

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06893

研究課題名(和文) 転写抑制因子RESTおよびMYT1Lを介した神経内分泌肺癌発生機序の分子基盤解析

研究課題名(英文) Molecular basis of tumorigenesis of pulmonary neuroendocrine cancer via REST and MYT1L

研究代表者

矢澤 卓也 (Yazawa, Takuya)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRB1/TP53/REST不活化状態の肺腺癌細胞にASCL1及びPOU3F4遺伝子を共発現させることにより、腺癌細胞から神経内分泌癌細胞への形質転換に成功し、本研究では神経内分泌分化を制御する転写抑制因子として知られているRESTに加えMYT1Lにも着目し、これらの分子がどのように腺癌から神経内分泌癌への形質転換に関与しているかについて検討した。その結果、MYT1Lはその形質転換には関与していないこと、REST発現抑制はREST遺伝子プロモーターのエピジェネティック変化と3'-UTへの神経内分泌細胞特異的micro RNAの結合により引き起こされていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の肺腺癌にはEGFR遺伝子変異症例が多いことから、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)を用いた分子標的治療が、効果的かつ副作用の少ない治療法として臨床の現場に浸透した。しかし現在では治療後に生じる薬剤耐性株の出現や腺癌から神経内分泌癌への形質転換現象が惹起されることが、肺癌治療領域において大きな問題となっている。本研究成果は、予め治療前に腺癌細胞の遺伝子変異状態を検索しておくことにより、神経内分泌癌への形質転換が起こりやすい症例を同定することができる点、また神経内分泌癌の発生機序を分子病理学的に明らかにした点で、社会的にも学術的にも大きな意義を持つものとなっている。

研究成果の概要(英文)：We succeeded transformation from lung adenocarcinoma (AC) cell to neuroendocrine carcinoma (NEC) cell by artificial inactivation of RB1, TP53, and REST genes followed by transgene of ASCL1 and POU3F4. Since it had been reported that not only REST but also MYT1L are associated with neuroendocrine differentiation, we further investigated how these two transrepressors cause transformation from AC to NEC. Consequently, it was clarified that MYT1L does not affect the transformation and that REST inactivation is caused by epigenetic alteration (hypermethylation and histone deacetylation) of the promoter and binding of neuroendocrine cell-specific micro RNA to the 3'-untranslated region.

研究分野：病理学、分子病理学、腫瘍病理学

キーワード：肺癌 腺癌 神経内分泌癌 形質転換現象

1. 研究開始当初の背景

病理診断現場において、小細胞肺癌あるいは大細胞神経内分泌肺癌が典型的な組織像を呈している場合にはその診断は容易であるが、実際には小細胞肺癌と大細胞神経内分泌肺癌の中間的な形態を示す癌腫もしばしば経験され、また神経内分泌癌と非神経内分泌癌が混在した複合型神経内分泌肺癌にも遭遇する。このような事実は「神経内分泌肺癌とは未熟な神経内分泌形質を有する点でカテゴライズされるヘテロな集団」であることを我々に想起させる。

小細胞肺癌において高率に異常の見られる遺伝子には、がん抑制遺伝子である *RB1* ファミリー、*TP53* があり、Southernlandらや Schaffer らは、肺神経上皮体細胞あるいは肺上皮細胞特異的に *RB1* および *TP53* をダブルノックアウト、あるいは *RB1*、*p130*、*TP53* をトリプルノックアウトすることにより、マウス神経内分泌肺癌の作成に成功している (*Cancer Res* 70: 3877-3883, 2010; *Cancer Cell* 19: 754-64, 2011)。近年 EGFR 阻害剤投与中の EGFR 変異陽性肺腺癌患者に小細胞肺癌としての再発が起こる事例が相次いで報告されており、その形質転換機序については不明であるものの、EGFR 阻害剤使用中に小細胞肺癌が発生した多くの症例においては腺癌発生の初期の段階から *RB1* 遺伝子と *TP53* 遺伝子に異常のあるクローンが存在し、これが EGFR 阻害剤による治療を経て顕在化してくるのではないかという興味深い報告がなされている (*J Clin Oncol* 26: 3065-3074, 2017)。また Miyoshi らは、大細胞神経内分泌肺癌が小細胞肺癌と同様の genomic profile を有するものの、30-35%の症例では非小細胞肺癌と同様の遺伝子異常を有すると報告しており (*Clin Cancer Res* 23: 757-765, 2017)、神経内分泌肺癌が少なからず非神経内分泌肺癌の形質を併せ持つ事実が報告されている。これらの報告は、*RB1* ファミリー、*TP53* の不活化が神経内分泌肺癌の発生に重要であること、また神経内分泌肺癌が非神経内分泌癌からも発生しうることを強く示唆している。

