

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06182・19K21287

研究課題名(和文)小細胞肺癌の生存に関わるガイダンス分子Draxin-Neogenin経路の意義

研究課題名(英文)The relationship between the guidance molecules Draxin-Neogenin pathway and tumorigenicity of the small cell lung cancer

研究代表者

佐藤 陽之輔 (Sato, Younosuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：00823311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ガイダンス分子Draxinと受容体Neogeninによる経路が小細胞肺癌の腫瘍形成性に及ぼす影響を検討するために、細胞株H69ARとSBC5を用いてDraxinとNeogenin遺伝子欠損細胞株を各々作成し、蛋白発現とリン酸化発現の解析を行った。Draxin遺伝子欠損群ではアポトーシス関連因子であるカスパーゼの発現減少の傾向が認められ、Neogenin遺伝子欠損群では腫瘍の浸潤・転移に関与する細胞接着因子FAKの発現減少の傾向を認めた。またDraxin-Neogenin経路を阻害するデコイ蛋白を作成、培養中の小細胞肺癌に投与した結果、カスパーゼの発現が減少する傾向にあることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は高悪性度腫瘍であるが、従来の化学療法では治療効果が不十分であり、新規治療法の開発が求められている。ガイダンス分子は受容体との結合により細胞増殖やアポトーシスを調節することから、新しい癌治療のターゲットとして注目されているが、Draxin-Neogenin経路と小細胞肺癌に関する報告はこれまで存在しなかった。本研究によりDraxin-Neogenin経路は小細胞肺癌の腫瘍生存性においてアポトーシス調節や腫瘍の浸潤、転移能に関与している可能性があることがわかり、小細胞肺癌の新規治療法開発のターゲットとしての可能性も示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To examine the relationship between Draxin-Neogenin signal pathway and the tumorigenicity of small lung cell carcinoma, we constructed deletion of Draxin gene SCLC cell lines and Neogenin gene SCLC cell lines. These cell lines are H69AR and SBC5, and we analyzed the protein expression amount and phosphorylation amount by western blotting and phosphor-kinase array kit. The deletion of Draxin gene was indicated that the expression of caspase, apoptosis-regulating factor, was decreased and the deletion of Neogenin gene reduced the expression of focal adhesion kinase which involves in tumor infiltration and metastases. Moreover, we constructed a decoy-protein which inhibits Draxin-Neogenin signal pathway and added decoy-protein to cultured SCLC cells. This examination exhibited a decrease in the expression of caspase.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：小細胞肺癌 神経ガイダンス分子 Draxin Neogenin 発癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は、従来の化学療法による治療効果が不十分であり新たな治療法が求められている。神経ガイダンス分子は特異的な受容体との結合の有無に応じて、細胞増殖やアポトーシスを調節する。癌細胞では、この機能を利用して細胞増殖や生存、アポトーシスの回避に役立っていると考えられており、この機構を応用した新たな癌治療方法への活用が研究されている。本研究では、小細胞肺癌において神経ガイダンス分子とその受容体の役割を解析するとともに、神経ガイダンス分子と受容体の結合を阻害するために decoy 蛋白を作成、用いて癌細胞への影響を検討し、神経ガイダンス分子が小細胞肺癌への新たな治療法となる可能性を模索するものである。

### 2. 研究の目的

神経ガイダンス分子は、受容体との結合により細胞増殖やアポトーシスを調節する機能がある。私たちは非小細胞肺癌細胞で神経ガイダンス分子 Draxin とその受容体 Neogenin や DCC が肺癌細胞では高頻度に発現し、Draxin 遺伝子の抑制により細胞増殖関連因子の発現上昇やアポトーシス関連因子の発現抑制を明らかにした。本研究では、高悪性度腫瘍である小細胞肺癌細胞で Draxin と Neogenin の機能解析を行うとともに Draxin-Neogenin 結合に干渉する decoy 蛋白及び関連蛋白の投与実験、小細胞肺癌モデルマウスと Draxin、Neogenin 遺伝子欠損マウスを用いた発癌実験から小細胞肺癌における、これらの分子の役割を明らかにし、Draxin-Neogenin 経路が小細胞肺癌において、新しい治療法開発のターゲットとなり得るか、可能性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

