

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08162

研究課題名(和文) 小細胞肺癌に発現する下垂体分化制御因子を指標とした抗がん剤スクリーニング

研究課題名(英文) Anticancer drug screen in small cell lung cancer using a pituitary differentiation regulators as an indicator

研究代表者

末永 雄介 (Suenaga, Yusuke)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ 発がん制御研究部・研究員

研究者番号：80581793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌は最も生存率が低い肺癌であり、化学療法や放射線療法といった古典的な治療法以外に有効な治療法はない。我々は、小細胞肺癌の一群が下垂体前葉の発生初期を制御する転写因子を高発現し、90%以上の5年生存率を示すことを発見した。本研究では、小細胞肺癌の分化や脱分化を誘導することで、治療感受性を増強できるかを調べた。その結果、一部の小細胞肺癌細胞では3次元培養により、下垂体分化経路の活性化が起こり、神経分化が誘導されることが明らかになった。また、薬剤スクリーニングにより神経分化後の小細胞肺癌細胞では神経のシナプスやスパイン形成に重要な因子の阻害剤が細胞増殖を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性がんの一部は神経分化し、ホルモンを産生する。このような癌は神経系以外からも発生するが、どのような機構で癌細胞が神経分化するのかわかっていない。我々は肺癌において下垂体発生経路が活性化され、神経分化とホルモン産生が促進されることを発見した。本研究では、肺癌の治療薬を開発することを目的とし、下垂体発生経路を阻害する薬剤を化合物ライブラリーからスクリーニングした。その結果、神経細胞で重要なシナプスやスパイン形成の阻害剤が神経分化した肺癌において有効な薬剤候補である可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung cancer is the lung cancer with the lowest survival rate, and there is no effective treatment other than classical therapies such as chemotherapy and radiation therapy. We found that a subgroup of small cell lung cancers highly express a transcription factor that regulates the early development of the anterior pituitary gland and have a 5-year survival rate of more than 90%. In the present study, we induced differentiation or dedifferentiation of small cell lung cancer to enhance therapeutic sensitivity. As a result, we found that 3D culture of some small cell lung cancer cells activated the pituitary differentiation pathway and induced neuronal differentiation. In addition, drug screen revealed that inhibitors of factors important for neural synapse and spine formation suppressed cell proliferation in the differentiated small cell lung cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：小細胞肺癌 下垂体 ホルモン シナプス スパイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

●小細胞肺癌の一部は下垂体前葉ホルモンACTHを過剰産生する

ACTHの過剰産生は副腎皮質からのコルチゾール産生を促し、血中コルチゾール値が異常に高くなるクッシング症候群を引き起こす。クッシング症候群の肺癌患者が最初に報告されたのは今から約90年前のことであり (Brown *et al.*, *Lancet* 1928)、その後、小細胞肺癌細胞そのものがACTH産生することが明らかになった (Liddle *et al.*, *Arch Intern Med* 1963)。さらに、最近になって、ACTH前駆体である Pro-opiomelanocortin (POMC) の血中濃度が高い患者では小細胞肺癌が高頻度で肝転移し、全生存率が低いことが報告された (Stovold *et al.*, *Br J Cancer* 2013)。このように小細胞肺癌の一部はACTHやその前駆体POMCを過剰産生し、小細胞肺癌の悪性化に関与することがわかったが、肺から発生する癌であるにも関わらず、そもそもなぜ下垂体前葉ホルモンを産生できるのかは明らかにされていない。

●小細胞肺癌の体細胞突然変異は下垂体発生経路に集中する

我々は肺腺癌 346 検体と小細胞肺癌 71 検体の全エクソームデータを解析し、小細胞肺癌では下垂体前葉の発生を制御する転写因子 PAX6、LHX3 の下流遺伝子に体細胞突然変異が有意に蓄積することを見出した。さらに、PAX6、LHX3 は小細胞肺癌で高発現し、下流遺伝子には転写が引きこす変異の特徴 (A から G への変異が転写の鑄型鎖に比較し非鑄型鎖で多いという現象、Haradhvala *et al.*, *Cell* 2016) が検出された。これらの結果から、小細胞肺癌が発癌過程で PAX6、LHX3 を転写活性化し、下垂体分化経路 (図 1A) を利用して神経分化する可能性が示唆された。

