

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06957

研究課題名（和文）新規治療標的の同定を目指した小細胞肺がんの脳転移メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of Brain metastasis mechanisms in small cell lung cancer for the identification of novel therapeutic targets

研究代表者

坂本 修一（Sakamoto, Shuichi）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・主任研究員

研究者番号：60346070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：小細胞肺がんの脳転移形成に関与する因子を探索するために、ヒト小細胞肺がん細胞株DMS273細胞をヌードマウスの脳実質へ繰り返し移植し、脳における腫瘍形成能が亢進した細胞を2種類作成した。また、比較のためにヌードマウス皮下への移植を繰り返して皮下における腫瘍形成能が亢進した細胞も2種類作成した。遺伝子発現プロファイルの解析により、脳への移植を繰り返した細胞で脂質トランスポーターをコードする遺伝子Xの発現が増加していることに着目した。脳への移植を繰り返して得た細胞で遺伝子Xのノックダウンを行うと、in vitroでのスフェア形成能が有意に低下し、マウスにおける腫瘍形成能も低下する傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でヒト小細胞肺がん細胞株DMS273をヌードマウス脳実質あるいは皮下での腫瘍形成を繰り返して作成した細胞群は、表現型や遺伝子発現プロファイルにそれぞれ特徴がある。これは脳実質あるいは皮下の微小環境への適応機構の違いを反映している可能性があり、その解析における有用な研究材料となるだろう。実際に、それらの細胞群の解析から着目した遺伝子Xは、これまで小細胞肺がんにおける意義は不明だったが、小細胞肺がん細胞株のスフェア形成能や腫瘍形成能への寄与が示唆された。今後のさらなる解析により、遺伝子Xは有効な治療法が少ない小細胞肺がんの新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To identify factors involved in the formation of brain metastases in small cell lung cancer, we repeatedly transplanted the human small cell lung cancer cell line DMS273 into the brain parenchyma of nude mice, generating two cell lines with enhanced tumorigenic potential in the brain. Additionally, for comparative purposes, we transplanted the cells into the subcutaneous tissue of nude mice, creating two cell lines with enhanced tumorigenic potential in the subcutaneous tissue. Analysis of the gene expression profiles of these cells revealed an increased expression of gene X, which encodes a lipid transporter, in the cells that had undergone repeated brain transplantation. Knockdown of gene X in these cells resulted in a significant decrease in sphere-forming ability in vitro and a trend toward reduced tumorigenic potential in nude mice.

研究分野：腫瘍生物学

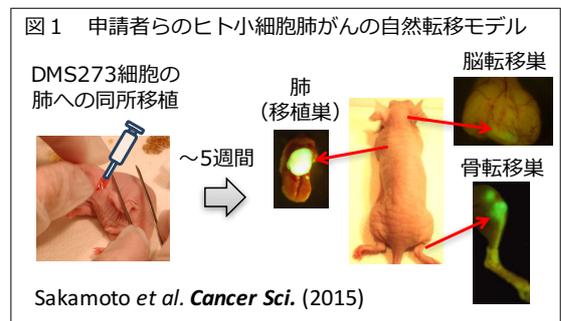
キーワード：小細胞肺がん がん転移

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界の全がん死の最大の原因である。その約2割を占める小細胞肺癌は、診断確定時には他臓器への転移が認められることが多いため、手術の対象になる症例は稀で、抗癌剤や放射線による治療が行われる。しかし初回治療は奏功するものの、殆どの場合遠隔転移による再発を来すため、2年生存率は20%以下と非常に予後が悪い。最近になって小細胞肺癌でも免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-L1 抗体）が承認されたが、その効果は限定的であり、新規治療法の開発が現在も求められている。特に、小細胞肺癌を致死的な疾患にしている主因である遠隔転移を制御することが、非常に重要な課題である。