癌細胞の形質転換現象は、細胞型、組織型の変化として表現され、一種のダイレクトリプログラミング現象と捉えることもできるが、その機序には不明な点が多く、実験的に再現することは難しい。マウス胎児線維芽細胞を用いたリプログラミング研究では、マウス胎児線維芽細胞に *ASCL1* 単独あるいは *ASCL1*、*POU3F2*、*MYT1L* の共導入により神経細胞へ分化誘導できること (*Nature* 463: 1035-1041, 2010; *Nature* 476: 220-223, 2011; *Cell* 155: 621-635, 2013; *Stem Cell Reports* 3: 282-296, 2014)、またマウス/ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞に *ASCL1*、*POU3F2*、*MYT1L*、*NEUROD1* を共導入することにより神経細胞への分化が誘導できたとの報告 (*Sci Rep* 7: 44840, 2017)がある。我々はこれまで非神経内分泌肺癌細胞に *ASCL1* や *NEUROD1* を遺伝子導入することにより神経内分泌マーカー発現が誘導されることを報告してきたが (*Pathol Int* 62: 232-245, 2012; *Lab Invest* 93: 408-421, 2013; *Pathol Int* 63: 158-168, 2013)、完全なる神経内分泌肺癌細胞への形質転換現象を惹起するまでには至らなかった。また我々は上皮間葉移行状態にある未分化な非神経内分泌肺癌細胞に *POU3F4* あるいは *POU4F2* を遺伝子導入することにより神経内分泌肺癌細胞への形質転換を惹起させることに成功しているが、肺腺癌細胞において同様の形質転換を惹起させることは困難であった (*Pathol Int* 64: 415-422, 2014)。更に、*RB1*、*TP53* の遺伝子編集により上皮間葉転換状態にある肺腺癌細胞に神経内分泌細胞特異的転写因子遺伝子導入を行っても神経内分泌癌細胞への形質転換は部分的であり、完全なる形質転換現象を惹起するには至っていない。このような自身の経験から、非神経内分泌肺癌細胞を神経内分泌肺癌細胞に形質転換させるには、癌細胞自体の未分化な状態、すなわち細胞分化の可塑性を備えている幹細胞のような未分化状態および神経内分泌分化特異的転写活性化因子の発現に加え、さらなる条件として神経内分泌分化を制御する転写抑制因子の発現状態が重要なのではないかと考えた。至った。

神経内分泌分化を制御する転写抑制因子としては *REST*、*MYT1L* が知られている。*REST* は遺伝子上に存在する RE-1 なる特異的配列に結合し、他の DNA 不活化に関わる因子をリクルートすることにより結合遺伝子を不活性化する。神経内分泌細胞特異的に活性化している 2000 種以上の遺伝子のプロモーター、エクソン、イントロンには RE-1 配列が存在し、また *REST* は通常非神経内分泌細胞に発現している一方、神経内分泌細胞には発現していないため、結果として非神経内分泌細胞において神経内分泌細胞特異的遺伝子は不活化される。一方 *MYT1L* は遺伝子上の AAGTTT なる特異的配列に結合し非神経内分泌分化を抑制するとの報告がある (*Nature* 544: 245-249, 2017)。我々はこれまでに、肺癌細胞において、*REST* 発現が非神経内分泌肺癌細胞に限定的である一方、*MYT1L* 発現は神経内分泌肺癌細胞に限定的である事実を掴んでおり、上記の仮説に結びつく結果を得ている。

