

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06996

研究課題名(和文) 神経内分泌肺癌発生過程においてRB1遺伝子ファミリーの機能異常がもたらす分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of neuroendocrine lung carcinogenesis in association with dysfunction of RB1-family proteins

研究代表者

矢澤 卓也 (YAZAWA, TAKUYA)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経内分泌肺癌では高率にRB1遺伝子異常が検出される。また近年のマウス神経内分泌肺癌作製モデル、肺腺癌分子標的治療後に発生する神経内分泌癌の解析からも、神経内分泌肺癌形成におけるRB1遺伝子ファミリーの異常の重要性が示唆されている。しかし神経内分泌癌発生におけるRB1ファミリー遺伝子異常の分子病理学的機序についてはこれまで全く明らかになっていない。本研究の推進により、肺癌細胞にRB1遺伝子ファミリーの遺伝子編集を行うことにより、上皮間葉転換に関与する遺伝子発現が亢進すること、P53遺伝子編集を追加することにより神経特異的転写因子の導入に伴う神経内分泌マーカーの発現性が増すことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌に対する分子標的治療は著しい進歩を遂げている一方で、神経内分泌肺癌の予後は未だに不良である。神経内分泌肺癌に対する治療法の開発が進まない原因として、その発生機序に不明な点が多いことで挙げられる。本研究では、神経内分泌肺癌の発生に重要とされているRB1遺伝子ファミリーの異常が肺癌細胞に惹起する現象について、分子病理学的に解析を行った。その結果、RB1遺伝子ファミリーの異常により上皮間葉転換に関与する遺伝子発現が亢進すること、またRB1異常にP53遺伝子異常を追加することにより、神経特異的転写因子の導入に伴う神経内分泌マーカーの発現性が増強することが判明した。

研究成果の概要(英文)：RB1 inactivation was frequently defined in neuroendocrine lung cancers (NE-LC). Recent cancer researches in mouse NE-LC models and carcinogenesis of NE-LC after gene-targeting therapy against lung adenocarcinomas strongly suggest importance of inactivation of RB1 family genes in carcinogenesis of NE-LC. However, the precise molecular mechanisms how the abnormality of RB1 family genes is associated with carcinogenesis of NE-LC remain unresolved. Our investigation using cultivated lung cancer cells clarified that expression of genes involved in epithelial to mesenchymal transition is up-regulated by inactivation of RB1 family genes and that the expression of neuroendocrine marker genes in association with forced expression of neural cell-specific transcription factors is accelerated by co-inactivation of P53 gene.

研究分野：分子病理学

キーワード：肺癌 神経内分泌肺癌 RB1遺伝子ファミリー 分化

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌肺癌における高率な RB1 遺伝子異常の存在は周知の事実であるが、近年のゲノム医学や遺伝子操作技術の進歩は、RB1 遺伝子異常に加え非神経内分泌肺癌と同様の遺伝子異常を有する神経内分泌肺癌の存在や、RB1 遺伝子ファミリーの異常を伴う非神経内分泌細胞からも神経内分泌肺癌が発生する事実を我々に知らしめることとなり、神経内分泌肺癌の発生起源を神経上皮体に求めていた既成概念を根底から揺るがしている。我々はこれまで神経特異的転写因子 POU3F4/4F2 が非神経内分泌肺癌細胞を神経内分泌肺癌へと形質転換しうることを報告したが、その現象は RB1 遺伝子ファミリーの機能不全を伴う未分化肺癌細胞に限定的であった。これらの知見は、神経内分泌肺癌の発生や非神経内分泌肺癌細胞から神経内分泌肺癌への形質転換には RB1 遺伝子ファミリーの機能不全に伴う未知なる分子基盤が必要であることを示唆していた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、神経内分泌肺癌発生過程において RB1 遺伝子ファミリーの機能異常が肺癌細胞にもたらす分子基盤を明らかにすることを主目的として、以下の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 非神経内分泌肺癌細胞 (A549, H358, PC9) において、RB1 遺伝子ファミリーである RB1 あるいは P130 の遺伝子編集を行うことにより惹起される増殖能および遺伝子発現変化について検討した。

(2) 上記の遺伝子編集癌細胞に対し、神経特異的転写因子である 3 型 POU 遺伝子、4 型 POU 遺伝子を強制発現させることによる神経内分泌癌細胞への形質転換を試みた。

