

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590376

研究課題名（和文） TTF-1が関与する悪性神経内分泌細胞特異的分子発現誘導システムの
全容解明研究課題名（英文） Analysis of expression mechanisms of neuroendocrine cancer
cell-specific molecules via TTF-1

研究代表者

矢澤 卓也（YAZAWA TAKUYA）

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：50251054

研究成果の概要（和文）：甲状腺転写因子-1 (Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1))は肺末梢気道上皮形質を有する腺癌細胞において高率に発現されているが、中枢気道から発生することが多い小細胞癌（神経内分泌癌）においても高頻度かつ高レベルの発現が見られる。このことから本研究では TTF-1 の発現機序および TTF-1 下流因子について検索した。本研究により、TTF-1 がエピジェネティックに発現制御されている可能性は低いこと、TTF-1 が複数のホメオボックスあるいは basic helix-loop-helix 型転写因子と協調して遺伝子発現を複雑に制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) is frequently expressed in lung adenocarcinomas with peripheral airway epithelium-like phenotype. However, frequent and abundant TTF-1 expression is also paradoxically found in small cell lung cancers, which commonly generate from central airway. The aim of this study was to investigate the expression mechanism of TTF-1 and search downstream molecules regulated by TTF-1. Through this study, it was suggested that TTF-1 expression was not epigenetically regulated and that TTF-1 complicatedly regulated gene expression with other homeobox transcription factors and neuroendocrine-specific basic helix-loop-helix transcription factors cooperatively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：肺がん、悪性神経内分泌細胞、TTF-1

1. 研究開始当初の背景

甲状腺転写因子-1 (Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1))はホメオドメインを有する転写因子であり、脳、甲状腺、肺の発生に重要な役割を担っている。成人正常組織における TTF-1 の発現は、甲状腺

濾胞上皮と肺末梢気道上皮に局限している。肺末梢気道上皮は近年示されている Terminal Respiratory Unit (TRU)を構成する上皮成分であり、末梢型肺腺癌における TTF-1 発現は肺末梢気道発生を裏付ける免疫組織化学的傍証となっている。しかし肺上皮

における TTF-1 の機能は未だ不明な点が多く、サーファクタント蛋白発現、腺癌細胞のアポトーシス抑制などの報告を見るに過ぎない。

肺に発生する神経内分泌腫瘍は、神経内分泌細胞過形成、テューモレット、定型カルチノイド腫瘍、異型カルチノイド腫瘍、小細胞癌および大細胞神経内分泌癌といった腫瘍様病変-良性腫瘍-悪性腫瘍というスペクトラムを形成していると考えられており、TTF-1 の発現は神経内分泌細胞過形成病変、テューモレット、定型カルチノイド腫瘍には見られず、小細胞癌や大細胞神経内分泌癌になると高発現するとの報告がある。また神経内分泌腫瘍は ASCL1 や NeuroD などの神経内分泌細胞特異的 basic helix-loop-helix 型 (bHLH) 転写因子を発現するという共通点を有しており、悪性度の高い小細胞癌や大細胞神経内分泌癌において高頻度かつ高度に発現されている。これらの現象は、神経内分泌系腫瘍細胞の悪性能の獲得と TTF-1 や神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子の発現との間に何らかの関連性があることを示唆している。

2. 研究の目的

一般に肺小細胞癌の発生母地は中枢気道であると考えられている。中枢気道上皮には通常 TTF-1 の発現は見られない。しかし小細胞癌においては、末梢気道に由来する腺癌細胞に比してはるかに大量の TTF-1 を発現している。そこで本研究では、なぜ肺小細胞癌に大量の TTF-1 が発現されているのか、そして TTF-1 が肺小細胞癌の生物学的特性にどのように関与しているのかという命題について、分子病理学的に解析を行い、TTF-1 が関与する悪性神経内分泌細胞特異的分子発現誘導システムの全容を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経内分泌腫瘍細胞における TTF-1, 神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子の発現状態の検討:

倫理委員会による承認を得たのち、外科的に切除されたカルチノイド腫瘍(定型および異型)、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌組織を用い、TTF-1、ASCL1、NeuroD の発現状態について免疫組織化学的に検討した。