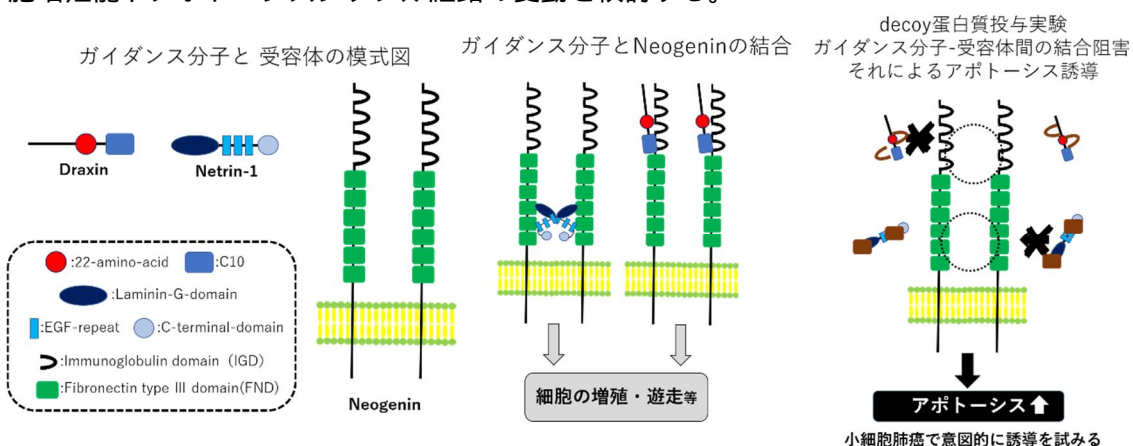
小細胞肺癌での Draxin・Neogenin の機能を解明するとともに、Draxin-Neogenin の干渉による小細胞肺癌の細胞増殖能及びアポトーシスシグナル経路の変動を検証する。

#### 小細胞肺癌細胞に対する Draxin、Neogenin の機能解析

ヒト小細胞肺癌細胞に対して Crisper/Cas9 システムを用いた Draxin と Neogenin 遺伝子欠損小細胞肺癌細胞を作成・解析し、アポトーシス経路に関する蛋白の変動、細胞増殖能へ及ぼす影響をウエスタンブロットティングや Human phospho array にて検討する。

#### 小細胞肺癌細胞に対するデコイタンパク投与、Draxin-22-amino-acid 投与によるガイダンス分子-受容体の結合阻害の誘導実験及びその効果の解析

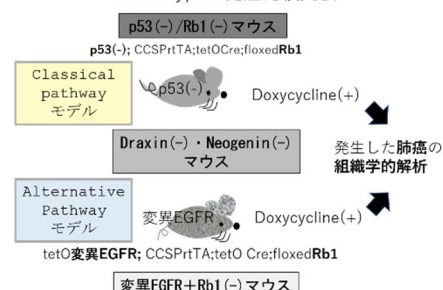
Neogenin の細胞外ドメインである Immunoglobulin ドメイン (IGD) や Fibronectin ドメイン (FND) を decoy 蛋白質として、Netrin-1 と結合する Draxin-22-amino-acid-peptide を作成し、小細胞肺癌細胞へ投与して、Draxin-Neogenin の結合への干渉を行い、小細胞肺癌の細胞増殖能やアポトーシスシグナル経路の変動を検討する。



#### p53・Rb1 遺伝子及び Draxin、Neogenin 遺伝子欠損マウス作成と小細胞肺癌誘導実験

小細胞肺癌モデルマウス (p53<sup>-/-</sup>/Rb1<sup>-/-</sup>) と変異 EGFR/Rb1<sup>-/-</sup>Draxin<sup>-/-</sup>、Neogenin<sup>-/-</sup> マウスを掛け合わせて作成したマウスに doxycycline を飲水投与して小細胞肺癌を誘導して Draxin-Neogenin の小細胞肺癌発生への影響を検討する。また採取した小細胞肺癌祖組織の病理学的な検討を行う。また作成した Draxin 遺伝子や Neogenin 遺伝子欠損小細胞肺癌細胞の皮下移植実験を行い、増殖能や転移能への影響を確認する。