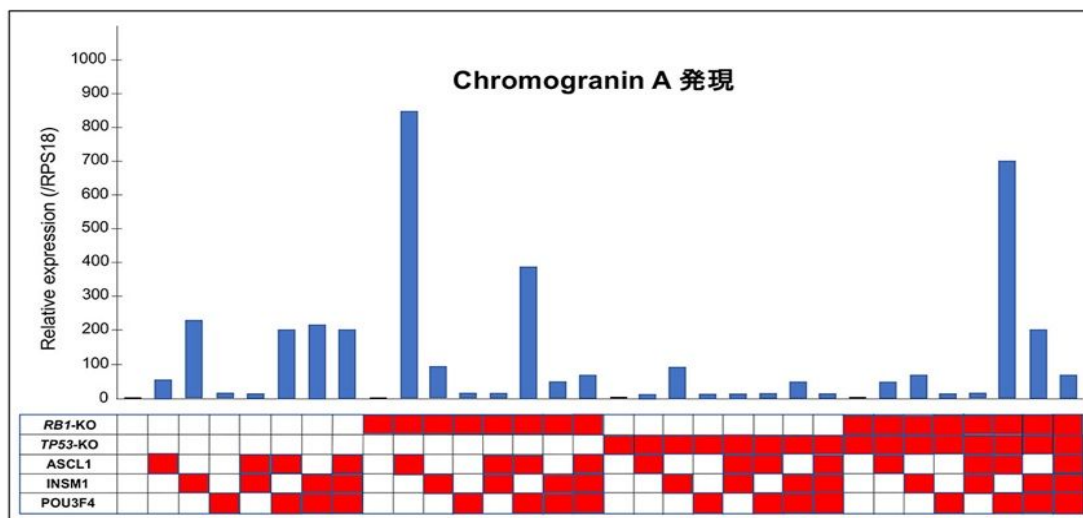
(3) 神経内分泌癌に高頻度に見られる遺伝子変異には RB1 に加え TP53 がある。コンディショニングノックアウトマウスを用いた神経内分泌肺癌作製モデルによれば、肺上皮細胞に RB1 及び TP53 遺伝子変異を惹起させることにより神経内分泌肺癌が発生するとの報告がある。そこで非神経内分泌肺癌細胞 A549 を用いて TP53 遺伝子編集癌細胞、RB1 及び TP53 遺伝子編集癌細胞の追加樹立を試み、3 型 POU 遺伝子である POU3F4 に加え、同じく神経特異的転写因子である ASCL1 及び INSM1 遺伝子を強制発現させることによる神経内分泌癌細胞への形質転換を試みた。

4. 研究成果

(1) RB1 ノックアウト癌細胞、P130 ノックアウト癌細胞、RB1/P130 ダブルノックアウト癌細胞いずれにおいてもその増殖能や細胞周期に有意な変化は現れないことが明らかになった。しかし一方で、RB1 あるいは/及び P130 をノックアウトした癌細胞では 上皮間葉転換に参与する遺伝子である N-cadherin、SNA12 等の発現亢進が認められた。A549 細胞について Genechip 解析を行ったところ、RB1 ノックアウトにより SNA12 の発現は約 11 倍、N-cadherin の発現は約 7 倍に上昇していた。

(2) RB1 遺伝子ファミリーのゲノム編集を施した肺腺癌由来癌細胞に対し、神経特異的転写因子である 3 型 POU 遺伝子、4 型 POU 遺伝子を導入したところ、多少の神経内分泌マーカー分子の発現亢進は見られるものの、著しい形質転換現象は惹起されなかった。

(3) RB1 遺伝子あるいは/及び TP53 遺伝子をノックアウトした状態において、クロモグラニン A の発現は、RB1 変異に ASCL1 発現及び POU3F4 発現が加わることにより有意に亢進していた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢澤卓也
2. 発表標題 神経内分泌肺癌の組織発生、最近の進歩
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井順、矢澤華子、柏木維人、鈴木盛一郎、平松千恵、岩本雅美、太田昌幸、正和明哲、矢澤卓也
2. 発表標題 小細胞肺癌細胞集団におけるDLK1陽性細胞は増殖に寄与する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤美桜、原田慎也、石井順、矢澤華子、柏木維人、鈴木盛一郎、岩本雅美、正和明哲、太田昌幸、矢澤卓也
2. 発表標題 内分泌顆粒形成を制御する2遺伝子：PROX1およびREST
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤卓也
2. 発表標題 分子病理学から見た神経内分泌腫瘍の組織発生
3. 学会等名 第23回日本臨床内分泌病理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤華子、柏木維人、石井順、平松千恵、菅間博、矢澤卓也
2. 発表標題 POU3F4およびPOU4F2強制発現に伴い共通して活性化する転写因子HES5の制御による神経内分泌形質の減弱化
3. 学会等名 第22回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正和明哲、矢澤卓也、矢澤華子、石井順、柏木維人、石井芳樹
2. 発表標題 RB1ファミリーの活性化が細胞増殖やEMTに及ぼす影響
3. 学会等名 第59回日本呼吸器病学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤卓也
2. 発表標題 臓器病理学の最近の進歩 12内分泌 神経内分泌肺癌の組織発生 最近の進歩
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井順、矢澤華子、柏木維人、鈴木盛一郎、平松千恵、岩本雅美、太田昌幸、正和明哲、矢澤卓也
2. 発表標題 小細胞肺癌細胞集団におけるDLK1陽性細胞は増殖に寄与する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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 華子 (佐藤) (Yazawa Hanako) (60438132)	獨協医科大学・医学部・講師 (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
---------	---------