

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 25 年 5 月 19 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790361

研究課題名（和文） 神経内分泌悪性腫瘍における特異的転写因子を介した細胞接着因子発現制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of expression mechanisms of cell adhesion molecules via malignant neuroendocrine tumor cell-specific transcription factors

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

申請者は本研究において、神経内分泌腫瘍細胞に特異的に発現されている basic helix-loop-helix 型転写因子 NeuroD が神経細胞接着因子-1 の発現を直接誘導していること、in vitro において対照肺癌細胞に比べ増殖遅延を示していた神経細胞接着因子-1 遺伝子導入肺癌細胞は、対照肺癌細胞に比べ有意に高い転移性肺腫瘍形成能を示すことを明らかにした。このことから、悪性神経内分泌細胞特異的分化形質が高い転移能に密接に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The author defined that neuroendocrine cell-specific basic helix-loop-helix transcription factor, NeuroD, is directly involved in the expression of neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) and that metastatic tumor-forming ability of lung cancer cells is accelerated by NCAM1 expression. These findings suggest that neuroendocrine cancer-specific differentiating phenotype is closely associated with its revealing high metastatic potential.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：NeuroD, NCAM, プロモーター、神経内分泌悪性腫瘍、肺癌

1. 研究開始当初の背景

種々の臓器から発生する神経内分泌悪性腫瘍には早期から浸潤・転移を起こす共通した現象が認められる。肺から発生する神経内分泌悪性腫瘍には、定型カルチノイド腫瘍、異型カルチノイド腫瘍、小細胞癌、大細胞癌

経内分泌癌が知られているが、低-中悪性度腫瘍に分類されるカルチノイド腫瘍においても、浸潤・転移は頻繁に認められる現象であり、この事実は、悪性神経内分泌細胞特異的な何らかの分化形質が高い浸潤・転移能に関与していることを示唆している。

申請者は、肺癌発生における driver mutation である K-ras 遺伝子異常に着目し、肺上皮細胞における K-ras 遺伝子の機能獲得変異に伴う遺伝子発現変化を網羅的に解析してきている。その結果、インスリン様増殖因子結合蛋白 (Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2、-4) が有意に発現亢進することを突き止めた。これらの結果は K-ras 遺伝子異常の頻度が高い肺腺癌の病理組織を用いた in vivo 検討により、実際の肺腺癌組織における肺腺癌細胞にも確認されたが、その後の検討により、肺小細胞癌細胞には肺腺癌細胞を凌駕するレベルの IGFBP-2 の発現が見られることが判明し、その過剰発現が神経内分泌細胞特異的転写因子である NeuroD なる basic helix-loop-helix 型転写因子により引き起こされていることが明らかになった。IGFBP-2 蛋白は degradation されることにより細胞接着因子として機能しうることが示されており、また IGFBP-2 や N-cadherin が神経膠芽腫の高い浸潤性や癌腫の脳転移に関与しているという文献的報告もあることから、神経内分泌悪性腫瘍の分化形質にリンクした細胞接着因子が神経内分泌悪性腫瘍の高い浸潤・転移性に関わっていることが推察される。

2. 研究の目的

細胞接着因子は、癌の浸潤・転移に深く関与しているとされている。肺小細胞癌をはじめとする神経内分泌系悪性腫瘍には早期から浸潤・転移を起こす共通点があり、上記のような申請者のこれまでの研究から、神経内分泌細胞に特異的に発現されている basic helix-helix (bHLH) 型転写因子が複数の細胞接着因子を発現制御している可能性が示唆された。そこで本研究では、予後不良な神経内分泌系悪性腫瘍に対する効果的な浸潤・転移制御法に発展させていくための知見を得ることを目的に、細胞接着因子発現における神経内分泌細胞特異的な発現制御メカニズム、および特異な細胞接着因子発現が担癌宿主に及ぼす影響について解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 神経内分泌特異的 bHLH 型転写因子により発現制御される細胞接着因子の同定：

申請者は、NeuroD、Achaete-scute homolog like 1 (ASCL1) を神経内分泌特異的 bHLH 型転写因子として検索対象とした。なぜなら NeuroD はカルチノイド腫瘍、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌に共通して発現されている神経内分泌特異的 bHLH 型転写因子であり、ASCL1 は高悪性度神経内分泌癌 (小細胞癌、大細胞神経内分泌癌) において過剰発現の見ら

れる神経内分泌特異的 bHLH 転写因子であるからである。NeuroD あるいは ASCL1 により発現制御される細胞接着因子を、NeuroD あるいは ASCL1 遺伝子導入肺癌細胞を用いた GeneChip 法により網羅的に抽出し、神経内分泌特異的 bHLH 型転写因子がどのように候補遺伝子を発現亢進させているのかについて、分子生物学的に解析した。

(2) 肺神経内分泌腫瘍において NeuroD により発現制御される細胞接着因子の発現状態についての検討：

上記により明らかになった細胞接着因子の in vivo における発現状態について、カルチノイド腫瘍、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌組織を用いて免疫組織化学的に解析した。(3) NeuroD により発現制御される細胞接着因子が浸潤・転移能に及ぼす影響についての検討：