#### 小細胞肺癌モデルでの Draxin・Neogenin-Gene deficient と Wild type の発癌比較実験



#### 4. 研究成果

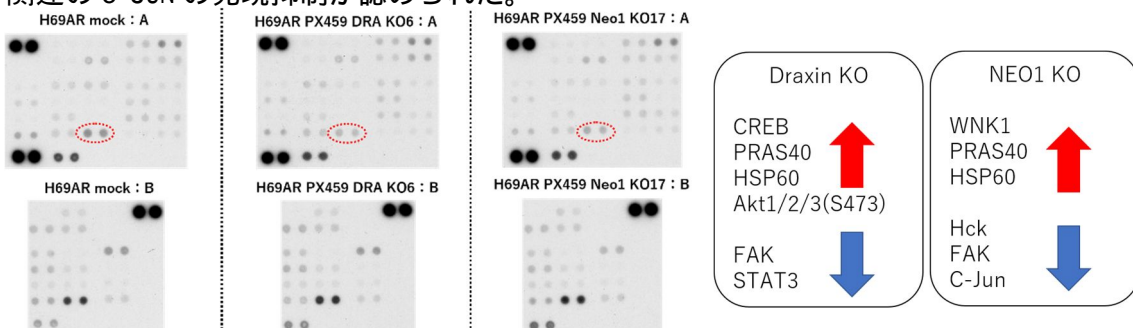
##### 小細胞肺癌細胞に対する Draxin、Neogenin の機能解析

ヒト小細胞肺癌細胞 H69AR に対して Crisper/Cas9 システムを用いた Draxin と Neogenin 遺伝子欠損小細胞肺癌細胞を作成し、樹立することに成功した。樹立した細胞株は、ウエスタンブロッティングを用いて、それぞれ蛋白発現の差異をコントロール群と比較検討した。結果、右図のようになった。Draxin 遺伝子欠損細胞ではアポトーシス関連因子である Caspase3, 8, 9 の発現低下や cAMP 応答配列を介した転写活性化に関わる転写制御因子 p-CREB やストレス応答性に働く p-JNK の発現低下が確認された。一方で Neogenin 遺伝子欠損細胞でも MAPK 関連蛋白である p-JNK の発現の変化は認められたが、アポトーシス関連因子の変動は認められなかった。

また別のヒト小細胞肺癌細胞 SBC5 に対しても Crisper/Cas9 システムを用いて Draxin と Neogenin 遺伝子欠損小細胞肺癌細胞の作成を試み、Neogenin 遺伝子欠損細胞株の作成、樹立することに成功した。こちらの細胞株も同様に解析を行った結果、細胞増殖に関連する CyclinD1 や pHH3 の発現低下や熱ショック蛋白質の HSP27、p-HSP27 (S78・S82)、cAMP 応答配列に關する p-CREB の発現低下、そして細胞接着因子 FAK や p-FAK や上皮間葉転換に関連する snail、vimentin の発現低下、E-cadherin の発現上昇がそれぞれ認められた。

以上のウエスタンブロッティングの結果から、ヒト小細胞肺癌 H69AR や SBC5 において、Draxin-Neogenin 経路は、リガンド側の Draxin ではアポトーシス応答の点で腫瘍の生存に關与している可能性が考えられ、一方受容体側の Neogenin では腫瘍の細胞増殖や浸潤・転移に關与している可能性が考えられた。

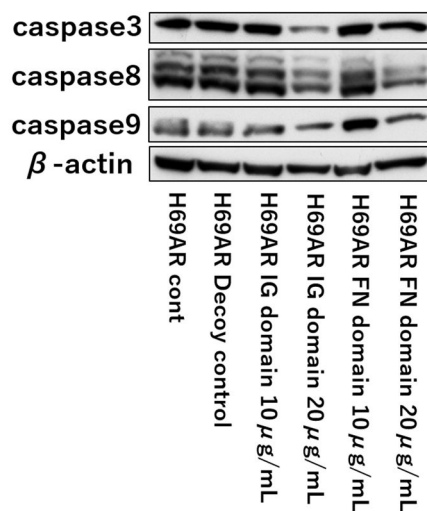
次に癌細胞内でのリン酸化レベルでの発現の変動を確認するために、小細胞肺癌 H69AR で作成した Draxin 遺伝子欠損細胞株と Neogenin 遺伝子欠損細胞株をそれぞれ Human phospho-kinase array を用いて検討した。コントロール群と比較して目立った変化としては、Draxin 遺伝子欠損群と Neogenin 遺伝子欠損群に共通して、栄養やストレス刺激に答えて細胞の成長に關与する TOR 複合体のサブユニット PRAS40 のリン酸化の上昇が認められた他、熱ショック蛋白質 HSP60 の上昇、細胞接着因子 FAK の減少が認められた。微細な変化としては、Draxin 遺伝子欠損群では CREB や代謝、生存、増殖等細胞の多様な機能に關与する Akt1/2/3(S473) の発現上昇や STAT3 の発現減少が認められた。Neogenin 遺伝子欠損群では、血圧調節因子の WNK1 の発現上昇と造血関連の Hck や MAPK 関連の c-JUN の発現抑制が認められた。



