

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590428

研究課題名(和文) 神経内分泌肺癌における神経内分泌分化形質獲得メカニズムの全容解明と治療への応用

研究課題名(英文) Molecular pathological analyses of proneural/neuroendocrine phenotype-obtaining mechanisms on lung cancer cells

研究代表者

矢澤 卓也 (Yazawa, Takuya)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50251054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺に発生する悪性腫瘍の1/3は幼若神経系/神経内分泌系形質を有しており、そのような腫瘍は予後不良である。しかし肺癌細胞における幼若神経系/神経内分泌系形質の発現機序は不明である。そこで我々は、肺癌細胞における幼若神経系/神経内分泌系形質獲得メカニズムについて、分子病理学的に解析を行った。その結果、高悪性度肺神経内分泌腫瘍である小細胞癌では特異的にLHX2, LHX6, および7種のIII/IV型POU転写因子を発現していることが判明し、それらのうちPOU3F4およびPOU4F2が大細胞癌株に対し強い幼若神経系/神経内分泌系形質転換能を有していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：One-third of lung malignancies demonstrate a proneural/neuroendocrine phenotype, and lung cancers having a proneural/neuroendocrine phenotype reveal poor prognosis. However, it has not been elucidated how a proneural/neuroendocrine differentiation is controlled in lung cancers. Therefore, we conducted molecular pathological analyses of proneural/neuroendocrine phenotype-obtaining mechanisms on lung cancer cells, focusing upon homeobox gene expression. Small cell lung cancer cells specifically expressed LHX2, LHX6, and class III/IV POU transcription factors. Among them, class III/IV POU transcription factors could induce proneural and neuroendocrine marker genes, and especially, POU3F4 and POU4F2 could effectively be transformed large cell carcinoma cells into neuroendocrine cancer cells. These findings suggested that POU3F4 and POU4F2 play crucial roles on obtaining proneural-neuroendocrine phenotype in lung cancers.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺癌 神経内分泌癌 小細胞肺癌 大細胞神経内分泌癌 カルチノイド腫瘍 分化形質 転写因子 POU

1. 研究開始当初の背景

NeuroD、ASCL1などの神経/神経内分泌細胞特異的 bHLH 型転写因子は、神経内分泌細胞の分化決定因子、分化誘導因子として知られているが、神経内分泌腫瘍におけるその詳細な機能や下流因子については未だ不明な点が多岐にわたっており、研究代表者らのグループを含め数施設においてその機能解析が行われているに過ぎない(参考文献(1)-(3))。

これまで研究代表者らは、小細胞癌をはじめとする肺神経内分泌癌における神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子と生物学的特性の関連性について検討を重ね、神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子が class II transactivator (CIITA) 遺伝子、インスリン様増殖因子結合蛋白-2 (IGFBP-2) 遺伝子、neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1) 遺伝子、synaptophysin 遺伝子のプロモーター内に存在する E-box に結合することにより、CIITA 発現を抑制、あるいは逆に IGFBP-2、NCAM1、synaptophysin 発現を亢進させる現象を明らかにしてきた(参考文献(1),(2))。また肺神経内分泌癌においては RE1 塩基配列に結合する転写抑制因子 REST の発現を欠如していること、synaptophysin 遺伝子や chromogranin A 遺伝子が REST の制御下にあること、肺非神経内分泌癌細胞に発現している REST をノックダウンすることにより小細胞癌に発現しているほどの大量の synaptophysin を発現誘導できることを明らかにした。しかし、神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子あるいは REST を遺伝子操作しても、神経内分泌癌における発現量相当の NCAM1、chromogranin A を非神経内分泌肺癌細胞に誘導することは困難であった。

