

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590926

研究課題名（和文）小細胞肺癌の多機能幹細胞からの発生・分化機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文） Neuroendocrine differentiation from multipotent cancer stem cell in small cell lung cancer: elucidation of mechanisms and application to treatment

研究代表者

堀尾 芳嗣 (HORIO YOSHITSUGU)

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号：30344336

研究成果の概要：EGFR-TKI 長期投与した肺腺癌患者の経過中、原発の腺癌部に小細胞肺がんが発生。その切除標本の解析から EGFR 遺伝子 L858R 変異を腺癌と小細胞肺癌に共通して認め、免疫染色検査で小細胞肺癌は EGFR 遺伝子と Notch3 遺伝子発現の消失と Ash1 遺伝子発現陽性、腺癌は逆の染色パターンであった。肺癌幹細胞からの腺癌への分化と小細胞肺癌への分化を示す癌化過程を示す症例と考えられた。非小細胞肺癌の発ガンにおいて Notch-3 は重要であるが、細胞株で RT-PCR 法での発現とトポイソメラーゼ II 阻害剤の感受性との相関は見られなかった。交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌、幹細胞、分化、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

癌は、幹細胞に遺伝子的・非遺伝子的変異が蓄積することにより発生・進展する (Feinberg AP, et al., Nature Reviews Genetics, 2006)。肺における正常幹細胞は、消化管や膵臓などの他臓器における幹細胞と同様、Niche(微小環境)と幹細胞との相互作用により、その維持・分化が行われ、その分子レベルの制御機構は胎生期の肺の発達段階における制御機構に極めて類似している (Borok Z, et al., Pediatric Res., 2006)。トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを利用したマウス肺の発生学により、

幹細胞の存在の確認、幹細胞維持機構と幹細胞から成熟細胞への分化が徐々に明らかになり、Notch、Sonic Hedgehog、Wnt、BMP 等各シグナル伝達系の重要性が明らかになった (Griffiths MJ, et al., Lancet, 2005)。その他、マウス肺の発生においては内胚葉から lung bud へは HoxB4 や B5 など、lung bud からの分化には HoxB3、TTF1 (NKX2.1)、HNF3alpha、HNF3beta、GATA-6、SP-A、B、C、D や CC10 などの転写因子群が重要である (Nakamura N, et al., Cell Growth Diff., 2002, Costa RH, et al., Am J Physiol Cell Mol Physiol, 2001, Warburton D, et al., Am

J Physiol Cell Mol Physiol, 1999)。

Notch シグナル伝達系分子である DSL-ligand, Notch, HES などの分子のノックアウトマウスでは神経系の過形成、とりわけ肺では PNEC (Pulmonary neuroendocrine cell) の過形成が見られる一方、Notch1, 3 と HES1 発現細胞は非神経内分泌系分化細胞に分化していることより、Notch 経路は分化の制御因子の 1 つと考えられている (Linnoila RI, et al., Lab. Invest., 2006)。

神経内分泌系肺腫瘍の発生・進展の解明も進んでいる。マウスモデルにおいて、まず、Rb 遺伝子のヘテロマウスと p53 遺伝子のノックアウトマウスを掛け合わせたマウスでは気管支において神経内分泌系細胞の過形成が認められ (Williams BO, et al., Nat. Genet., 1994)、Rb 遺伝子と p53 遺伝子の 2 つの遺伝子を肺上皮細胞でコンディショナルに欠損させたマウスにおいてヒト小細胞肺癌に類似した腫瘍が形成され、さらに脳や肝臓などに転移巣を形成することが証明されている (Meuwissen R, et al., Cancer Cell, 2003)。また、神経内分泌系分化誘導転写因子 ASH1 のノックアウトマウスでは PNEC が欠損すること報告され (Borges M, et al., Nature, 1997)、さらに、末梢気管支上皮細胞特異的 CC10 プロモーターに神経内分泌系へ分化誘導する重要な転写因子である hASH1 をつないで作成された CC10-hAsh1 トランスジェニックマウスと CC10-SV40 Large TAg トランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスでは神経内分泌系分化を伴う肺腺癌を形成された (Linnoila RI, et al., Cancer Res., 2000)。これらの報告より、神経内分泌系腫瘍の発癌過程においては、ASH1 の発現が重要であり、小細胞肺癌ではさらに Rb、p53 両遺伝子の不活化が必要と考えられている。

我々のグループでは、神経内分泌系分化を有する肺癌細胞に対して ASH1 の発現を抑制することで *in vitro* での増殖抑制とアポトーシスの誘導、*in vivo* での造腫瘍性の抑制を明らかにしてきた (Osada H, et al., Cancer Research, 2005)。我々は現時点で幹細胞から神経内分泌系腫瘍の代表である小細胞肺癌への発生・進展過程において、Hedgehog や Notch 両シグナル伝達系分子関与と ASH1 転写因子などの神経内分泌系分化誘導と RB、p53 両経路の異常が悪性形質の獲得と分化において重要であると考えている。