リン酸化発現の解析結果からは、Draxin-Neogenin 経路は腫瘍形成性において、腫瘍の浸潤・転移に関与している可能性が考えられた。

小細胞肺癌細胞に対するデコイ蛋白投与、Draxin-22-amino-acid 投与によるガイダンス分子-受容体の結合阻害の誘導実験及びその効果の解析

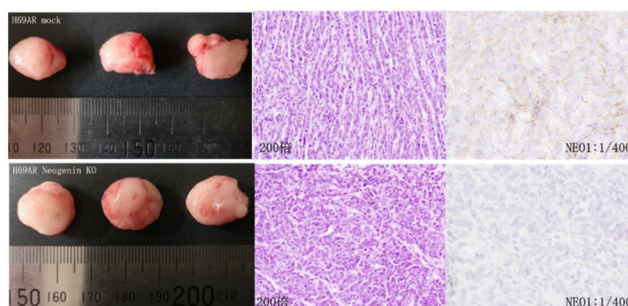
神経ガイダンス分子は特異的な受容体との結合の有無に応じて、細胞増殖やアポトーシスを調節する。Draxin-Neogenin 経路では Draxin が Neogenin の特異的部位に結合することで細胞へ生存や増殖等に関連するシグナル伝達を行い、結合がない場合、細胞へアポトーシス関連のシグナル伝達を行うと考えられる。Draxin-Neogenin 経路での結合を物理的に阻害するために、Draxin の結合部位と思われる Neogenin の細胞外ドメインである Immunoglobulin ドメイン (IGD) 及び Fibronectin ドメイン (FND) をデコイ蛋白として外注先の sysmex 社に依頼し、作成・精製することに成功した。作成したデコイ蛋白をシャーレ上で培養中の H69AR への投与実験を行った。10 µg/&, 20 µg/&の投与後、5 日目に回収、ウエスタンブロッティング法で蛋白解析を行った結果、右図の結果を得た。IGD 投与群の中で、20 µg/mL 投与群でアポトーシス関連因子の Caspase3 の有意な発現減少と Caspase 8・9 の軽微な発現減少が認められた。このことから、Neogenin の IGD のデコイ蛋白によって、小細胞肺癌細胞のアポトーシスが抑制される可能性と、デコイ蛋白の量依存性に結合阻害が誘導される可能性が考えられた。追証のためより大量の投与実験の実施や Draxin-Neogenin 経路を阻害するデコイ蛋白の作用を阻害・干渉する可能性がある Draxin-22-amino-acid 蛋白との同時投与実験の実施を計画したが、デコイ蛋白の作成・収集量が少なかったため、追加実験を行うための量を確保できなかった。収集量の増量は今後の行う予定の大量投与実験のためにも必須なため、依頼先の sysmex 社と収集量増加のためのオプション追加を検討中である。