癌の転移は多くの過程を経て成立する。細胞の運動・接着に関わるサイトカインや接着分子、それらの発現を制御する転写因子や miRNA 等の関与が、乳癌やメラノーマ等で示されている。しかし転移機構は癌種や転移先臓器によって異なる点が多く、小細胞肺癌の転移機構については、個体レベルで転移への寄与が実証された因子は、Notch シグナル因子 DLL4 や転写因子 Pea3 及び NFIB、PTHrP 等が、また脳転移に特異的な因子として、血液脳関門に影響する PLGF 並びに AnnexinA1 の関与が示されているが、乳がんや非小細胞肺癌等と比較して実証されている因子は著しく少ない。その理由の一つに、手術が少なく患者由来試料（特に転移巣）の入手が困難な点が挙げられる。

研究代表者らは、ヒト小細胞肺癌細胞株 DMS273 をヌードマウス肺に同所移植して遠隔転移巣を形成させる自然転移モデルを独自に開発した (Sakamoto *et al. Cancer Sci.* 2015) (図1)。本モデルは臨床像をよく反映しており、臨床検体の少なさという小細胞肺癌研究の障壁を克服し得る優れた研究材料である。実際に申請者らは、本モデルの肺移植巣と遠隔転移巣からがん細胞を回収し、それらの遺伝子発現プロファイルを比較することで、小細胞肺癌の新規転移促進因子 IFITM1 を同定することに成功している (Sakamoto *et al. Int. J. Mol. Sci.* 2020)。また本モデルは、他グループの小細胞肺癌の自然転移モデルと比べて脳転移を形成する頻度が顕著に高いという特徴もある。そこで本研究では、本モデルで使用している GFP 標識した DMS273 細胞を活用して「小細胞肺癌がどのようにして脳の微小環境に順応して脳転移を形成するのか」という問いに取り組むことにした。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳転移巣に対する新規治療法開発に役立てるために、小細胞肺癌の脳転移形成に関わる因子、その中でも脳微小環境に順応して生存・増殖する過程に関与する因子を中心に探索し、その脳転移形成における機能を解明することとした。脳微小環境への順応過程を中心とした小細胞肺癌の新たな脳転移因子の同定は、研究が進んでいない小細胞肺癌の脳転移機構解明の重要な知見をもたらすだけでなく、将来的には脳微小環境への順応機構を標的とした治療法開発への展開も期待される。

## 3. 研究の方法

### 3-I. *in vitro* での増殖能の評価

通常の接着培養における増殖能の評価では、接着培養用 96 ウェルプレート (SUMILON) を用いて、2% FBS を含む DMEM 培地 100  $\mu$ L に  $1 \times 10^3$  個の細胞を播種した。足場非依存性増殖能の評価では、低

接着性 96 ウェルプレート (PrimeSurface 96-well-U plate、SUMILON) を用いて、2%FBS を含む DMEM 培地 100  $\mu$ L に  $1 \times 10^3$  個の細胞を播種した。3 日間培養したのち、MTT アッセイで生細胞数を測定した。

### 3-II. スフェア形成能の評価

低接着性 6 ウェルプレート (Ultra-low attachment 6-well plate、CORNING) を用いて、20 ng/ml EGF および IGF-I と、100 ng/ml 塩基性 FGF ならびに 0.4% BSA を含む DMEM/F12 培地 (Invitrogen) 2 mL に  $1 \times 10^3$  個の細胞を播種した。7 日間培養したのち形成されたスフェアの数を計測した。

### 3-III. ノードマウスの脳実質および鼠蹊部皮下へのヒトがん細胞の異種移植実験

異種移植実験には 8 週齢の雌の Balb/c nu/nu マウス (チャールスリバー) を用いた。脳実質への移植では、マウスを麻酔したのちに頭頂部の皮膚を切開し、30G の針で頭蓋骨を貫通させて脳実質に 2  $\mu$ L の細胞懸濁液を注入した。鼠蹊部皮下への移植では、30G の針で 10  $\mu$ L の細胞懸濁液を注入した。移植後 2 週間飼育した後に解剖して、腫瘍巣の大きさを測定した。