また各種組織型に由来する肺癌培養細胞を用い、TTF-1、ASCL1、NeuroD 発現について Western blot 法および realtime PCR 法を用いて検索した。

(2) 培養肺癌細胞における TTF-1 プロモーターのエピジェネティック解析:

TTF-1 遺伝子配列についてコンピューターソフトを用いた解析により CpG アイランド存在が明らかになったため、TTF-1 プロモーター

のエピジェネティック変化についてバイサルファイトシーケンス法を用いて解析し、TTF-1 遺伝子発現とエピジェネティック変化の相関について検討した。

(3) TTF-1 遺伝子の発現機序解析:

TTF-1 プロモーター構造について転写因子結合解析ソフトウェアを用いて解析することにより、複数のホメオボックス遺伝子産物の結合配列が存在することが明らかになったため、ルシフェラーゼアッセイを行い、TTF-1 遺伝子発現に関与する転写因子の同定を試みた。

(4) TTF-1 により発現変化する遺伝子の解析:

TTF-1 発現発現ウィルスベクターを作成し、自発的な TTF-1 発現の見られない培養肺癌細胞に遺伝子導入することにより、TTF-1 強制発現細胞を作成した。これを用い、TTF-1 発現に伴い発現亢進する遺伝子について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 切除された神経内分泌腫瘍における TTF-1, 神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子の発現状態の検討:

神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子である NeuroD の発現は、Neuroepithelial body、定型カルチノイド腫瘍、異型カルチノイド腫瘍、小細胞癌、大細胞神経内分泌細胞癌において普遍的に発現されていることが明らかになった。我々は NeuroD により発現制御される分子として、Insulin-like growth factor binding protein-2 および Neural cell adhesion molecule-1 を同定したが、これらの分子についても Neuroepithelial body、定型カルチノイド腫瘍、異型カルチノイド腫瘍、小細胞癌、大細胞神経内分泌細胞癌において普遍的に高発現されていることが確認された。また ASCL1 の発現は Neuroepithelial body、定型カルチノイド腫瘍には見られないが、異型カルチノイドの段階からその発現が見られるようになり、小細胞癌および大細胞神経内分泌癌では高発現していることが判明した。TTF-1 の発現は ASCL1 と同様であり、Neuroepithelial body、定型カルチノイド腫瘍には見られないが、異型カルチノイドの段階からその発現が見られるようになり、小細胞癌および大細胞神経内分泌癌では高発現していた。

(2) 培養肺癌細胞における TTF-1 プロモーターのエピジェネティック解析:

TTF-1 プロモーターのエピジェネティックな変化についての解析は、培養小細胞癌細胞のみならず、TTF-1 を発現している腺癌株、TTF-1 を発現していない腺癌株、その他扁平上皮癌株、大細胞癌株を用いて行った。その結果、①小細胞癌株(すべて TTF-1 発現(+))における TTF-1 プロモーター内の CpG メチル

化は殆ど認められないこと(0~1.7%)、②腺癌株における CpG メチル化頻度は、TTF-1 発現の見られる肺腺癌株では 0~15.3%、TTF-1 発現の見られない肺腺癌株では 0~18.6%、③扁平上皮癌株(すべて TTF-1 発現(-))における CpG メチル化頻度は 0~27.1%、④大細胞癌株(すべて TTF-1 発現(-))における CpG メチル化頻度は 16.9~44.1%であり、TTF-1 遺伝子発現とエピジェネティック変化の相関は低いことが明らかになった。

(3) TTF-1 遺伝子の発現機序解析:

TTF-1 分子には C 末端のスプライシングパターンが異なる 2 種類が存在している (variant 1, variant 2)。まず肺癌細胞においていずれのバリエーションが主に発現しているかを multiplex RT-PCR 法により検討した。その結果、肺腺癌では variant 1 の発現が有意であるのに対し、肺小細胞癌においては variant 2 の発現が有意であることが判明した。このことから、variant 2 に対する TTF-1 プロモーター配列を PCR により増幅し、これをルシフェラーゼベクターに挿入することにより TTF-1 プロモーター解析用ベクターを構築した。また同時に TTF-1 プロモーター鎖長を短縮したベクター、および変異を導入したベクターも合わせて作成し、実験に供した。

