

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08777

研究課題名（和文）小細胞肺癌の遠隔転移形成機構の解析

研究課題名（英文）Analysis for the mechanism of distant metastasis in small cell lung cancer

研究代表者

坂本 修一（SAKAMOTO, Shuichi）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・主任研究員

研究者番号：60346070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小細胞肺癌の転移機構を解析するために、研究代表者等が独自に開発した小細胞肺癌の自然転移マウスモデル等を用い、これまでに見出していた候補遺伝子群について、転移形成への寄与を評価した。その結果、膜タンパク質をコードする2種の遺伝子を小細胞肺癌の新規転移促進因子として同定することに成功した。そのうちの1種については、小細胞肺癌細胞株において相互作用する別のタンパク質を質量分析により同定した。また、複数の遺伝子について、転移形成への影響をまとめてマウスモデルで評価する、簡便な手法を立ち上げることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌死の最大の原因である肺癌の約2割を占める小細胞肺癌は、高い転移性を示し極めて予後が悪い。2年生存率が20%以下という状況が長く続いており、新たな治療法の開発が求められている。小細胞肺癌の効果的な治療法を開発するためには、転移の機構を明らかにすることが非常に重要であるが、他の癌と比較して小細胞肺癌の転移機構は不明な点が多い。本研究で新たに同定した2種の転移促進遺伝子の機能を、今後より詳しく調べることで、治療法開発の手掛かりが得られると期待される。また、今回立ち上げた、複数の遺伝子の転移形成への影響を検討する手法は、新たな転移関連因子の同定に利用できるだろう。

研究成果の概要（英文）：Small-cell lung cancer (SCLC) accounts for approximately 20% of all lung cancer cases and one of the most severe malignancy with early and widespread metastasis. Previously, we developed a new orthotopic metastasis model of SCLC, and found four candidates of SCLC metastasis-associated gene by using the model. In this study, we assessed the role of the four genes in SCLC metastasis by using the xenograft models including the orthotopic model, and found that two genes promoted distant metastasis in the xenograft models. In addition, we developed a simple screening method for metastasis-associated genes using the metastatic model.

研究分野：実験病理学

キーワード：腫瘍 小細胞肺癌 自然転移モデル 治療標的 脳転移

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界の全がん死の最大の原因であり、その約2割を占める小細胞肺癌は、高い転移能と再発性ゆえに最も予後不良な難治性癌の一つとなっている。小細胞肺癌の治療では、外科的治療はあまり行われず、放射線や化学療法剤を用いた内科的治療が主体であるが、2年生存率が20%以下という極めて厳しい治療状況が30年以上続いている。したがって、小細胞肺癌の治療成績の改善のために転移の制御は重要な課題であるが、新たな治療法開発において必須な情報である小細胞肺癌の転移形成の分子メカニズムについては、研究が進んでいる乳癌や非小細胞肺癌と比較して、未解明な点が多く残されている。

転移は個体レベルの現象であるため、その解析には病態モデルマウスが不可欠な研究材料である。また、外科的治療が行われにくい小細胞肺癌においては、臨床サンプルが入手しにくいため、病態モデルマウスの重要性は他の癌と比べてより一層高い。そこで我々は、ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS273 を用い、独自の小細胞肺癌の自然転移モデルを開発した (Sakamoto *et al. Cancer Sci.* 2015)。本モデルは、以下のような特徴がある。(1) 肺に同所移植巣を形成させるため、尾静脈注入や皮下移植等による実験転移モデルと比べてより臨床の転移に近い。(2) 転移先臓器 (骨、副腎、脳、リンパ節等) が小細胞肺癌の臨床像と一致する。(3) 他の小細胞肺癌の同所移植モデルと比較して本モデルは遠隔転移能が高く、転移解析に適している。(4) 我々が知るかぎり唯一の脳転移巣形成能を持つ小細胞肺癌の自然転移モデルである。