●小細胞肺癌で 5 年生存率 90%以上の一群を同定

下垂体発生の後期に働く転写因子である NEUROD1 と ASCL1 (図 1A) は小細胞肺癌の神経内分泌マーカーの発現を維持し、細胞生存に必要であることが示されている (Osada *et al.*, *Cancer Res* 2005; Borromeo *et al.*, *Cell Reports* 2016)。患者の生存率とこれら下垂体発生を制御する転写因子との関係を調べたところ、口腔上皮の発現パターン (*OTX2*、*PAX6* mRNA 高発現) を示す検体では 5 年生存率が 90%以上であることを発見した (図 1B)。よって小細胞

肺癌が下垂体発生経路を使用でき、分化の成熟度が増すほどに患者の生命予後が不良になる可能性が考えられた。また、下垂体発生経路を阻害する化合物が得られれば、小細胞肺癌の良い治療薬になるのではないかと着想した。

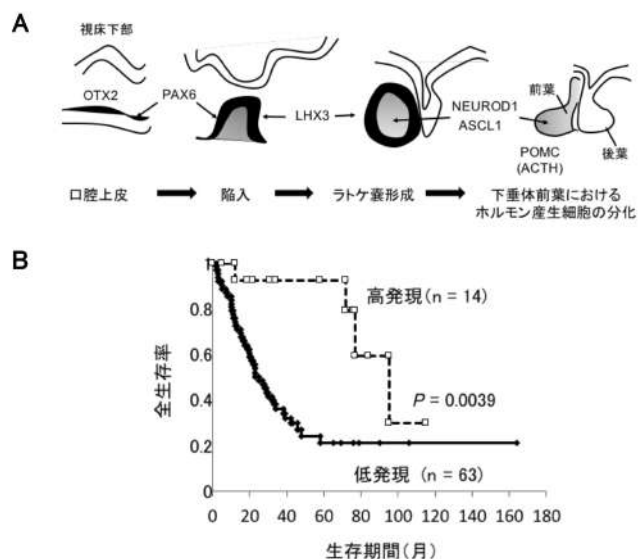


図1. 下垂体分化経路と小細胞肺癌の予後

(A) 下垂体前葉の発生過程と主な転写因子の発現。口腔上皮では *OTX2*、*PAX6*、ラトケ嚢形成期では *LHX3*、それ以降の成熟期では *NEUROD1*、*ASCL1* が発現する。(B) 下垂体発生初期の転写因子 (*OTX2*、*PAX6*、*LHX3*) の高発現は良好な予後と関連する。

2. 研究の目的

本研究の目的は下垂体分化経路を阻害する化合物を探索し、小細胞肺癌の薬剤候補を同定することである。小細胞肺癌において治療効果が証明された分子標的治療は未だに存在せず、非小細胞肺癌に比べ(Lynch *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2012)、小細胞肺癌では免疫チェックポイント阻害剤の治療効果も限定的である(Reck *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2016)。よって、小細胞肺癌の患者は他の癌腫で見られるような近年のがん治療の進展の恩恵を受けていない。本研究により同定された化合物が小細胞肺癌の進展を抑制することが明らかになれば、薬剤による下垂体分化経路の阻害という全く新しい戦略を小細胞肺癌治療に提供することができると考えた。