上記により明らかになった細胞接着因子の発現が癌細胞の浸潤・転移に及ぼす影響を及ぼすかについて、細胞接着因子遺伝子導入癌細胞をマウスに接種することにより解析した。

4. 研究成果

NeuroD あるいは ASCL1 を種々の非神経内分泌肺癌培養細胞にウイルスベクターを用いて遺伝子導入したところ、特に NeuroD 導入細胞において強い増殖抑制が惹起され、安定発現株の樹立は極めて困難であった。そこで Doxycycline により導入遺伝子発現の ON/OFF が可能な Tet-On system を利用した遺伝子導入法に変更して、遺伝子導入株の作成を行うことにより、NeuroD あるいは ASCL1 遺伝子の導入された細胞株を得ることができた。これらを用いて GeneChip 解析を行ったところ、これまでに判明していた IGFBP-2 とともに、細胞接着因子である Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1, 別名 CD56) の遺伝子発現が NeuroD により誘導されることが判明した。その一方で、ASCL1 による細胞接着因子の誘導は明らかではなく、新たな知見として Synaptophysin が ASCL1 により誘導されることが明らかになった。NCAM1 が細胞増殖に及ぼす影響を及ぼすかについて更に検討を行ったところ、NCAM1 遺伝子導入肺癌細胞は IGFBP-2 遺伝子導入肺癌細胞と同様に、著しい増殖遅延を示すことが明らかになった。

外科的に切除されたカルチノイド腫瘍、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌組織を用い、これらの腫瘍における NCAM1, IGFBP-2 の発現について免疫組織化学的に解析したところ、検索した全ての腫瘍において NeuroD, NCAM1 および IGFBP-2 の発現が確認された。一方 ASCL1 の発現は検索した全ての小細胞癌、大細胞神経内分泌癌において見られており、ま

たカルチノイド腫瘍の約半数にもその発現が認められた。以上より、NeuroD の発現はいかなる悪性度の神経内分泌悪性腫瘍にも発現している分子であり、それと呼応するように NCAM1、IGFBP-2 も発現していることが判明した。

上記の結果を踏まえ、Doxycycline 存在下に NCAM1 あるいは IGFBP-2 を誘導発現できるマウス肺癌細胞株を樹立した。NCAM1 および IGFBP-2 の誘導発現については、Western 法により確認した。これを Doxycycline を持続飲水させたヌードマウスの皮下、あるいは経尾静脈的に接種することにより皮下腫瘍、肺腫瘍を形成させ、一定期間(4 週および 8 週)後にマウスを屠殺し解剖することにより、形成された腫瘍の病理組織学的解析を行った。その結果、経尾静脈接種された癌細胞の肺への転移性腫瘍形成能は、空ベクターを導入したマウス肺癌細胞に比べ、in vitro において増殖遅延の見られていた NCAM1 あるいは IGFBP-2 発現マウス肺癌細胞の方が有意に高いことが明らかになった。ただし、8 週間までの観察では、肺以外の臓器への遠隔転移やリンパ節転移の所見を得ることはできなかった。

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 6 件)

1. Sakaeda M, Sato H, Ishii J, Miyata C, Kamma H, Shishido-Hara Y, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Tanaka R, Kondo H, Goya T, Aoki I, Yazawa T. Neural lineage-specific homeoprotein BRN2 is directly involved in TTF1 expression in small-cell lung cancer. *Lab Inv* 93: 408-421, 2013. (査読有)
2. Ishii J, Sato H, Sakaeda M, Shishido-Hara Y, Hiramatsu C, Kamma H, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Aoki I, Yazawa T. 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. (査読有)

3. 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)
4. Sato H, Sakaeda M, Ishii J, Kashiwagi K, Shimoyamada H, Okudela K, Tajiri N, 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, Saito I, Goto T, Kurahashi K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Cell Biol* 45: 489-497, 2010. (査読有)
6. 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- α expression in lung cancer cells. *Am J Pathol* 177: 70-83, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 佐藤華子、柴田昌史、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 年 4 月 28 日。京王プラザホテル。東京。
2. 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 年 4 月 28 日。京王プラザホテル。東京。
 3. 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、北村均、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 年 4 月 28 日。パシフィコ横浜。横浜。
 4. 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 年 4 月 27 日。京王プラザホテル。東京。
 5. 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 年 4 月 27 日。京王プラザホテル。東京。
 6. 榮田昌史、佐藤華子、石井 順、宮田千恵、菅間 博、宍戸-原由紀子、下山田博明、藤原正親、遠藤哲哉、青木一郎、矢澤卓也。肺小細胞癌における TTF-1 発現は POU ドメイン転写因子 BRN2 により直接的に制御されている。第 102 回日本病理学会総会。2013 年 6 月 7 日。ロイトン札幌。札幌。

7. 石井 順、佐藤華子、榮田昌史、宍戸-原由紀子、平松千恵、菅間 博、下山田博明、藤原正親、遠藤哲哉、青木一郎、矢澤卓也。POU 型転写因子 BRN2 は肺小細胞癌細胞の神経／神経内分泌形質発現および増殖活性に関与する。第 102 回日本病理学会総会。2013 年 6 月 7 日。ロイトン札幌。札幌。

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし