

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15459

研究課題名(和文) 神経ガイダンス分子-受容体を標的とした新たな小細胞肺癌制御機構

研究課題名(英文) Regulation of small cell lung carcinoma cells by interference between axon guidance molecules and their receptors

研究代表者

伊藤 隆明 (Ito, Takaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70168392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経ガイダンス分子-受容体は、神経回路網形成だけでなく、腫瘍細胞の増殖やアポトーシスに関与しています。Draxinは、Netrin1と受容体のDCC、Neogenin等を共有しています。ヒト肺癌、特に、小細胞肺癌の増殖やアポトーシスの制御機構としての神経ガイダンス分子-受容体の意義を明らかにするために、本研究を行いました。小細胞肺癌では、これらガイダンス分子や受容体が発現していて、非小細胞肺癌の培養実験から、この経路は肺癌の増殖やアポトーシスに関与していることが明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：The axon guidance molecule-receptor system works not only in neural network formation, and but also in cancer cell proliferation and apoptosis. Draxin and Netrin1 share their receipt, DCC and Neogenin. This study was done to elucidate the significance of the guidance molecule-receptor system in lung cancer cell proliferation and survival. Western blotting and immunohistochemical studies revealed that small cell lung cancer and non-small cell lung cancer express these molecules. Though gene knockdown and over-expression studies using small cell lung cancer cell lines, using non-small cell lung cancer cell lines, we demonstrated that the system works in lung cancer cell proliferation and survival. And, it is suggested that Draxin could interact directly with Netrin1 in cancer cell proliferation.

研究分野：病理学

キーワード：小細胞肺癌 非小細胞肺癌 Draxin Netrin1 Neogenin DCC

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は高悪性度の腫瘍で、分子基盤を元にした画期的な治療法が期待されている(Pietanza et al., Clin Cancer Res 2015)。比較的大規模な小細胞肺癌症例を用いての driver mutation の探索研究からは、SOX2, NOTCH1, p53, FGFR1, PTEN 等とともに神経ガイダンス分子 SLIT1 が候補として示された (Rudin et al. Nature Genet 2012; Peifer et al. Nature Genet 2012; George et al. Nature 2015)。Slit1 を始め、神経ガイダンス分子は、脳の神経回路網形成に不可欠な分子群で、また、血管や上皮細胞の形成にも重要な働きをすることが知られている(Goshima, Ito, et al. J Clin Invest 2002)。腫瘍では、ガイダンス分子 Netrin1 は、受容体の deleted in colon cancer (DCC)などに結合することで、腫瘍細胞のアポトーシスを阻止する事が明らかになってきた(Mehlen et al. Nature Rev Cancer, 2011)。肺癌では、Netrin1 遺伝子ノックダウンや受容体 DCC 細胞外ドメインによるシグナル阻害により、非小細胞肺癌の生存が阻害されるが(Delloye-Bourgeoi et al. JNCI, 2009)、小細胞肺癌での神経ガイダンス分子-受容体を干渉しての研究成果は今日まで見られない。このことは、Netrin1-DCC のみを標的にしただけでは、小細胞癌への効果は見られないと事を示唆しているかもしれない。本研究の連携研究員の新明博士は、熊本大学在職中に Netrin1 と受容体を共有する新たなガイダンス分子 Draxin を発見し(Islam, Shinmyo, et al. Science 2009)、これは Netrin1 とは異なる受容体細胞外 domain と結合することを見いだした(Ahmed, Shinmyo et al., J Neurosci, 2011)。

2. 研究の目的

小細胞肺癌は高度悪性腫瘍であり、新たな治療標的分子システムの開発が待たれている。本研究では、神経ガイダンス分子-受容体系を阻害することにより小細胞肺癌の増殖制御をめざした研究である。ガイダンス分子 Netrin1 は、受容体 DCC を介して、様々な癌細胞のアポトーシスを阻害し、癌細胞の生存を維持しているが、この系の小細胞肺癌増殖維持機構としての意義は不明である。本研究は、ガイダンス分子として Netrin1 と受容体を共通にした Draxin も含め、また、受容体も DCC だけで無く、小細胞肺癌に発現する Neogenin にも注目

して、多面的なガイダンス分子-受容体系の阻害を試み、これにより小細胞肺癌細胞の生存維持の破綻を誘導できることを明らかにするとともに、新規治療法開発の基盤となる基礎実験を行う。