### p53・Rb1 遺伝子・Draxin、Neogenin 遺伝子欠損マウス作成と小細胞肺癌誘導実験

小細胞肺癌発癌モデルマウスとして p53 遺伝子欠損・Rb1 遺伝子欠損による古典的発癌モデルマウスと変異 EGFR 遺伝子・Rb1 遺伝子欠損の非古典的発癌モデルマウスを、Draxin 遺伝子欠損マウス、Neogenin 遺伝子欠損マウスとそれぞれ掛け合わせて、小細胞肺癌発癌モデル + Draxin(-/-) and/or Neogenin(-/-) マウスを作製し、小細胞肺癌の発癌・腫瘍形成性への影響を解析しようと試みたが、現在の段階ではまだ実験頭数分確保することはできなかった。Draxin-Neogenin 経路の遺伝子(-/-)マウスは死亡しやすく、継代や実験に使用するまで成長することが難しいため、発癌実験等長期間生存が必要な実験に使用するためには、Draxin・Neogenin(+/-)のヘテロ群で実施する等の妥協も必要かもしれない。引き続きこれら発癌モデルマウス作成は継続していく。

マウスレベルの実験として免疫不全型モデル Rag2-Jak3 遺伝子欠損マウスにヒト小細胞肺癌細胞株 H69AR とその Neogenin 遺伝子欠損細胞株の皮下移植実験を行い、Neogenin 遺伝子欠損による腫瘍の増殖速度や転移への影響を検討した。コントロール群と比較して、Neogenin 遺伝子欠損群で腫瘍の増殖速度や腫瘍径や他臓器への転移、細胞形態に有意な違いは認められなかった。



今後の実験の展望に関して、H69AR と SBC5 で樹立した Draxin 遺伝子欠損細胞株と Neogenin 遺伝子欠損細胞株は、RNA-seq による遺伝子の発現量の解析を行いたいと考えている。本研究による蛋白レベルでの発現解析やリン酸化レベルでの発現解析を通して、Draxin-Neogenin 経路は種々のシグナル伝達に關与する蛋白の変動があり、特に細胞接着因子やアポトーシス関連因子の蛋白やリン酸化の変動は腫瘍形成性において、癌の浸潤・転移やアポトーシス関連の腫瘍生存に關与している可能性が示唆された。これらを RNA-seq を行うことで遺伝子レベルでも確認するとともに、他の変動が認められた蛋白、例えば mTOR 関連の PRAS40 や熱ショック蛋白 HSP27・60 等、これらの蛋白も癌との関連を示す報告がなされており、Draxin・Neogenin 遺伝子欠損による有意な上昇・現象を示す更なる遺伝子の発見を期待している。リン酸化発現解析は H69AR 群でのみ実施しているが、予算の都合がつけば、SBC5 群でも同様に実施して、H69AR での結果と相關するか、比較・検討したい。デコイ蛋白による Draxin-Neogenin 経路への干渉・阻害実験は、精製した蛋白量の低さが問題となっており、遺伝子欠損群や SBC5 群への投与や大量投与、Draxin-22-amino-acid 蛋白との競合実験等の追加実験ができない状態となっている。systemex 社と相談し、収集・精製量の増加が期待できるオプションの追加を検討している。一回の実験で回収できる細胞サンプル量も少ないため、解析に回せる回数も少ないが、解析手段としてウエスタンブロッティングやリン酸化解析、RNA-seq 等を想定している。マウスを用いた実験として、小細胞肺癌発癌モデルと Draxin-Neogenin 遺伝子欠損モデルとの掛け合わせによる実験モデル作成は継続中である。発癌モデルマウスには doxycycline を飲水投与することで小細胞肺癌を誘導できるので、コントロール群と比較し、Draxin-Neogenin 経路の小細胞肺癌発生への影響を検討したい。発生した腫瘍は病理学的な検討も行い、採取した腫瘍の一部は、ウエスタンブロッティングのサンプルへ回し細胞レベルでの蛋白発現やリン酸化シグナルの差を確認するとともに、可能であれば RNA-seq による解析を行い、遺伝子レベルでの細胞増殖や浸潤・転移関連の遺伝子の発現に違いが認められるか検討したい。他に作成したコントロール群の H69AR と SBC5 及び Draxin 遺伝子欠損細胞株と Neogenin 遺伝子欠損細胞株の免疫不全マウス皮下移植実験を行い、ガイドンス分子や受容体欠損による腫瘍形成性への影響を検討する。また皮下移植では腫瘍の転移に違いは認められなかったが、尾静脈からの腫瘍細胞の散布による腫瘍の定着や増殖、臓器への浸潤能の違いはないかも検討したいと思っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤陽之輔
2. 発表標題 肺癌における新しいガイドンス分子であるドラキシンについて
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----