本モデルを用いて、研究代表者らは、小細胞肺癌の転移関連因子の探索を行っている。すなわち、『同所移植巣と骨転移巣・副腎転移巣との遺伝子発現プロファイルの比較』及び『同所移植巣と骨転移巣・副腎転移巣との遺伝子発現プロファイルの比較』を行い、さらに癌組織でのタンパク質の発現量や臨床データを考慮して絞り込んだ結果、膜タンパク質3種並びに Small GTPase タンパク質1種の計4種の遺伝子を小細胞肺癌の新たな転移関連因子候補として見出していた。

2. 研究の目的

(I) 上記のこれまでに見出していた 小細胞肺癌の転移関連因子候補 の遠隔転移形成への寄与について検討する。

(II) 本モデル及び DMS273 由来転移性亜株の特色である、自然転移モデルにおける脳転移形成能を活用し、脳転移形成に重要な因子 の探索も行う。

3. 研究の方法

(I) 転移関連因子候補4遺伝子について、ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS273 細胞及びその高転移性亜株にレンチウイルスベクターによる shRNA 導入を行ってノックダウン株を作成す

る。ノックダウン株を用いて同所移植モデル等を作成し、遠隔転移形成に与える影響を検討する。転移能に影響が見られた遺伝子については、レンチウイルスベクターによる cDNA 導入を行って過剰発現株を作成し、同所移植モデルなどでの遠隔転移形成への影響を確認する。さらに、in vitro において細胞増殖や Wound healing assay による運動能、Matrigel invasion assay による浸潤能などを評価する。

(II)同所移植モデルの脳転移巣より癌細胞を回収し、再度同所移植を行って、形成された脳転移巣より癌細胞を回収する、という in vivo 選択により複数の小細胞肺癌細胞株より脳指向性亜株の樹立を試みる。得られた亜株と親株の遺伝子発現プロファイルを比較し、脳指向性亜株で高発現している遺伝子群をピックアップし、脳転移形成への寄与を評価する。

4. 研究成果

(I) 転移関連因子候補の遠隔転移形成への寄与の検討

本課題の開始時点で見出していた4種について DMS273 細胞あるいはその高転移株での shRNA ノックダウン株をそれぞれ作成し、同所移植モデルでの遠隔転移形成能を評価したところ、IFITM1 及び A の2種の膜タンパク質遺伝子のそれぞれのノックダウン株で転移形成能の低下が認められた。この2種について、DMS273 細胞での過剰発現株を作成したところ、いずれも同所移植モデルにおける遠隔転移形成能が向上した。さらに、これらの過剰発現株は尾静脈注入による肺転移モデルにおいても転移能の向上がみられた。以上の結果から、膜タンパク質2種は DMS273 細胞の遠隔転移形成を促進する因子であることが示された。

IFITM1 のノックダウン株及び過剰発現株については、in vitro での増殖や、運動能、並びに浸潤能の評価を行ったが、これまでのところ顕著な変化は見出せていない。また、過剰発現株については皮下移植による in vivo での腫瘍増殖を検討したが、やはり有意な影響は観察されなかった。これらの結果から、IFITM1 は腫瘍増殖や運動・浸潤とは異なる性質に影響することで転移を促進させている可能性が示唆された。

また、IFITM1 はインターフェロンにより発現誘導されることが知られていたため、DMS273 細胞における IFN α 、IFN β 、IFN γ 処理による誘導を調べたところ、いずれのインターフェロンによっても顕著に発現が誘導されることが分かった。

DMS273 細胞に加えて、別のヒト小細胞肺癌細胞株 NCI-H69 でも IFITM1 過剰発現株を作成し、尾静脈注入による多臓器転移モデルにて転移形成への影響を検討したところ、やはり転移形成が促進された。

さらに、小細胞肺癌患者の肺腫瘍組織をスポットした市販の組織マイクロアレイについて、抗 IFITM1 抗体の免疫染色により発現を検討したところ、約3割のスポットで発現が認められたが、正常肺組織では発現がみられなかった。小細胞肺癌の転移巣は入手が難しいため、