## 2. 研究の目的

小細胞肺癌の進展に関わる幹細胞レベ

ルのシグナル伝達分子の解析を行う予定で、当初研究をすすめていたが、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤投与にて長期完全奏効したIV期肺腺癌患者において、増悪した原発巣と左頸部リンパ節と右腋窩リンパ節再発病巣を外科的摘出した症例に遭遇し、原発巣発の病理標本は小細胞肺癌で一部腺癌部分が存在し、左頸部リンパ節と右腋窩リンパ節再発病巣は腺癌であったため、小細胞肺癌の分化・発生のメカニズムを研究するため、そのがん病巣の遺伝子発現と遺伝子解析を行うこととした。

また、メンブレンアレイによる肺癌細胞株での遺伝子mRNA発現と抗がん剤の感受性試験の結果より、非小細胞肺癌において発癌に重要であることがDavid Carboneらによって報告されている19番染色体上にあるNotch-3とトポイソメラーゼII阻害剤の感受性との間に有意な相関が見られたデータ得ていたので、そのデータに基づいてNotch3が抗がん剤の感受性に関与しているかどうか検討すべくさらなる研究を行った。

## 3. 研究の方法

A: 肺癌幹細胞から小細胞肺癌と腺癌への分化に対する研究

(1) 腺癌患者の左頸部リンパ節と右腋窩リンパ節再発病巣と gefitinib が奏効し原発巣に発生した小細胞肺癌病巣ともに mRNA を抽出し EGFR 遺伝子変異解析を行った。Notch-3 に対する SiRNA 遺伝子導入による遺伝子ノックアウトで確認したところ、関連性が認められなかった。定量的 RT-PCR での再検討を行ったところ、小細胞肺癌での Notch-3 の遺伝子発現低下は裏付けられたが、トポイソメラーゼ II 阻害剤の感受性との相関は見られなかった。原因はメンブレンアレイ解析でのはずれ値の影響が考えられた。

(2) 上記部位のパラフィン包埋切片に対して、Notch3 と Ash1 両遺伝子の発現を免疫染色法にて行った。

(3) Notch3 と Ash1 両遺伝子のプロモーターのエピジェネティックな遺伝子発現制御について検討を行っている。

B: Notch3 と抗がん剤感受性

(1) メンブレンアレイで Notch-3 高発現の非小細胞肺癌 3 細胞株に対して Notch-3 に対する SiRNA 遺伝子導入による遺伝子ノックアウトを行い、トポイソメラーゼ II 阻害剤の感受性の変化を検討した。

(2) 結果が予想と大きくずれていたため、20 細胞株 (小細胞肺癌 5 株非小細胞肺癌 15 株) の Notch3 遺伝子発現を RT-PCR 法にて行った。

(3) トポイソメラーゼ II の機能発現に細胞核・細胞質間シャトル分子である RanBP2

が重要であるとの報告があり (Cell 2008)、その遺伝子発現とトポイソメラーゼ II 阻害剤の感受性の変化も検討した。

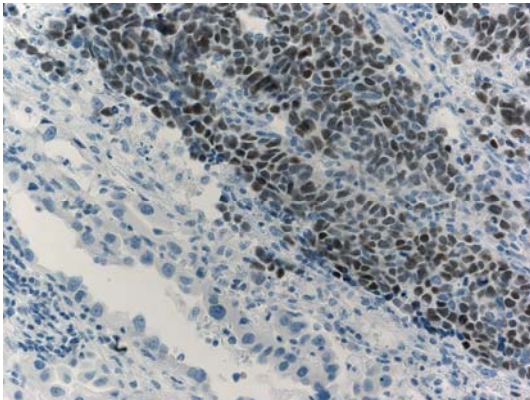
#### 4. 研究成果

A: 肺癌幹細胞から小細胞肺癌と腺癌への分化に対する研究

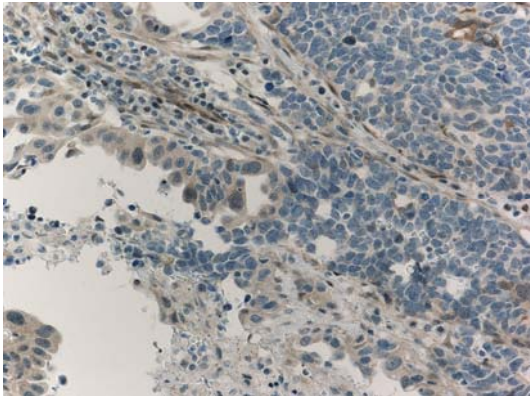
腺癌部分も小細胞肺癌部分も EGFR 遺伝子 L858R 変異を認めた。小細胞肺癌は EGFR 遺伝子と Notch3 遺伝子発現が消失し、Ash1 遺伝子発現がみられたのに対し、腺癌部分は EGFR 遺伝子と Notch3 遺伝子発現陽性、Ash1 遺伝子発現陰性であった。

