297.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------