3. 研究の方法

神経分化させた小細胞肺癌の増殖を特異的に阻害する化合物をライブラリーからスクリーニング

SBC3とSBC5細胞の3次元培養を行い神経分化を誘導し、親株に比較して細胞生存を低下させる化合物を探索する。96 well plate に1000細胞/wellで播種し、化合物を5 μ Mで添加、MTT 試薬により細胞生存に与える影響を調べた。化合物ライブラリーは、既知の制がん剤を含む384種の化合物ライブラリー及びエピジェネティクス関連ライブラリー80種を用いた。

4. 研究成果

1) 2次元培養で下垂体ホルモンを発現しない小細胞肺癌細胞株も3次元培養では発現が誘導される

肺癌が神経内分泌細胞様に分化する機構として、神経分化に関与する転写因子ASCL1とNEUROD1が小細胞肺癌において発現上昇し、細胞生存を維持することが報告されている(Osada *et al.*, *Cancer Res* 2005; Borromeo *et al.*, *Cell Reports* 2016)。これら転写因子は下垂体発生においてPAX6とLHX3の下流に位置し、より分化した細胞で発現する(図1A、Prince *et al.*, *Nat Rev Endocrinol.* 2011)。我々は小細胞肺癌16細胞株においてこれら5つの転写因子の発現量を調べ、二つの小細胞肺癌株(SBC3、SBC5)では2次元培養においてASCL1、NEUROD1、POMCが全く発現せず、下垂体初期の転写因子(OTX2、PAX6、LHX3)を高発現することを見出した(図2)。しかし、低接着プレートを用いた3次元培養では、これら細胞株でもASCL1、NEUROD1、POMCの発現が誘導され多くの小胞が形成された(図3)。この小胞は胚性幹細胞から*in vitro*で下垂体を

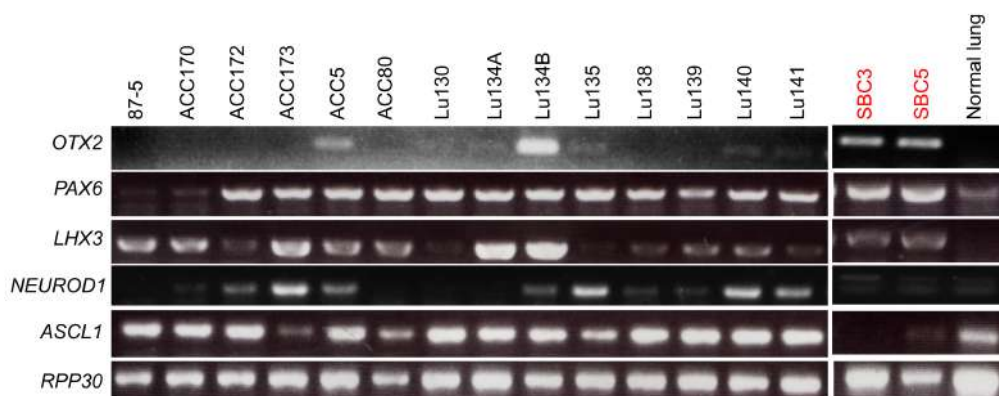


図 2. 小細胞肺癌株における下垂体発生を制御する転写因子の発現量。RT-PCR。

分化させるときに観察されるラトケ嚢様小胞に類似している(Ozone *et al.*, *Nature Commun* 2016)。ラトケ嚢は個体発生において、口腔外胚葉が下垂体前葉に分化する時に現れる構造であり(図1A)、小細胞肺癌の細胞塊に現れた小胞も、このラトケ嚢に類似した機能を持つ小胞ではないかと考えられた。