#### 免疫染色結果

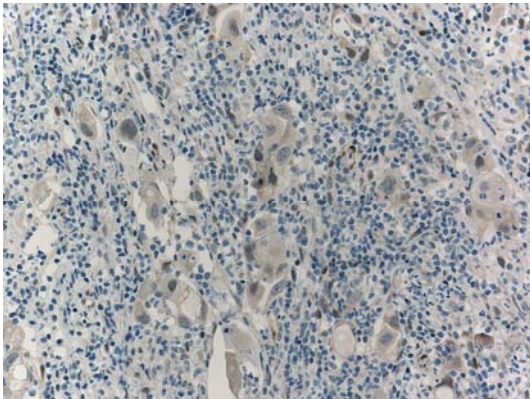
Ash1 原発巣の小細胞肺癌と腺癌部分



Notch3 原発巣の小細胞肺癌と腺癌部分



Notch3 リンパ節転移腺癌



本症例は肺癌幹細胞から腺癌への分化と小細胞肺癌への分化を示しうる癌化過程を示す実証例である。小細胞肺癌分化に Notch3 と Ash1 両遺伝子の発現変化の関与が重要であり、Notch3 と Ash1 両遺伝子のエピジェネティックな遺伝子発現制御について現在検討進行中である。

B: Notch3 と抗がん剤感受性

Notch-3 に対する SiRNA 遺伝子導入による遺伝子ノックアウトで確認したところ、関連性が認められなかった。定量的 RT-PCR での再検討を行ったところ、小細胞肺癌での Notch-3 の遺伝子発現低下は裏付けられたが、トポイソメラーゼ II 阻害剤の感受性との相関は見られなかった。原因はメンブレンアレイ解析でははずれ値の影響とメンブレンアレイの内在する問題の関与が考えられた。

また、トポイソメラーゼ II の機能発現に重要である細胞核・細胞質間シャトル分子である RanBP2 の遺伝子発現とトポイソメラーゼ II 阻害剤の感受性との間に相関は見られなかった (論文投稿中)。

#### 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 8 件)

(1) Taniguchi T, Karnan S, Fukui T, Yokoyama T, Tagawa H, Yokoi K, Ueda Y, Mitsudomi T, Horio Y, Hida T, Yatabe Y, Seto M, Sekido Y. Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative genomic hybridization shows frequent non-random chromosomal alteration regions including JUN amplification on 1p32. *Cancer Sci.* 98: 438-446, 2007

(2) Yoshida K, Yatabe Y, Park JY, Shimizu J, Horio Y, Matsuo K, Kosaka T, Mitsudomi T, Hida T. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2: 22-28, 2007

(3) Shimamoto H, Inaba Y, Yamaura H, Sato Y, Kamiya M, Miyazaki M, Arai Y, Horio Y. Chest wall dissemination of nocardiosis after percutaneous transthoracic needle biopsy. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 30:797-9, 2007.

(4) Sakamoto H, Shimizu J, Horio Y, Ueda R, Takahashi T, Mitsudomi T, Yatabe Y.

Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. J Pathol. 212:287-94, 2007.

(5) Shimizu J, Horio Y, Osada H, Hida T, Hasegawa Y, Shimokata K, Takahashi T, Sekido Y, Yatabe Y. mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. Respirology. 13:510-517, 2008

(6) Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, Hida T, Sekido Y. YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. Carcinogenesis. 29:2139-2146, 2008

(7) Tatematsu A, Shimizu J, Murakami Y, Horio Y, Nakamura S, Hida T, Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 14:6092-6096, 2008

(8) Hida T, Ogawa S, Park JC, Park JY, Shimizu J, Horio Y, Yoshida K. Gefitinib for the treatment of non-small-cell lung cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 9:17-35, 2009.

[学会発表] (計3件)

(1) YOSHITSUGU HORIO, JUNICHI SHIMIZU, HIROTAKA OSADA, TOYOAKI HIDA, YOSHINORI HASEGAWA, KAORU SHIMOKATA, TAKASHI TAKAHASHI, YOSHITAKA SEKIDO AND YASUSHI YATABE, mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity of cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. 2007 AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. October 22-26, 2007 San Francisco, California

(2) YOSHITSUGU HORIO, JUNICHI SHIMIZU, HIROTAKA OSADA, TOYOAKI HIDA AND YOSHITAKA SEKIDO, mRNA expression of RanBP2 is unlikely to be associated with chemosensitivity of amrubicine (topoisomerase II inhibitor) in human lung

cancer cell lines 2008年10月癌学会

(3) 清水淳市、堀尾芳嗣、小川紫都、朴智栄、吉田公秀、樋田豊明 小細胞肺癌におけるEGFR遺伝子変異の検討 第48回日本肺癌学会総会 名古屋 2007年11月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀尾 芳嗣 (HORIO YOSHITSUGU)

愛知県がんセンター (研究所)・分子

腫瘍学部・研究員

研究者番号 30344336

(2) 研究分担者

長田 啓隆 (OSADA HIROTAKA)

愛知県がんセンター (研究所)・分子

腫瘍学部・室長

研究者番号 30204176

(3) 連携研究者

なし