### 3-IV. 細胞の RNA の抽出と定量的 RT-PCR

がん細胞の total RNA は、RNeasy Plus Kit (Qiagen) を使用して抽出した。定量的 RT-PCR は、逆転写システム (Promega) と TB Green® Premix Ex Taq™ II および Thermal Cycler Dice Real Time System (いずれも Takara Bio) を用いた。相対発現レベルを  $\beta$ -アクチンを基準として  $\Delta\Delta$ CT 法により算出した。

### 3-V. mRNA マイクロアレイ解析

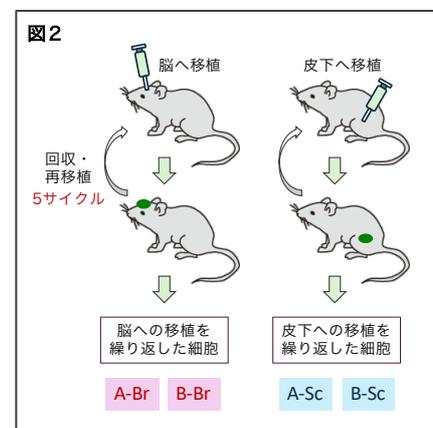
がん細胞の total RNA 200 ng から Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-color (Agilent Technologies) を使用して二本鎖 cDNA を合成し、T7 RNA ポリメラーゼで増幅して最大約 10  $\mu$ g の蛍光標識 cRNA を作成した。蛍光標識 cRNA を SurePrint G3 Human GE 8  $\times$  60 K オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Agilent Technologies) にハイブリダイズし、アレイスキャナーでデータを取得した (スキヤニングは外注)。得られたデータを GeneSpring GX ソフトウェア (Agilent Technologies) を用いて解析した。

### 3-VI. shRNA を用いた遺伝子ノックダウン

pLenti6/V5-GW/lacZ (Invitrogen) を基に、マウス U6 プロモーターから shRNA を発現するレンチウイルスベクターを構築した。shRNA 発現用レンチウイルスベクター、Gag/pol、および Env プラスミドを、FuGeneHD (Promega) を使用して HEK293T 細胞にトランスフェクションし、翌日に 10% FBS を含む DMEM に培地交換して 2 日間培養した。培養上清を孔径 0.4  $\mu$ m のメンブレンフィルターで濾過してウイルス液とし、A\_Br 細胞に一日インキュベートして感染させた。2  $\mu$ g/ml ピューロマイシンを含む培地で感染細胞を培養し、shRNA を持続的に発現する細胞を選択した。

### 3-VII. ウェスタンブロット

6 ウェルプレートで一晩培養した細胞を溶解バッファー (20 mM HEPES [pH 7.9]、150 mM NaCl、1% Triton X-100、10% グリセロール、1 mM EDTA、50 mM NaF、2 mM NaPPi、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、50  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{MO}_4$ 、 $1 \times$  Complete™・Roche) で溶解し、13,000  $\times$  g で 15 分間遠心分離した。上清に 4  $\times$  SDS サンプルバッファーを加えて煮沸したサンプルを、7.5% SDS-PAGE で分離して PVDF 膜 (Millipore) に転写した。タンパク質の検出には、適切な一次抗体および HRP 標識二次抗体と、ECL Prime Western Blotting Detection System (Cytiva) を使用した。



