

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03691

研究課題名(和文)小細胞肺癌の細胞系譜転写因子ASCL1関連シグナル分子について

研究課題名(英文)Signal molecules of ASCL1, a lineage-specific transcription factor for small cell carcinoma of the lung

研究代表者

伊藤 隆明(Ito, Takaaki)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70168392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌では、ASCL1陽性例が最も多く、ASCL1は、標的分子のSOX2、WNT11などと関連を持って、様々な生物活性や薬剤感受性関与する。ROR2もASCL1の標的分子と考えられたが、ROR2は、ASCL1発現下でも、Notchシグナル活性化状態でも発現し、腫瘍内heterogeneityに関わり、増殖能が高い集団を形成していることがわかった。またclub細胞から神経内分泌へと分化転換マウス肺のsingle cell RNAseq解析から、SOX1、NFACT2などのASCL1関連転写因子を見出した。ASCL1関連分子の研究は、小細胞肺癌の治療を目指した基礎的な研究として重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は、高悪性度の難治性の神経内分泌癌で、この腫瘍の分子基盤を基にした治療法の開発が期待されるが、まだ、治療に応用される標的となる分子機構は十分にわかっていない。ASCL1は、肺小細胞肺癌の神経内分泌分化を制御する一方で、様々なこの腫瘍の生物学的な特徴にも関与する重要な分子である。本研究は、ASCL1に関連する分子を研究することで、将来のこの腫瘍の克服に向けた基礎的な意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung cancer (SCLC) often expresses cell-lineage transcription factor ASCL1, which shows various biological activities and chemosensitivity of this recalcitrant cancer. We supposed ROR2 as a candidate ASCL1-related signal molecule. ROR2 is expressed in ASCL1-dependent manner and/or in active Notch signaling condition, induces intratumor heterogeneity, and forms a cluster with high cell proliferation activity, which could be supported by Aurora kinases. Furthermore, through single cell RNA sequence analysis, we found various transcription factors such SOX1 and NFACT2 during transdifferentiation from club cells to neuroendocrine cells in fetal lungs. Studies on ASCL-related molecules should contribute to further advances in the control of SCLC.

研究分野：病理学

キーワード：小細胞肺癌 神経内分泌分化 ASCL1 Notchシグナル ROR2 NOTCH2 SOX1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌 (SCLC) を細胞系譜転写因子発現パターンからの分類では(Rudin et al. 2019)、ASCL1 を発現する SCLC が最も高い亜型である。ASCL1 は、神経内分泌細胞分化制御だけでなく、増殖、生存、epithelial-mesenchymal transition (EMT)、薬剤感受性などにも関わり(Osada et al. 2005,2008; Borromeo et al. 2016; Ito et al. 2017)、SCLC の細胞学的な特性を制御する driver oncogene と見なされている(Gazdar et al. 2017)。また、ASCL1 の機能発現には、ASCL1 に誘導される NKX2.1(Horie et al. 2018)や INSM1(Fujino et al. 2015)などの転写因子が共同的に働き、ASCL1 型の SCLC を特徴づけていると考えられる。ASCL1 遺伝子の肺癌細胞株への遺伝子導入実験から、ASCL1 は DKK1, LRP6, WNT11 など Wnt シグナル分子の発現の制御に関与していることが知られていて(Osada et al. 2008; Meder et al. 2015; Tenjin et al. 2019)、さらに、ASCL1 の関連分子の網羅的な解析からは、Wnt シグナルの受容体の一つである ROR2 が ASCL1 の関連分子であることがわかった(Borromeo et al. 2016; Tenjin et al. 2019)。一方、ROR1 は、末梢肺上皮の細胞系譜転写因子 NKX2.1 の関連シグナル分子であり、このシグナルはヒト肺腺癌の生存を維持するうえで重要であると報告されている (Yamaguchi et al. 2013;2019)。ASCL1 を発現する SCLC は薬剤感受性状態であり、一方、Notch シグナルは ASCL1 の発現を抑制的に制御するとともに、薬剤抵抗性に関与していて(Hassan et al. 2016; Lim et al. 2018)、Notch1 Hes1 Ascl1 のバランスにより、SCLC の不均一性が形成されることが考えられる (Hassan et al. 2017)。本研究では、ASCL1 依存性および非依存性に発現する ROR2 の機能を明らかにすることが中心的な研究テーマであり、難治性の神経内分泌癌 SCLC において、細胞系譜転写因子 ASCL1 に依存する Wnt シグナル分子 ROR2 の、SCLC 細胞の分化、増殖、生存への重要性、薬剤感受性状態と薬剤耐性状態でのシグナル機構としての重要性、さらに、この基礎研究を通して、ROR2 の SCLC の制御標的分子としての有用性を、本研究で明らかにしたい。