3. 研究の方法

1) 肺癌手術標本(ホルマリン固定、パラフィン切片)を用いて、これら受容体およびリガンドの発現パターンを明らかにする。染色結果が、組織型による特徴があるのか、患者個人ごとの腫瘍による個人差があるのか、染色性と組織内アポトーシス数に相違があるのか、等を明らかにし、将来の個別化医療の基礎的なデータを得る。

2) ヒト肺小細胞癌株および非小細胞癌細胞株における、ガイダンス分子 Netrin、Draxin および受容体 DCC、Neogenin の発現パターンを Western blotting を用いて解析する。

3) ヒト非小細胞癌および小細胞癌培養株で、siRNA を用いて Netrin、Draxin、DCC、Neogenin 遺伝子をノックダウンし、増殖能、アポトーシスに及ぼす影響を明らかにする。

4) ヒト小細胞癌培養株で、tet-on-Netrin、Draxin、DCC、Neogenin shRNA 遺伝子導入株を作成し、同様な in vitro 実験を行う。

5) 受容体の細胞外ドメインである、fibronectin(Fc) ドメイン、immunoglobulin(Ig)ドメインを decoy 蛋白質として作成し、非小細胞肺癌、小細胞癌の培養液に添加し、リガンド-受容体の干渉を行い、腫瘍細胞のガイダンス分子による抗アポトーシス機構の破綻を明らかにする。また、これら decoy 蛋白質の増殖や運動への影響も検討する。

6) ヒト小細胞癌培養株で、tet-on-Neogenin Fc domain shRNA、tet-on-Neogenin Ig domain 導入株を作成し、同様な in vitro 実験を行う。

7) ヒト小細胞癌培養株を免疫不全マウス皮下への移植実験を行い、Fc ドメイン、Ig ドメイン decoy 蛋白質を投与し、腫瘍発育への影響を観察する。

8) tet-on-Neogenin Fc domain、tet-on-Neogenin Ig domain 遺伝子導入株の免疫不全マウス皮下への移植実験を行い、腫瘍サイズの計測、肺など他の臓器への転移能の組織学的な検索を行う。

9) 標準的 Fmoc protocol を用いて、Netrin1 の EGF domain に結合する Draxin の 22-amino acid peptide (22aa) を作成する。22aa を、ヒト非小細胞癌および

小細胞癌培養株に 1, 10, 100 μ M の濃度で投与し、増殖能、アポトーシスに及ぼす影響を明らかにする。

以上のような研究より、非小細胞肺癌および小細胞癌の新たな治療戦略ターゲットとしてガイダンス分子(リガンド)-受容体干渉の意義を明らかにし、更に decoy 蛋白質の改良や、受容体ペプチドの開発、低分子化合物の開発に向けての基礎となる研究を進めたい。

4. 研究成果

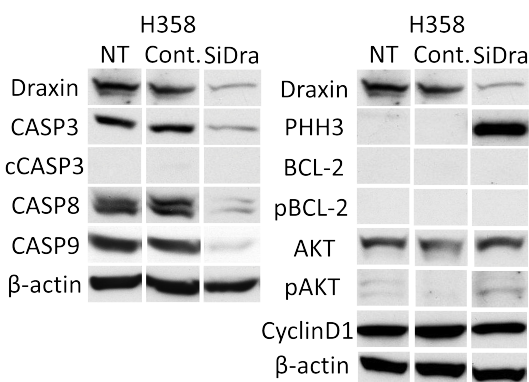
1) 肺癌の切除標本のホルマリン固定/パラフィン切片を用いて、Draxin, Netrin1, DCC, Neogenin の免疫染色を行ったところ、正常肺上皮組織では、Netrin1 は陽性であるが、Draxin, DCC, Neogenin は陰性であった。肺癌組織型別の陽性頻度は、以下の通りであった。

	Draxin	Netrin1	DCC	Neogenin
小細胞癌	45%	45%	0%	64%
腺癌	90%	30%	20%	67%
扁平上皮癌	90%	90%	65%	90%

小細胞肺癌では、Draxin, Netrin1, Neogenin で陽性所見が見られた。

2) 肺癌培養細胞株の Western blotting からの結果は、Draxin と netrin1 は全ての細胞株で陽性であり、DCC は非小細胞肺癌株に、Neogenin は小細胞肺癌株に発現が高かった。