同所移植モデルの転移能と対応する同所移植巣について免疫染色を行ったところ、同所移植巣よりも転移巣で発現が増加していることが確認できた。

以上の IFITM1 についての結果をまとめた論文を現在投稿中である。

また、IFITM1 の機能を明らかにするために、DMS273 細胞内で相互作用するタンパク質の探索を行った。すなわち、タグを付加した IFITM1 を DMS273 細胞に過剰発現させ、タグに対する抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈してきたタンパク質群を質量分析法により同定したところ、膜タンパク質 B が含まれていることが分かった。膜タンパク質 B に対する抗体で免疫沈降を行ったところ、IFITM1 が共沈してくることが確認できた。これらの結果から、膜タンパク質 B が IFITM1 と相互作用している可能性が考えられた。現在 B の DMS273 細胞の転移能への寄与の有無を検討中である。

(II) 小細胞肺癌の脳転移形成に重要な因子の探索

DMS273 細胞の同所移植モデルを用いた *in vivo* 選択により脳指向性亜株の樹立を試みたが、脳転移能が特異的に向上した亜株はこれまでのところ得られていない。

同所移植以外の、尾静脈注入などの他の移植方法も検討したところ、左心室注入による移植モデルが、脳を含めた多臓器への転移をより観察しやすいことが分かった。そこで、これまでに転移への影響を解析した 5 種の遺伝子のそれぞれの過剰発現株を混合して左心室に接種し、形成された転移巣での 5 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で測定したところ、同所移植モデルで転移形成を促進した遺伝子の存在比が高くなっていた。この結果から、この系により複数の遺伝子の転移能への影響をまとめて評価することが可能と考えられた。今後この系を利用して脳転移形成に重要な因子を探索する予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kohda Y, Sakamoto S (Corresponding author), Otuka Y, Sawa R, Kubota Y, Igarashi M, Muramatsu H, Iijima M, Kawada M.	4. 巻 73
2. 論文標題 A new indole glycoside from Kitasatospora sp. MG372-hF19 carrying a 6-deoxy- -l-talopyranose moiety.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Antibiotics	6. 最初と最後の頁 167-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-019-0258-9	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 Sakamoto S, Inoue H, Kaneko MK, Ogasawara S, Kajikawa M, Urano S, Ohba S, Kato Y, Kawada M.	4. 巻 110
2. 論文標題 Generation and evaluation of a chimeric antibody against coxsackievirus and adenovirus receptor for cancer therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3595-3602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14196	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 Kawada M, Atsumi S, Wada S., Sakamoto S.	4. 巻 71
2. 論文標題 Novel approaches for identification of anti-tumor drugs and new bioactive compounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Antibiotics	6. 最初と最後の頁 39-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ja.2017.97	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Kawada, Shuichi Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Mika K. Kaneko, Satoshi Ogasawara, Masunori Kajikawa, Sakiko Urano, Shun-ichi Ohba, Yukinari Kato
2. 発表標題 Development of a mouse-human chimeric antibody against human CXADR having a potent anti-tumor activity in animal models
3. 学会等名 AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本 修一、川田 学
2. 発表標題 IFITM1は小細胞肺癌異種移植モデルの遠隔転移形成を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修一、井上裕幸、大庭俊一、宇佐美伊保美、幸田泰子、川田学
2. 発表標題 膜タンパク質IFITM1は小細胞肺癌の転移モデルにおいて遠隔転移形成を促進する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修一、井上裕幸、大庭俊一、宇佐美伊保美、幸田泰子、水谷壮利、川田学
2. 発表標題 小細胞肺癌の自然転移モデルにおいて転移形成に關与する因子の探索
3. 学会等名 平成30年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修一、川田学
2. 発表標題 ヒト小細胞肺癌の自然転移モデルを活用した転移關与因子の同定
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本修一、川田学
2. 発表標題 小細胞肺癌の同所移植モデルの転移巣において高発現する遺伝子の探索
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本修一、川田学
2. 発表標題 自然転移モデルを用いた小細胞肺癌の転移関連因子の探索
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本修一、川田学
2. 発表標題 独自の自然転移モデルを活用した小細胞肺癌の転移関与因子の探索
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所沼津支所 研究概要
<https://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/summary.html>
 沼津支所研究概要
<http://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/summary.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----