2. 研究の目的

小細胞肺癌を細胞系譜転写因子の発現から分類する案が提唱されたが(Rudin et al. 2019)、ASCL1 陽性の小細胞肺癌が最も多い(Sato et al.2020)。Ascl1 は、標的分子の Sox2, INSM1, Wnt11 などと関連を持って、様々な生物活性や薬剤感受性を示し、一方、Notch シグナルが活性化すると、Ascl1 は消失し、薬剤耐性が出現する。Ascl1 の標的分子に Ror2 があり、本研究では当初 Ror2 を Ascl1 の標的分子ととらえていたが、Notch シグナルが活性化して Yap1 が発現している小細胞肺癌でも Ror2 は発現した(Tenjin et al.2020)。Ror2 は、Ascl1 発現下でも、Notch シグナル活性化状態でも存在し、本研究は、Ascl1 関連、および Ascl1 非依存性の Ror2 の発現や機能を明らかにするための研究である。また、club 細胞から神経内分泌細胞へと分化転換するマウスモデルを用いて、新たな Ascl1 関連転写因子を明らかにすることも研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肺癌における各種蛋白質の発現について、各種培養細胞株での Western blotting で検討した。また、ROR2 をはじめこれら分子について外科切除組織標本の免疫染色による解析を行った。

(2) 各種 SCLC 培養細胞に ROR2 遺伝子導入および遺伝子ノックダウンおよびノックアウト実験を行い、また、これら細胞の免疫不全マウスへの皮下移植実験を行い、ROR2 の細胞生物学的な意義を検討した。また、ASCL1, SOX2 などとの関係についても検討した。

(3) ROR2 結合蛋白に何があるかを網羅的に明らかにするため、ROR2-Flag 融合遺伝子を SCLC 培養細胞各種に導入し、Flag の免疫沈降から、ROR2 結合蛋白質の質量分析を行い、その分子の

SCLC における意義を検討した。

(4) ROR2 は non-canonical Wnt シグナル分子であり、リガンド候補の WNT11 および WNT5a 分子との結合について Cos7 細胞および SCLC 培養細胞により検討し、また、これらの生物学的な意義について検討した。また、SCLC 培養株 SBC3 の ROR2 遺伝子ノックアウトにおいて、リン酸化アレイキットを用いて、リン酸化の低下を示す分子を解析した。