## 4. 研究の成果

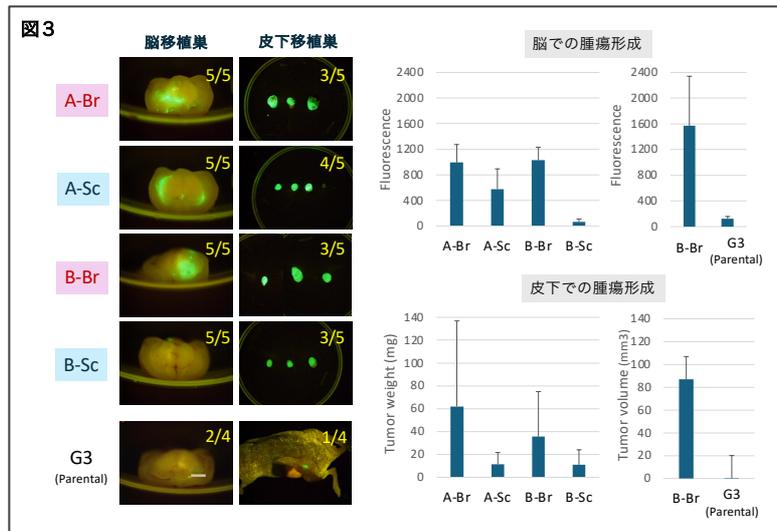
### 4-I: 脳及び皮下での増殖に適応した細胞の作成

ヌードマウス脳実質あるいは鼠蹊部皮下に少数 ( $10^3$  から  $10^4$  個) の GFP 標識 DMS273 細胞 (G3 細胞) を移植し、2 週間程度飼育した後に形成された腫瘍巣を摘出した。摘出した腫瘍巣から GFP 陽性のがん細胞を回収して培養し、再びマウスに移植する工程を計 5 回繰り返した。脳移植を繰り返して得られた二つの細胞を A-Br 及び B-Br、皮下移植を繰り返して得られた二つの細胞を A-Sc 及び B-Sc と命名した (図 2)。これらの細胞では共通して、親株である G3 細胞よりも形態的に細胞が小さくなる傾向が見られた。

	in vitro 増殖能		in vivo 腫瘍形成能	
	接着	足場非依存性	脳	皮下
A-Br	+	++	+++	++
A-Sc	++	++	++	+
B-Br	++	++	+++	++
B-Sc	+++	++	+/-	+
G3 (Parental)	+	+	-	-

### 4-II: 脳及び皮下での増殖に適応した細胞の表現型

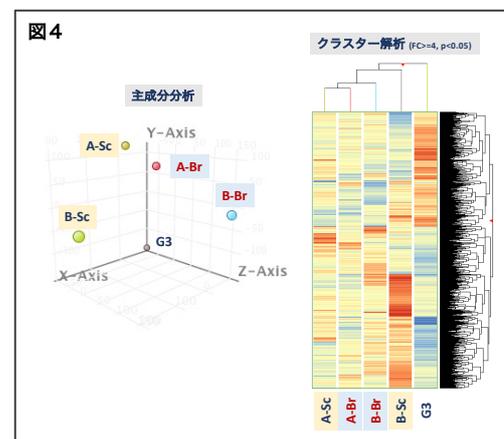
上記の 4 細胞及び親株である G3 細胞について、in vitro における接着状態での増殖能と、低接着プレートを用いた非接着状態での増殖能 (足場非依存性増殖能) を検討した。その結果、接着状態での増殖能は親株と比較して同程度のものから亢進しているものまで幅があった。一方、非接着状態での増殖能、すなわち足場非依存性増殖能は、4 細胞とも共通して亢進していることがわかった (表 1)。



次に、上記 4 細胞のヌードマウスの脳実質及び皮下における造腫瘍性を検討した (図 3)。脳実質へは  $1 \times 10^4$  個、鼠蹊部皮下には  $2.5 \times 10^4$  個を移植し、2 週間後に解剖して腫瘍由来の GFP 蛍光量を測定した。その結果、脳移植により得られた 2 細胞 (A-Br 細胞および B-Br 細胞) では、脳における造腫瘍性の顕著な亢進が見られ、その上、皮下における造腫瘍性も亢進していた。一方、皮下移植により得られた 2 細胞 (A-Sc 細胞および B-Sc 細胞) では、皮下における造腫瘍性は亢進したものの、その程度は脳移植により得られた 2 細胞よりも低かった。また、脳においては A-Sc 細胞では一定の造腫瘍性が認められたが、B-Sc 細胞では微小な移植巣しか確認できなかった。以上の結果から、移植を繰り返して得られた 4 細胞が各々異なる特徴を有することが明らかになった (表 1)。

### 4-III: 得られた 4 細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

得られた 4 細胞の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。まず、小細胞肺がんの脳転移など遠隔転移形成に寄与することが報告されている 6 遺伝子 (NFIB、PEA3、DLL4、PLGF、AnnexinA1、PTHrP) について定量的 RT-PCR により測定し