2. 研究の目的

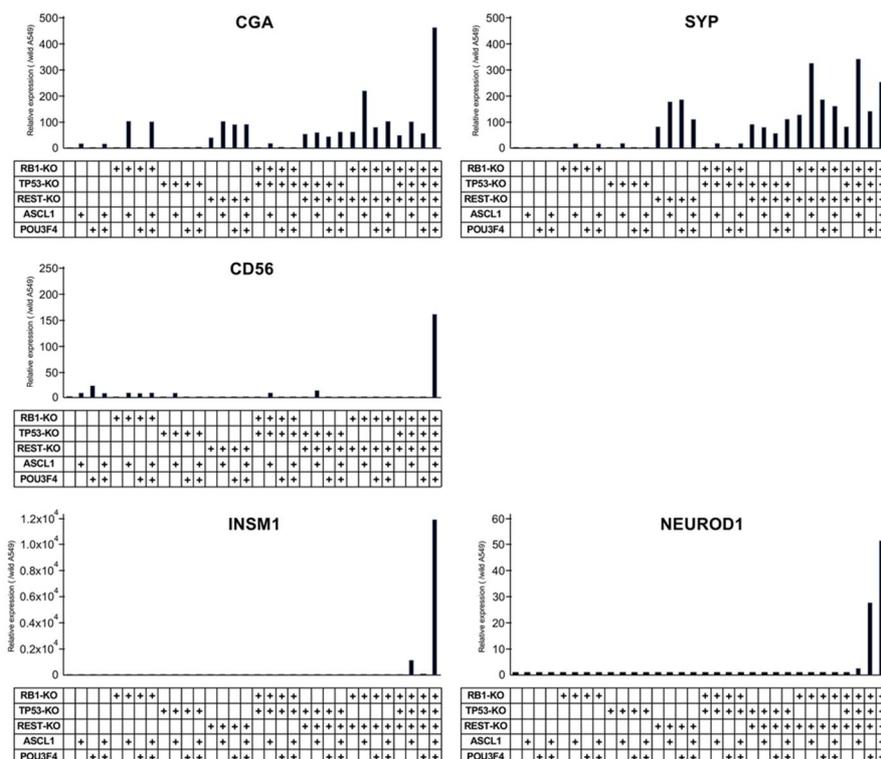
そこで我々は、これまで蓄積してきた研究成果を基盤に、非神経内分泌分化特異的な転写抑制因子である *REST* および神経内分泌細胞特異的な転写抑制因子である *MYT1L* に焦点を当て、再現性のある完全なる非神経内分泌肺癌細胞から神経内分泌癌細胞への形質転換現象惹起のための必要条件を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) これまで肺腺癌細胞株 A549 および CRISPR-Cas9 システムを用い樹立してきた、*RB1* ノックアウト株、*TP53* ノックアウト株、*RB1/TP53* ダブルノックアウト株に対し、新たに *REST* ノックアウト株を作成樹立した。
- (2) 神経内分泌形質獲得の有無については、神経内分泌マーカー (chromogranin A, synaptophysin, CD56) および神経内分泌細胞特異的転写因子 (*INSM1*, *NEUROD1*) の発現状態変化により評価した。上記の A549 シングルノックアウト株、ダブルノックアウト株、トリプルノックアウト株における神経内分泌マーカーおよび神経内分泌細胞特異的転写因子の発現状態について、定量的 RT-PCR により検索した。
- (3) 上記検索の結果、神経内分泌癌への形質転換が惹起されていない場合、これらの細胞株に対し神経内分泌細胞分化に関与する特異的転写因子である *ASCL1*、*POU3F4* を単独あるいは共導入し、形質転換の有無を評価した。
- (4) 形質転換していると判断される細胞株について、免疫不全マウス皮下に腫瘍を形成させることにより、その形態変化を解析した。
- (5) 肺腺癌細胞株 A549 および CRISPR-Cas9 システムを用い樹立した、*RB1* ノックアウト株、*TP53* ノックアウト株、*RB1/TP53* ダブルノックアウト株に対し、レトロウィルスベクターを用いた *MYT1L* の遺伝子導入を行い、神経内分泌癌への形質転換の有無について解析した。
- (6) 上記(3)、(4)により *REST* の発現不全状態が神経内分泌癌への形質転換に重要であることが判明したため、神経内分泌癌における *REST* 遺伝子不活化状態がどのような機序で生じるのかについて検索を進めた。具体的には *REST* 遺伝子プロモーターのエピジェネティック変化(過メチル化、ヒストン脱アセチル化)、micro RNA (miRNA) の関与について、それぞれバイサルファイトシークエンス、メチル化/ヒストン脱アセチル化解除実験、および網羅的 miRNA 発現解析、miRNA 強制発現解析、mimic miRNA/inhibitor を用いたルシフェラーゼアッセイによる検索を行なった。