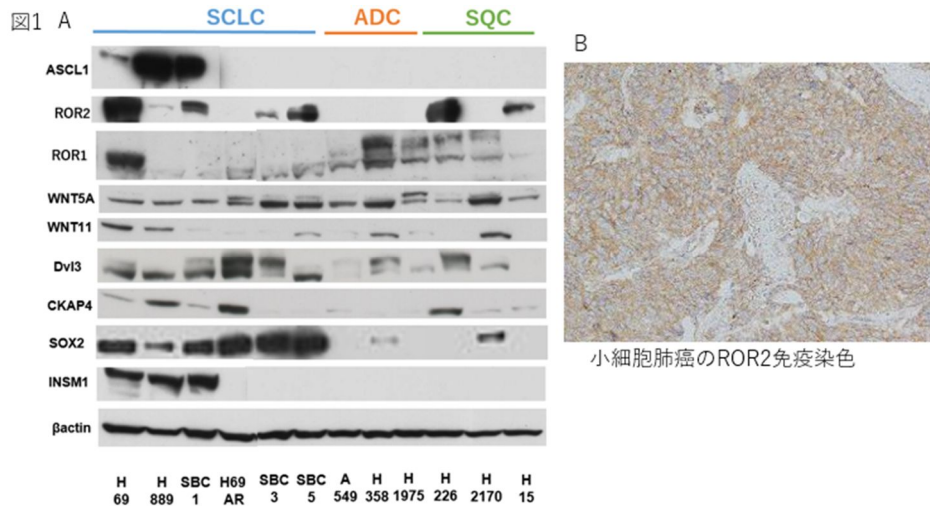
(5) 免疫染色の結果から、SCLC では ROR2 発現に heterogeneity が存在することが明らかになったので、SCLC 培養細胞やヒト SCLC 患者由来皮下移植腫瘍(PDX)から ROR2 高発現細胞と ROR2 低発現細胞を FACS により分取して、細胞増殖能や clone 形成能について検討した。

(6) SCLC 培養細胞やヒト SCLC 患者由来皮下移植腫瘍(PDX)から ROR2 高発現と ROR2 低発現細胞を分取し、RNAseq 解析を試み、ROR2 関連分子の意義について検討した。

(7) ROR1 は肺腺癌の生存に重要な分子として知られているが、SCLC での発現を検討するとともに、膵腺癌細胞株などを用いて、ROR1 の機能や治療標的としての意義を検討した。

(8) ROR2 と Notch シグナルとの関連について検討している際に、ASCL1 陽性 SCLC で、腫瘍内 heterogeneity を示す NOTCH2 を見出したので、NOTCH2 の heterogeneity の意義について検討した。

(9) Hes1 欠損により Notch シグナルを不活化することで、club 細胞から神経内分泌細胞への分化転換を示すマウス肺の single cell RNAseq 解析から、ASCL1 関連転写因子の探索を行った。

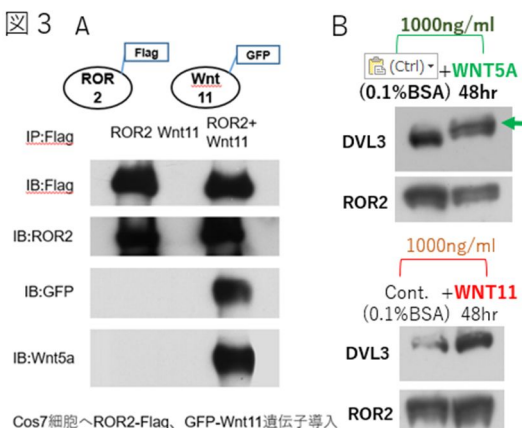
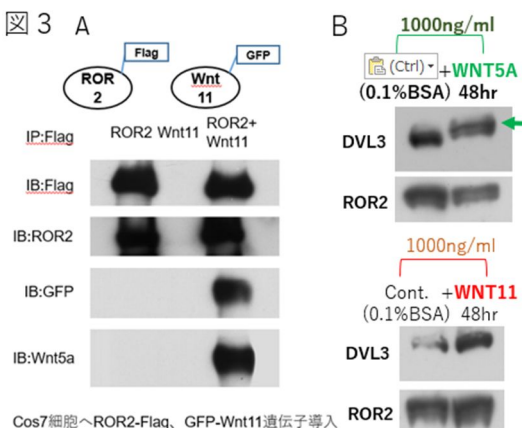


4. 研究成果

(1) Western blotting の結果から、ROR2 は、non-SCLC 症例よりも SCLC 症例に高頻度に発現する傾向があり、また、SCLC 内では、ASCL1 陽性株(Classic type)にも ASCL1 陰性株(Variant type)にも発現が見られた(図 1A)。また、免疫組織化学的には、約 60% の症例で腫瘍細胞の細胞膜に陽性像が見られ(図 1B) また、染色性については、腫瘍内 heterogeneity も認められた