たが、親株 G3 細胞と比較して 4 細胞のいずれかで有意に増加する遺伝子は見つからなかった。

次に mRNA マイクロアレイを用いて、得られた 4 細胞のゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルを取得した。4 細胞の遺伝子発現プロファイルの主成分分析および変動遺伝子群のクラスター解析から、脳での造腫瘍能が低い B-Sc 細胞が、他の 3 細胞と異なるプロファイルを持つことがわかった (図 4)。

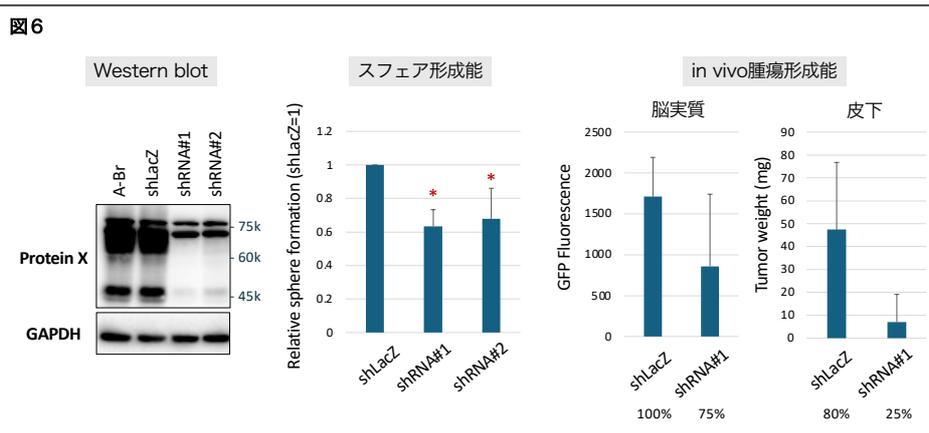
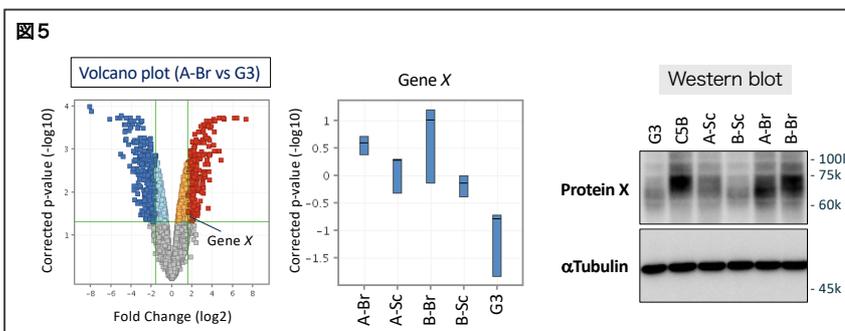
#### 4-IV: 脳における腫瘍形成に寄与する遺伝子の探索

脳における腫瘍形成に重要な遺伝子を探索するために、脳での腫瘍形成能が亢進した A-Br 細胞の遺伝子発現プロファイルを詳細に分析し、脂質トランスポーター

をコードする遺伝子 *X* が A-Br 細胞で高発現していることに着目した (図 5)。mRNA マイクロアレイのデータでは、親株と比較して 4 細胞のいずれでも発現が増加しており、特に脳で腫瘍形成させた A-Br 細胞と B-Br 細胞でより発現上昇していた。ウェスタンブロットにより *X* タンパク質の発現レベルを検討したところ、A-Br 細胞に加えて、B-Br 細胞や DMS273 細胞株の悪性化亜株 C5B でも発現が高いことがわかった。