上記のベクターを用いてルシフェラーゼアッセイを行うことにより、①小細胞癌においては、variant 1 が使用していると思われるプロモーター領域の活性に比して variant 2 が使用していると思われるプロモーター領域の活性が 2 倍ほど高いこと、②variant 2 の転写開始部位(+1)よりやや下流に位置する FOX 結合可能領域(+13~+17)に変異を導入することにより、TTF-1 プロモーター活性が軽度に減弱すること、③HOX/Lim homodomain (LHX) 蛋白結合可能領域(+40~+44)に変異を導入することにより、TTF-1 プロモーター活性が著しく減弱することが明らかになった。

このことから、肺小細胞癌における FOX、LHX の発現状態について realtime PCR により検討した。その結果、TTF-1 発現の見られる肺癌株では FOXA1/2 の発現が高いこと、肺小細胞癌株では他組織型株に比して LHX2、LHX6 および OCT7 の発現が高いことが明らかになった。またコンピューター解析により結合の可能性が示唆された別のホメオボックス遺伝子産物 PAX2/4/5/8、LHX1/3/4/5/8/9、FOXB3、GATA6、FOXD3 についても検索したが、これらの発現と TTF-1 発現との間に正の相関は見いだせなかった。

上記の結果を受け、FOXA1、FOXA2、LHX2、LHX6 の発現ベクターを構築し、TTF-1 を発現していない肺癌株にこれらを導入することによる TTF-1 の発現変化について検索した。その結果、FOXA1/2 を強制発現させることにより、TTF-1 の発現が誘導されることが判明

した。一方、LHX2、LHX6 を強制発現させても有意な TTF-1 発現変化は見られなかった。ただし、FOXA1/2 による TTF-1 発現量は、constitutive な TTF-1 発現が見られる腺癌株や小細胞癌株に比較すると極めて微量であった。

また ASCL1 あるいは NeuroD が TTF-1 発現に関与しているか否かについても検討した。ASCL1/NeuroD 発現ベクターを構築し、これらを TTF-1 発現の見られていない肺癌株に導入することによる TTF-1 の発現変化について検索した。その結果、少なくとも ASCL1 あるいは NeuroD 単独では TTF-1 発現に変化を及ぼさないことが明らかになった。

(4) TTF-1 により発現変化する遺伝子の解析:

TTF-1 発現ベクターを構築し、これを TTF-1 発現の見られない肺癌株に導入することにより、発現変動する遺伝子について検索した。その結果、肺癌細胞の増殖は TTF-1 遺伝子発現により遅延した。TTF-1 単独導入により発現変動した遺伝子については、ASCL1、NeuroD、神経内分泌マーカー遺伝子を含め有意なものは見られなかったが、TTF-1 と ASCL1 の共導入により surfactant protein A、surfactant protein B の発現が誘導されることが明らかになった。

(5) 結果のまとめと今後の展望:

上記の結果より、少なくとも TTF-1 単独では神経内分泌形質の誘導は起こらないことが明らかになるとともに、肺癌細胞における TTF-1 の発現は、FOXA1/2 を含む複数のホメオボックス蛋白により制御されていることが示唆された。今後、複数のホメオボックス蛋白遺伝子を共導入するなどの手法をとりつつ、肺癌細胞における神経内分泌形質の獲得/誘導メカニズムについて継続して検討していきたい。

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 20 件)

1. Kashiwagi K, Ishii J, Sakaeda M, Arimasu Y, Shimoyamada H, Sato H, Miyata C, Kamma H, Aoki I, Yazawa T. Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. *Pathol Int* 62: 232-245, 2012. 査読有
2. Iwasawa T, Ogura T, Sakai F, Kanauchi T, Komagata T, Baba T, Gotoh T, Morita S, Yazawa T, Inoue T. CT analysis of the effect of piefenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Radiol* 2012 (in press). 査読有