4. 研究成果

- (1) A549 肺腺癌細胞における神経内分泌マーカーの発現誘導は、*RB1* ノックアウト株、*TP53* ノックアウト株、*RB1/TP53* ダブルノックアウト株では起こらなかった。一方で、*REST* ノックアウトにより chromogranin A や synaptophysin の発現誘導が生じたが、CD56 や *ASCL1*、*POU3F4* の誘導は起こらず、結果的に神経内分泌癌への形質転換は起こらないと結論付けた。
- (2) そこでこれらのノックアウト株に *ASCL1*、*POU3F4* を単独あるいは共導入し、形質転換の有無を評価した。すると、*ASCL1* および *POU3F4* を共導入することにより、CD56 を含めた神経内分泌マーカーの顕著な誘導が見られ、*INSM1* や *NEUROD1* の発現も誘導されることが明らかになった。



- (3) 免疫不全マウス皮下に形成させた腫瘍の病理組織学的、免疫組織化学的検索を施行したところ、*RB1/TP53/REST* をトリプルノックアウトし、*ASCL1/POU3F4* の共導入を行なった A549 細胞

は神経内分泌癌としての特徴を有していることが明らかになった。

(4) A549 *RB1* ノックアウト株、*TP53* ノックアウト株、*RB1/TP53* ダブルノックアウト株に対し *MYT1L* を強制発現させたが、神経内分泌マーカーおよび *ASCL1*、*POU3F4* の発現誘導は起こらなかったことから、神経内分泌癌への形質転換は起こらないと結論付けた。

(5) 神経内分泌癌における *REST* 発現不全がどのような機序で生じているのかについて、更に追求した。*REST* 遺伝子配列データを基に CpG アイランドの有無を検索したところ、*REST* 遺伝子プロモーター領域には巨大な CpG アイランドの存在が確認された。

(6) そこで、神経内分泌肺癌細胞株および非神経内分泌肺癌細胞株を用い、同領域のメチル化状態について検索した。その結果、神経内分泌肺癌細胞株において CpG アイランド内の下流側が過メチル化状態にあることが判明した。

(7) (6)の結果を受け、5-aza 2'-deoxycytidine および trichostatin A によるメチル化解除実験、ヒストン脱アセチル化解除実験を行なったところ、5-aza 2'-deoxycytidine 処理により *REST* mRNA 発現は数倍程度亢進し、trichostatin A により 40 倍亢進することが明らかになった。

(8) 神経内分泌肺癌特異的に高い発現の見られる miRNA のうち *REST* 遺伝子の 3'-untranslated region に結合可能な数種の miRNA に着目し、当該 miRNA 発現による *REST* の発現変化について更に検討した。その結果、1 種の miRNA が有意に *REST* 発現を抑制することが明らかになった。

[参考文献]