そこで、A-Br 細胞において shRNA を用いた遺伝子 *X* の持続的ノックダウンを行ない、細胞の表現型への影響を検討した (図 6)。In vitro での増殖や浸潤能などを評価し、ノックダウン細胞ではスフェア形成能が有意に低下することを見出した。In vivo においても、ノックダウン細胞をヌードマウスの脳実質 (2×10<sup>4</sup>cells) 及び鼠蹊部皮下 (4×10<sup>3</sup>cells) に移植し腫瘍形成能を評価した。その結果、脳及び皮下のいずれにおいてもノックダウン細胞 (shRNA#1) はコントロール細胞 (shLacZ) と比較して腫瘍形成が低下する傾向が認められた。以上の結果は、遺伝子 *X* が A-Br 細胞の腫瘍形成能に寄与していることを示唆している。遺伝子 *X* の小細胞肺癌における機能についてはこれまで報告がなく、小細胞肺癌のがん進展に寄与する新規因子である可能性があり、現在他の細胞株での評価を進めているところである。

本研究で脳実質あるいは皮下での腫瘍形成を繰り返して作成した 4 細胞は、表現型や遺伝子発現プロファイルに各々特徴があった。これは脳実質あるいは皮下の微小環境への適応機構の違いを反映している可能性があり、その解析における有用な研究材料になりうる。実際に 4 細胞の遺伝子発現プロファイルからは、遺伝子 *X* 以外にも興味深い変動パターンを示す遺伝子が複数見つかり、これらの遺伝子の評価も今後行う予定である。



本研究で脳実質あるいは

皮下での腫瘍形成を繰り返して作成した 4 細胞は、表現型や遺伝子発現プロファイルに各々特徴があった。これは脳実質あるいは皮下の微小環境への適応機構の違いを反映している可能性があり、その解析における有用な研究材料になりうる。実際に 4 細胞の遺伝子発現プロファイルからは、遺伝子 *X* 以外にも興味深い変動パターンを示す遺伝子が複数見つかり、これらの遺伝子の評価も今後行う予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Y. Kohda, S. Sakamoto, M. Umekita, T. Kimura, Y. Kubota, R. Arisaka, Y. Shibuya, H. Muramatsu, R. Sawa, S. Dan, M. Kawada and M. Igarashi	4. 巻 75
2. 論文標題 Isolation of new derivatives of the 20-membered macrodiolide bispolide from Kitasatospora sp. MG372-hF19.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Antibiotics	6. 最初と最後の頁 77-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00492-5	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂本修一、滝野隆久、川田学、畠山昌則
2. 発表標題 MT1-MMPの活性化を介してヒト小細胞肺癌細胞株DMS273の浸潤及び転移形成を促進するクローディン
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本修一、井上裕幸、滝野隆久、幸田泰子、大庭俊一、宇佐美伊保美、川田学、畠山昌則
2. 発表標題 小細胞肺癌の自然転移モデルマウスにおいて遠隔転移形成を促進するクローディンの機能解析
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuichi Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Yasuko Kohda, Shunichi Ohba, Ihome Usami, Manabu Kawada
2. 発表標題 Identification of metastatic genes in small cell lung cancer using orthotopic transplantation model
3. 学会等名 12TH AACR-JCA JOINT CONFERENCE: BREAKTHROUGHS IN CANCER RESEARCH TRANSLATING KNOWLEDGE INTO PRACTICE (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本修一、川田学
2. 発表標題 小細胞肺癌同所移植モデルの遠隔転移形成に寄与するクロードイン
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本修一、井上裕幸、幸田泰子、大庭俊一、宇佐美伊保美、川田学
2. 発表標題 小細胞肺癌の自然転移モデルマウスにおいて転移を促進するクロードインの同定
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 修一、川田 学
2. 発表標題 DMS273細胞株由来の高転移性細胞の解析による小細胞肺癌の転移促進因子の同定
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 修一、川田 学
2. 発表標題 小細胞肺癌の異種移植マウスモデルにおける新規転移促進因子の同定
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所沼津支所 研究概要 <a href="https://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/summary.html">https://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/summary.html</a> 微生物化学研究所動物施設 研究概要 <a href="https://www.bikaken.or.jp/laboratories/animal/summary.html">https://www.bikaken.or.jp/laboratories/animal/summary.html</a> 微生物化学研究所ホームページ <a href="https://www.bikaken.or.jp">https://www.bikaken.or.jp</a>
---

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

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