3. Matsushita K, Kanna M, Yazawa T, Shimizu S, Nitta M, Takamizawa T, Arakawa K, Yano H, Nishikawa M, Himeno H. Lung-term survivor with pulmonary veno-occlusive disease. *Circulation* 125: e503-e506, 2012. 査読有
4. Sato H, Sakaeda M, Ishii J, Kashiwagi K, Shimoyamada H, Okudela K, Tajiri M, Ohmori T, Ogura T, Woo T, Masuda M, Hirata K, Kitamura H, Yazawa T. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene silencing in lung adenocarcinomas. *Pathol Int* 61: 19-27, 2011. 査読有
5. Sakamoto S, Yazawa T, Baba Y, Sato H, Kanegae Y, Hirai T, Saito I, Goto T, Kurahashi K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 489-497, 2011. 査読有
6. Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, Kitamura H, Masuda M. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* 4: 32-42, 2010. 査読有
7. Iwasawa T, Ogura T, Takahashi H, Asakura A, Gotoh T, Yazawa T, Inoue T. Pneumothorax and idiopathic pulmonary fibrosis. *Jpn J Radiol* 28: 672-679, 2010. 査読有
8. Okudela K, Yazawa T, Tajiri M, Omori T, Takahashi K, Woo T, Shimoyamada H, Ogawa N, Kitamura H. A case of epithelial-myoeithelial carcinoma of the bronchus - a review of reported cases and a comparison with other salivary gland-type carcinomas of the bronchus. *Pathol Res Pract* 206: 121-129, 2010. 査読有
9. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Kitamura H. Morphometric profiling of lung cancers - its association with clinicopathologic, biologic, and molecular genetic features. *Am J Surg Pathol* 34: 243-255, 2010. 査読有
10. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Kitamura H. Proposal of an improved histological sub-typing system for lung adenocarcinoma - significant prognostic values for stage I disease. *Int J Clin Exp Pathol* 25: 348-366, 2010. 査読有
11. Shimoyamada H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Ishii J, Sakaeda M, Kashiwagi K, Suzuki T, Mitsui H, Woo T, Tajiri M, Ohmori T, Ogura T, Masuda M, Oshiro H, Kitamura H. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor-A expression in lung cancer cells. *Am J Pathol* 177: 70-83, 2010. 査読有
12. Woo T, Okudela K, Yazawa T, Wada N, Ogawa N, Ishiwa N, Tajiri M, Rino Y, Kitamura H, Masuda M. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 65: 355-362, 2009. 査読有
13. Iwasawa T, Asakura A, Sakai F, Kanauchi T, Gotoh T, Ogura T, Yazawa T, Nishimura J, Inoue T. Assessment of prognosis of patients with idiopathic pulmonary fibrosis by computer-aided analysis of CT images. *J Thorac Imaging* 24: 216-222, 2009. 査読有
14. Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, Sato H, Shimoyamada H. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer* 66: 275-281, 2009. 査読有
15. Okudela K, Woo T, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, Masuda M, Kitamura H. Significant association between EGFR-mutated lung adenocarcinoma and past illness from gastric cancer or uterine myoma: its implication in carcinogenesis. *Lung Cancer* 66: 287-291, 2009. 査読有
16. Okudela K, Yazawa T, Ishii J, Woo T, Mitsui H, Bunai T, Sakaeda M, Shimoyamada H, Sato H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Sugimura H, Kitamura H. Down-regulation of FXYD3 expression in human lung cancers: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 175: 2646-2656, 2009. 査読有
17. Okudela K, Yazawa T, Woo T, Sakaeda M, Ishii J, Mitsui H, Shimoyamada H, Sato H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Takahashi T, Sugimura H, Kitamura H. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 175: 867-881, 2009. 査読有
18. 菅間 博, 矢澤卓也. 甲状腺腫瘍と TTF-1. *病理と臨床* 27: 460-467, 2009. 査読有
19. Kitamura H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Shimoyamada H. Small cell lung

cancer: significance of RB alterations and TTF-1 expression in its carcinogenesis, phenotype, and biology. *Endocr Pathol* 20: 101-107, 2009. 査読有

20. Yazawa T, Sato H, Shimoyamada H, Okudela K, Woo T, Tajiri M, Ogura T, Ogawa N, Suzuki T, Mitsui H, Ishii J, Miyata C, Sakaeda M, Goto K, Kashiwagi K, Masuda M, Takahashi T, Kitamura H. *Am J Pathol* 175: 976-987, 2009. 査読有

[学会発表] (計12件)