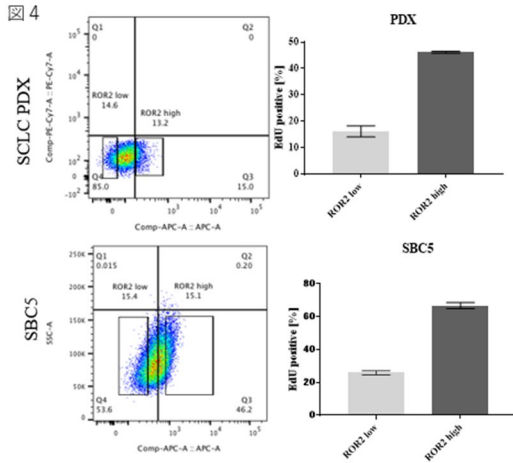
(2) ROR2 遺伝子導入および遺伝子ノックダウン実験からは、ROR2 の機能として、細胞増殖能の促進、マウス皮下移植腫瘍の増殖促進、EMT や細胞の浸潤能の抑制(図 2)、神経内分泌分化促進作用などが明らかになった。

(3) SCLC 培養株 H69, SBC3 への ROR2-Flag 遺伝子導入後、ROR2 結合蛋白質の質量分析を行ったところ、増殖シグナル関連分子 CKAP4, XP01、また、核外輸送受容体 XP01 などが同定された。



CKAP4 は、SCLC 細胞株で比較的多く発現することが解った(図 1A)。一方、本実験では、ROR2 とリガンド候補の WNT 分子との結合は明らかにならなかった。

(4) ROR2 と WNT 分子との結合について、Cos7 細胞に ROR2-flag 遺伝子と WNT11-GFP 遺伝子あるいは WNT5a-GFP 遺伝子を導入したところ、WNT11 および WNT5a と ROR2 の結合が見られた(図 3A)。また、SCLC 培養株 SBC5 細胞に recombinant WNT11 および WNT5a を処理したところ、Western blotting で、Wnt シグナル分子 DVL3 の band-shift(リン酸化)が見られた(図 3B)。ただ、これら WNT 分子を処理した細胞では、対照群と比して、細胞増殖や細胞分化への影響は明らかにならなかった。さらに、SCLC 培養細胞株 SBC3 の ROR2 遺伝子ノック

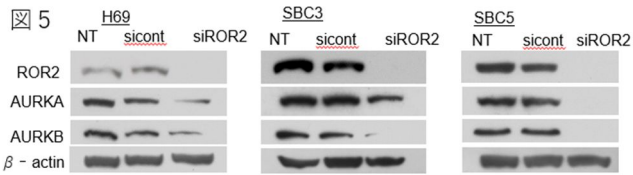


アウト細胞でのリン酸化アレイキットを用いて、リン酸化蛋白のプロフィール変化を観察すると、GASK-3, C-JUN, STAT1, STAT3 のリン酸化の低下が観察された。

(5) SCLC 培養株 SBC3, SBC5 およびヒト SCLC 患者由来皮下移植腫瘍 (PDX) より FACS を用いて ROR2 高発現細胞と ROR2 低発現細胞を分取し、EDU 取り込み実験を行ったところ、ROR2 高発現細胞で EDU 取り込み細胞が多く、優位に細胞増殖能が高いことが解った (図 4)。また、colony 形成能を解析したところ、ROR2 高発現細胞の方で活性が高いことが解った。

(6) RNAseq 解析により、SCLC 培養株 SBC3 の ROR2 遺伝子 KO 細胞で発現の低下した分子群および SBC3 細胞内の ROR2 高発現細胞で低発現細胞

より発現の増加の見られた Metascape 解析から 135 分子を明らかにした。これらには、E2F 標的分子、G2M checkpoint 関連分子、AURK 関連分子などが含まれていた。SCLC 培養株 H69, SBC3, SBC5 の ROR2 遺伝子ノックダウン実験から、AURK は ROR2 に制御され