3) ヒト非小細胞癌(H358)への Draxin siRNA 効果を Western blotting から検討した図を、次に示す。H358 細胞においては、Draxin siRNA は、リン酸化 histoneH3 の発現をあげた。Ki67 の陽性率が上がり、増殖能をあげた。また、caspase 3,8,9 の発現が低下し、アポトーシスを抑止することが示唆された。さらに、小細胞肺癌に置いても同様な実験を試みた。



4) ヒト小細胞癌培養株(H69, H889)で、tet-on-Draxin, Neogenin shRNA 遺伝子導入株作成を繰り返し試みるも作成できな

かった。

5) 受容体 Neogenin の細胞外ドメインである、Fc ドメイン、Ig ドメインを、pNC-His ベクターを用いて、decoy 蛋白質として作成をこころみた。Neogenin の Ig ドメインを、293T 細胞で作成し、この Ig ドメイン各種蛋白が Draxin に結合するものの、Neterin1 とは結合しないことがわかった。一方、Neogenin の Fc ドメインは、Draxin とは結合せず、Neterin1 と結合することを同様に、確認することが出来た。

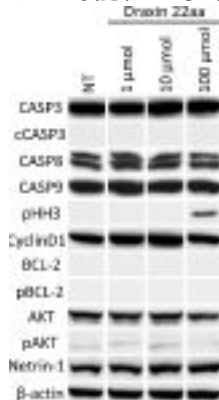
これら作成した各種 Neogenin の細胞外 Ig および Fc ドメインベクターを、Brevibacillus に導入し、目的ドメインタンパク質の菌体外への大量分泌を試みるも、目実験的に必要な蛋白の分泌を得ることが出来なかった。

6) ヒト小細胞癌培養株で、tet-on-Neogenin Fc domain shRNA、tet-on-Neogenin Ig domain 導入株を作成を試みるも、目的の細胞の作成は出来なかった。

7) ヒト小細胞癌培養株を免疫不全マウス皮下への移植実験を行い、Fc ドメイン、Ig ドメイン decoy 蛋白質を投与し、腫瘍発育への影響を検討する実験系を計画していたが、5) で報告したように、decoy 蛋白の作成・精製に失敗し、実験することが出来なかった。

8) tet-on-Neogenin Fc domain、tet-on-Neogenin Ig domain 遺伝子導入株の免疫不全マウス皮下への移植実験を行い、腫瘍サイズの計測、肺など他の臓器への転移能の組織学的な検索を行う計画を立てていたが、遺伝子導入株の作成が出来ず、実験することが出来なかった。

9) Neterin1 の EGF domain に結合する Draxin の 22aa を作成し、22aa の細胞増殖やアポトーシスに及ぼす影響を解析したところ、H358 細胞株では、増殖能へ影響する可能性が示唆された。



以上、ヒト小細胞肺癌での遺伝子導入実験がごとごとく成功せず、また、受容体に対する decoy 蛋白の作成を完成することが出来ず、本来の目的である、guidance 分子-受容体干渉による小細胞肺癌を制御の研究を十分に進めることが出来なかった。しかしながら、guidance 分子-受容体機構が、肺癌の増殖やアポトーシスに影響することは確かであり、小細胞癌には、Netrin, Draxin の発現とともに受容体の Neogenin の発現が明らかである。今後も、今回の研究成果を元にして、今回完成できなかった、実験を継続して行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Sato Y, Matsuo A, Kudo S, Liu F, Hasegawa K, Shinmyo Y, Ito T: Expression of Draxin in lung carcinomas. Acta Histochem Cytochem 査読有り, 51: 53-62, 2018

〔学会発表〕(計1件)

佐藤陽之輔、伊藤隆明、他：肺癌における新しいガイダンス分子であるドラキシンについて、第107回日本病理学会学術集会(札幌)平成30年6月22日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤隆明 (ITO Takaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70168392

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

松尾顕 (MATSUO Akira)

熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員

研究者番号：50735074

新明洋平 (SHINMYO Yohei)

金沢大学・医学保健研究域医学系・准教授

研究者番号：00418831

長谷川功紀 (HASEGAWA Koki)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50525798

(4)研究協力者

()