1. 下山田博明, 大森嘉彦, 榮田昌史, 有益優, 石井 順, 矢澤卓也, 菅間 博. 甲状腺癌において TTF-1 により発現変化する遺伝子の網羅的解析. 第 101 回日本病理学会総会. 2012.04.28. 東京.
2. 石井 順, 有益 優, 榮田昌史, 柏木維人, 下山田博明, 佐藤華子, 宮田千恵, 藤原正親, 菅間 博, 青木一郎, 矢澤卓也. 肺癌の神経/神経内分泌形質に *ASCL1* および *REST* が与える影響の解析. 第 101 回日本病理学会総会. 2012.04.27. 東京.
3. 榮田昌史, 佐藤華子, 宮田千恵, 石井 順, 有益 優, 柏木維人, 下山田博明, 菅間 博, 青木一郎, 矢澤卓也. 肺癌における Thyroid Transcription Factor-1 の発現機序に関与する因子の検索. 第 101 回日本病理学会総会. 2012.04.27. 東京.
4. 矢澤卓也. 「神経内分泌腫瘍の病理診断最近の進歩」神経内分泌癌の形質を制御する転写因子についての機能解析. 第 15 回日本内分泌病理学会学術総会シンポジウム. 2011.10.24. 東京.
5. 柏木維人, 石井 順, 榮田昌史, 有益優, 佐藤華子, 奥寺康司, 下山田博明, 矢澤卓也. 神経内分泌マーカー発現に対する NeuroD, *ASCL1* の関与について. 第 100 回日本病理学会総会. 2011.04.28. 横浜.
6. 奥寺康司, 寓 哲漢, 三井秀昭, 矢澤卓也, 下山田博明, 田尻道彦, 小川伸郎, 益田宗孝, 北村 均. An altered histological sub-typing system for lung adenocarcinoma. 第 99 回日本病理学会総会. 2010.04.28. 東京.
7. 佐藤華子, 榮田昌史, 石井 順, 柏木維人, 奥寺康司, 下山田博明, 北村 均, 矢澤卓也. IGFBP-4 expression deficiency by epigenetic silencing in non-small cell lung cancers. 第 99 回日本病理学会総会. 2010.04.28. 東京.
8. 柏木維人, 石井 順, 榮田昌史, 佐藤華子, 奥寺康司, 下山田博明, 北村 均,

矢澤卓也. 肺癌細胞における NeuroD 発現は Neural Cell Adhesion Molecule 1 (NCAM1) を誘導する. 第 99 回日本病理学会総会. 2010.04.28. 東京.

9. 奥寺康司, 矢澤卓也, 下山田博明, 寓哲漢, 佐藤華子, 竹内智康, 石井 順, 榮田昌史, 後藤和哉, 宮田千恵, 柏木維人, 梶村春彦, 北村 均. がん細胞の異型性の分子基盤 (イオンチャンネル制御因子 *FXD3* の関与). 第 98 回日本病理学会総会. 2009.05.02. 京都.
10. 佐藤華子, 矢澤卓也, 下山田博明, 奥寺康司, 榮田昌史, 石井 順, 宮田千恵, 後藤和哉, 柏木維人, 北村 均. 癌におけるインスリン様増殖因子結合蛋白-2 (IGFBP-2) および IGFBP-4 の発現現弱機構の解析. 第 98 回日本病理学会総会. 2009.05.02. 京都.
11. 下山田博明, 矢澤卓也, 佐藤華子, 奥寺康司, 宮田千恵, 榮田昌史, 石井 順, 後藤和哉, 柏木維人, 北村 均. ヒト肺腺癌における VEGF-A の発現機序における *NAB2, egr-1* の役割の解明. 第 98 回日本病理学会総会. 2009.05.02. 京都.
12. 矢澤卓也, 佐藤華子, 宮田千恵, 下山田博明, 奥寺康司, 石井 順, 榮田昌史, 後藤和哉, 柏木維人, 北村 均. 肺腺癌における TTF-1 遺伝子プロモーターのメチル化解析. 第 98 回日本病理学会総会. 2009.05.02. 京都.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：50251054

(2) 研究分担者

奥寺 康司 (OKUDELA KOJI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10326027

下山田 博明 (SHIMOYAMADA HIROAKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60381472

佐藤 華子 (SATO HANAKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60438132

北村 均 (KITAMURA HITOSHI)

横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20094302

(H21→H22)