- (1) Schaffer BE, et al. Loss of p130 accelerates tumor development in a mouse model for human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res* 70: 3877-3883, 2010.
- (2) Sutherland KD, et al. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of *Trp53* and *Tb1* in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell* 19: 754-64, 2011.
- (3) Lee JK, et al. Clonal history and genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 26: 3065-3074, 2017.
- (4) Miyoshi T, et al. Genomic profiling of large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 23: 757-765, 2017.
- (5) Vierbuchen T, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041, 2010.
- (6) Pang ZP, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476: 220-223, 2011.
- (7) Wapinski OL, et al. Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155: 621-635, 2013.
- (8) Chanda S, et al. Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor *ASCL1*. *Stem Cell Reports* 3: 282-296, 2014.
- (9) Chuang W, et al. Partial reprogramming of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes into neurons. *Sci Rep* 7: 44840, 2017.
- (10) Kashiwagi K, et al. 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.
- (11) Sakaeda M, et al. Neural-lineage-specific homeoprotein *BRN2* is directly involved in *TTF1* expression in small-cell lung cancer. *Lab Invest* 93: 408-421, 2013.
- (12) Ishii J, et al. POU domain transcription factor *BRN2* is crucial for expression of *ASCL1*, *ND1* and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer. *Pathol Int* 63: 158-168, 2013.
- (13) Ishii J, Sato H, et al. Class III/IV POU transcription factors expressed in small cell lung cancer cells are involved in proneural/neuroendocrine differentiation. *Pathol Int* 64: 415-422, 2014.
- (14) Mall M, et al. *Myt1l* safeguards neuronal identity by actively repressing many non-neuronal fates. *Nature* 544: 245-249, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masawa M, Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Ishii J, Miyata-Hiramatsu C, Iwamoto M, Kohno K, Miyazawa T, Onozaki M, Noda S, Shimizu Y, Niho S, Yazawa T	4. 巻 192
2. 論文標題 REST inactivation and coexpression of ASCL1 and POU3F4 are necessary for the complete transformation of RB1/TP53-inactivated lung adenocarcinoma into neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 847-861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2022.03.007	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 Ishii J, Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Nakadate K, Iwamoto M, Kohno K, Miyata-Hiramatsu C, Masawa M, Onozaki M, Noda S, Miyazawa T, Takagi M, Yazawa T	4. 巻 53
2. 論文標題 Endocrine secretory granule production is caused by a lack of REST and intragranular secretory content and accelerated by PROX1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Mol Histol	6. 最初と最後の頁 437-448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10735-021-10055-5	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 Kashiwagi K, Sato-Yazawa H, Ishii J, Kohno K, Tatsuka I, Miyazawa T, Takagi M, Chiba H, Yazawa T	4. 巻 42
2. 論文標題 LXR activation inhibits proliferation of small cell lung cancer cells through depletion of cellular cholesterol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 2923-2930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15774	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 矢澤（佐藤）華子、柏木維人、石井 順、矢澤卓也	4. 巻 38
2. 論文標題 肺癌におけるリプログラミング現象	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 79-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢澤華子、柏木維人、石井 順、河野 翔、小野崎聖人、野田修平、金野晃大、宮澤公輔、矢澤卓也
2. 発表標題 RB1/TP53不活化肺腺癌細胞はREST不活化と神経特異的転写因子共発現により神経内分泌癌に形質転換する
3. 学会等名 第26回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 正和明哲、矢澤卓也、矢澤華子、柏木維人、石井 順、清水泰生、仁保誠治
2. 発表標題 RB1/TP53不活化肺腺癌細胞はREST不活性化と神経特異的転写因子共発現により神経内分泌癌に形質転換する
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢澤卓也、矢澤華子、柏木維人、石井 順
2. 発表標題 分子病理学的解析から見えてくる肺神経内分泌腫瘍の組織発生機序
3. 学会等名 第27回日本臨床内分泌病理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井 順、矢澤華子、柏木維人、河野 翔、宮澤公輔、平松千恵、小野崎聖人、金野晃大、野田修平、矢澤卓也
2. 発表標題 内分泌顆粒はREST抑制およびPROX1・顆粒内容物質の発現により形成される
3. 学会等名 第27回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kashiwagi K, Sato-Yazawa H, Ishii J, Miyazawa T, Kamimura T, Miyata S, Chiba H, Yazawa T
2. 発表標題 Claudin-4 regulates the malignant characteristics in small-cell lung cancer cell lines
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高梨歩夢、宮澤公輔、石井 順、矢澤華子、柏木維人、平松千恵、矢澤卓也
2. 発表標題 内分泌顆粒の形成に顆粒内容物質が与える影響の検討
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024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	矢澤 華子 (佐藤華子) (Yazawa Hanako) (60438132)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	
研究 分担者	柏木 維人 (Kashiwagi Korehito) (50722451)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

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