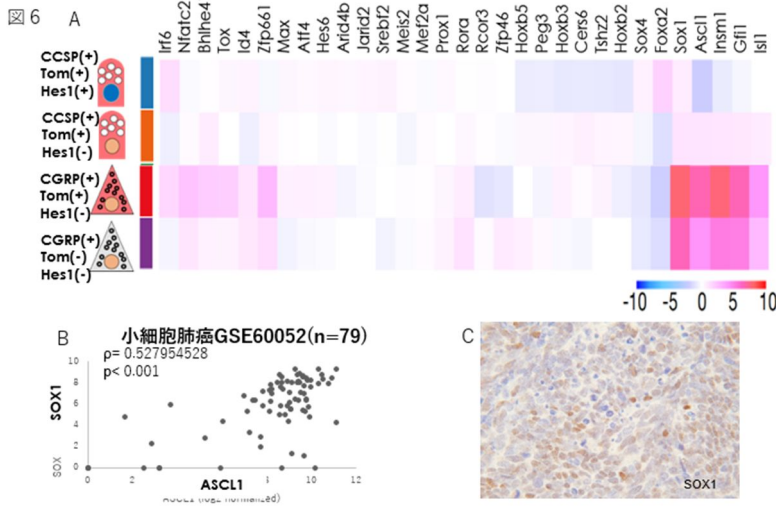


(図 5) ROR2 関連細胞増殖能亢進には AURK が関わるということが考えられた。

(7) ROR1 は、SCLC 症例よりも non-SCLC 症例に発現する傾向があり、また、SCLC 内では、ASCL1 陽性株 (Classic type) にも ASCL1 陰性株 (Variant type) にも発現が見られた (図 1A)。ROR1 については、肺癌について検討したところ、ROR1 は腫瘍内 heterogeneity に関与し、ROR1 高発現細胞は増殖能が高く、AURK の発現が高く、転移能にもかわり、また、幹細胞機能もあることが

示された。AURK の発現制御機構が治療標的分子になりうると思われ、SCLC にも適応できると考えられた。

(8) NOTCH2 は、NOTCH1 と異なり、ASCL1 陽性 SCLC でも発現が見られ、またその発現は、腫瘍内 heterogeneity を示した。また、FACS により NOTCH2 高発現細胞と NOTCH2 低発現細胞を分取し、EDU 取り込み実験を行ったところ、NOTCH2 高発現細胞は優位に細胞増殖能が高いことが認められ、また、club 細胞の分化マーカーの SCGB1A1 の発現もあり、細胞分化の可塑性



にも関与することが想像された。これら細胞の RNAseq 解析を今後続けていく予定である。

(9) club 細胞から神経内分泌細胞への分化転換マウス胎仔肺の single cell RNAseq 解析から、ASCL1 関連分子の探索を行ったところ、club 細胞と ASCL1 陽性の神経内分泌細胞の間には様々な中間型細胞が見いだされた。また、Ascl1 や INSM1 などの既知の神経内分泌関連転写因子に加え、Sox1 や Nfatc2 などの分子が見いだされた (図 6 A)。これら分子は、SCLC の public data からは、ASCL1 との発現に相関があり (図 6 B)、また、SCLC 症例で核陽性所見が示された (図 6 C)。これら分子を ASCL1 関連転写因子として今後検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sanada Mune, Yamazaki Masaya, Yamada Tatsuya, Fujino Kosuke, Kudoh Shinji, Tenjin Yuki, Saito Haruki, Kudo Noritaka, Sato Younosuke, Matsuo Akira, Suzuki Makoto, Ito Takaaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Heterogeneous expression and role of receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) in small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 409 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-022-00830-1	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 Ito Takaaki, Kudoh Shinji, Fujino Kosuke, Sanada Mune, Tenjin Yuki, Saito Haruki, Nakaishi-Fukuchi Yuko, Kameyama Hiroki, Ichimura Takaya, Udaka Naoko, Kudo Noritaka, Matsuo Akira, Sato Younosuke	4. 巻 55
2. 論文標題 Pulmonary Neuroendocrine Cells and Small Cell Lung Carcinoma: Immunohistochemical Study Focusing on Mechanisms of Neuroendocrine Differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 75 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.22-00031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kudo Noritaka, Kudoh Shinji, Matsuo Akira, Motooka Yamato, Ito Takaaki	4. 巻 54
2. 論文標題 ZMYM3 may promote cell proliferation in small cell lung carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 143 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito Haruki, Tenjin Yuki, Yamada Tatsuya, Kudoh Shinji, Kudo Noritaka, Sanada Mune, Sato Younosuke, Matsuo Akira, Orita Yori-hisa, Ito Takaaki	4. 巻 35
2. 論文標題 The role of YAP1 in small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 628 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-022-00669-6	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 Kudoh Shinji, Tenjin Yuki, Kameyama Hiroki, Ichimura Takaya, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Kudo Noritaka, Sato Younosuke, Ito Takaaki	4. 巻 153
2. 論文標題 Significance of achaete-scute complex homologue 1 (ASCL1) in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and Ascl1-induced pulmonary neuroendocrine carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 443 ~ 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01863-z	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 Tenjin Yuki, Matsuura Kumi, Kudoh Shinji, Usuki Shingo, Yamada Tatsuya, Matsuo Akira, Sato Younosuke, Saito Haruki, Fujino Kosuke, Wakimoto Joeji, Ichimura Takaya, Kohrogi Hirotsugu, Sakagami Takuro, Niwa Hitoshi, Ito Takaaki	4. 巻 100
2. 論文標題 Distinct transcriptional programs of SOX2 in different types of small cell lung cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1575 ~ 1588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00479-0	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 Sato Younosuke, Okamoto Isamu, Kameyama Hiroki, Kudoh Shinji, Saito Haruki, Sanada Mune, Kudo Noritaka, Wakimoto Joeji, Fujino Kosuke, Ikematsu Yuki, Tanaka Kentaro, Nishikawa Ayako, Sakaguchi Ryo, Ito Takaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Integrated Immunohistochemical Study on Small-Cell Carcinoma of the Lung Focusing on Transcription and Co-Transcription Factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 949 ~ 949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10110949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Masaya, Hino Shinjiro, Usuki Shingo, Miyazaki Yoshihiro, Oda Tatsuya, Nakao Mitsuyoshi, Ito Takaaki, Yamagata Kazuya	4. 巻 42
2. 論文標題 <sc>YAP</sc></sc><sc>BRD4</sc> controlled <sc>ROR1</sc> promotes tumor initiating cells and hyperproliferation in pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e112614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022112614	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 Ito Takaaki	4. 巻 74
2. 論文標題 Molecular pathology of small cell lung cancer: Overview from studies on neuroendocrine differentiation regulated by ASCL1 and Notch signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 239-252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13426	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福地裕子、伊藤隆明、山崎昌哉、眞田崇、本岡大和、山田達也、佐藤陽之輔、藤野孝介、鈴木実
2. 発表標題 小細胞肺癌のpatient-derived xenotransplantation (PDX) model
3. 学会等名 第39回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤隆明
2. 発表標題 小細胞肺癌の分子病理学: 神経内分泌分化機構からの展開
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021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	佐藤 陽之輔 (SATO YOUNOSUKE) (00823311)	熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・助教 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永原 則之 (NAGAHARA NORIYUKI) (10208043)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	藤野 孝介 (FUJINO KOUSUKE) (10837339)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	長谷川 功紀 (HASEGAWA KOUKI) (50525798)	福島県立医科大学・保健科学部・教授 (21601)	
研究分担者	山口 知也 (YAMAGUCHI TOMOYA) (70452191)	熊本大学・大学院先導機構・准教授 (17401)	

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