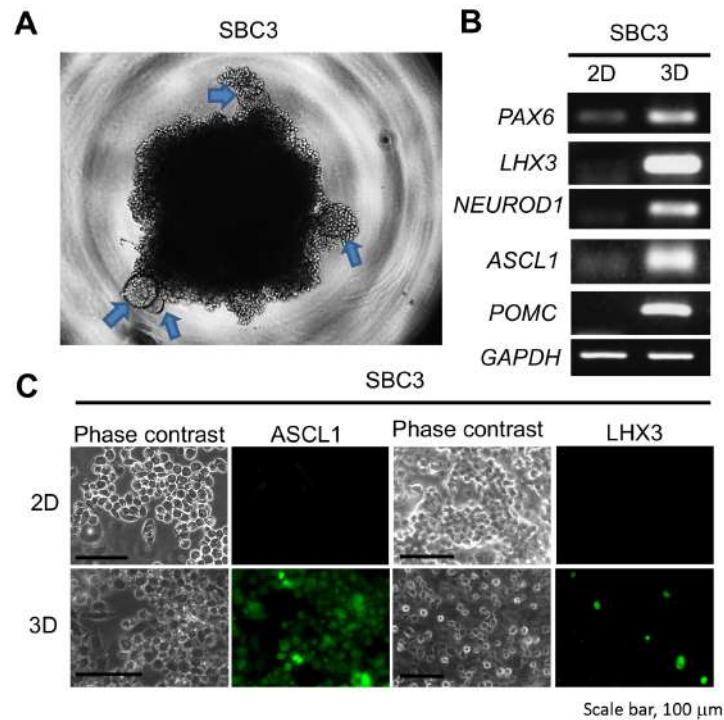


図3 三次元培養による小細胞肺癌細胞の小胞形成と下垂体分化
 A. 低接着プレートで3次元培養後7日、多数の小胞を認める(矢印)
 B. RT-PCR. 転写因子とPOMC発現は3次元培養(3D)で上昇する。
 C. 免疫染色。ASCL1とLHX3は3次元培養により誘導される。

2) 神経分化誘導後の小細胞肺癌株を用いた化合物スクリーニング

SBC3 および SBC5 細胞を 2 か月間 3 次元培養し、再び 2 次元で接着培養すると、全ての細胞が分泌顆粒を持ち、その後も安定的に POMC 発現量が高く維持され、分化状態が保持された。この 3 次元培養(3D)を 2 か月(2Mo)行い、下垂体分化経路を活性化した細胞株を 2Mo3D と名付け、親株(SBC3 と SBC5)と比較し 2Mo3D で殺細胞効果が高い化合物を探索した。下垂体分化経路を活性化した細胞(2Mo3D)において細胞死を誘導する化合物を探索するため、2Mo3D 及び親株の細胞懸濁液を 1000 細胞/well で 100μl ずつ 96 well plate に播種し、翌日、5μM で化合物を処理、6 日後、各 well に 10μl の検出試薬を加え、37 度の CO2 インキュベーターで 4 時間静置した(MTT アッセイ)。プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、コントロール(化合物未処理、または DMSO のみ添加)に比較し吸光度を低下させる(殺細胞効果または細胞増殖抑制効果がある)化合物を同定した。その結果、2Mo3D では Ca²⁺-PKC シグナルの阻害剤、CAMKII, Ca ionophore などの阻害剤が親株に比較して細胞増殖を抑制し、神経分化に伴い、神経のシナプスやスパイン形成に重要な因子の阻害剤が細胞増殖を抑制することが示唆された。

これらの結果から神経活動が小細胞肺癌の細胞生存または増殖に寄与する可能性が示唆された。今後、小細胞肺癌が神経ネットワークを形成するかや、神経活動が小細胞肺癌の悪性化に寄与するかを研究する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Suenaga, Masato Shingyoji, Sotaro Kanematsu, Toshihiko Iizasa, Mamoru Kato, Sana Yokoi
2. 発表標題 Inhibitors of pituitary differentiation reduce cell proliferation of small cell lung carcinomas
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 末永 雄介、新行内 雅斗、兼松 宗太郎、飯笹 俊彦、加藤 護、横井 左奈
2. 発表標題 肺癌の神経内分泌性格を制御する分子機構の解析
3. 学会等名 第27回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018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	横井 左奈 (Yokoi Sana) (30372452)	千葉県がんセンター(研究所)・遺伝子診断部・部長 (82504)	

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