細胞の分化形質を人為的に変化させる手法として、induced pluripotent stem (iPS) cells の作成法があり(参考文献(4))、iPS の作成および利用により再生医療分野は近年めざましい進歩を遂げている。iPS の作成は Yamanaka らの報告にあるように、bHLH 型転写因子とホメオボックス遺伝子を共発現させることにより可能となった。他にも細胞の分化形質変化には bHLH 型転写因子とホメオボックス遺伝子の協調作用が重要であるとの報告があり(参考文献(5))、極く最近になり、ホメオボックス遺伝子である FOXO3 が膠芽腫幹細胞を神経膠腫細胞に分化させることが報告された(参考文献(6))。また現在研究代表者らは、肺神経内分泌癌において特異的に高発現(参考文献(7))している Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) の発現メカニ

ズムについて検索を進めており、ホメオドメインを有し脳、甲状腺、肺の発生に重要な役割を担っているとされる TTF-1 の発現にホメオボックス遺伝子である FOXA2 が重要であることを明らかにしている。このような知見は、bHLH 遺伝子や REST 遺伝子を単独操作しても非神経内分泌肺癌細胞を神経内分泌細胞に形質転換させるには不十分であり、また上記の NCAM1 や chromogranin A 遺伝子プロモーターにも複数のホメオボックス遺伝子産物結合部位が存在することを考慮すると、神経内分泌肺癌に匹敵する充分な量の神経内分泌細胞特異的分子を非神経内分泌肺癌細胞に発現誘導するためには、肺神経内分泌細胞が有する特異的なホメオボックス遺伝子セットの発現が必要であることが示唆された。

[参考文献]

- (1) Yazawa T, Kamma H *et al.* Lack of class II transactivator causes severe deficiency of HLA-DR expression in small cell lung cancer. *J Pathol* 187: 191-199, 1999.
- (2) Yazawa T, Kamma H *et al.* Complicated mechanisms of class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma. *Am J Pathol* 161: 291-300, 2002.
- (3) Osada H, *et al.* Roles for achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Cancer Res* 68: 1647-1655, 2008.
- (4) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
- (5) Westerman BA *et al.* Pax-Hox-Helix connection. *Biochimica Biophysica Acta* 1629: 1-7, 2003.
- (6) Sunayama J *et al.* FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells* 29: 1327-1337, 2011.
- (7) Strum N *et al.* Expression of thyroid transcription factor-1 in the spectrum of neuroendocrine cell lung proliferations with special interest in carcinoids. *Hum Pathol* 33:175-182, 2002.

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの研究を更に発

展させ、肺癌における神経内分泌分化形質獲得メカニズムの全容の解明、および得られた知見を基盤とした神経内分泌肺癌に対する新規分化誘導治療法を探索していくことを主たる研究目的とした。具体的には、これまで機能解析を行ってきた神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子 (NeuroD、ASCL1)、REST に加えホメオボックス遺伝子 (HOX 遺伝子群、FOX 遺伝子群、PAX 遺伝子群、LHX 遺伝子群) に着目し、これらの遺伝子を強制発現、あるいは強制発現抑制させることにより、非神経内分泌肺癌細胞から神経内分泌肺癌細胞への形質転換を試み、神経内分泌形質獲得に必要な転写因子セットを明らかにしていくこととした。

3. 研究の方法

(1) 種々の組織型 (小細胞癌、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌) に由来する肺癌培養細胞株を用い、非小細胞癌株に比して小細胞癌において有意に発現の高いホメオボックス遺伝子の同定を realtime PCR により検索した。

(2) 上記の検索により選択されたホメオボックス型転写因子に対する発現ベクターを構築し、それらを非小細胞癌株に導入することによる神経内分泌形質の誘導の有無について、神経内分泌マーカーの発現変動を指標に検索した。

(3) BRN2 (POU3F2) は III 型 POU 遺伝子に分類されるが、III 型および IV 型 POU 遺伝子は幼若な神経細胞に特異的に発現されていることから、他6種の III/IV 型 POU 遺伝子の発現についても分子生物学的検討を行った。

(4) ヒト腫瘍組織における BRN2 (POU3F2) の発現について、小細胞癌組織、大細胞神経内分泌癌組織、定型のカルチノイド腫瘍組織、および非定型のカルチノイド腫瘍組織を用いて免疫組織化学的に検討した。

(5) 7 種の III/IV 型 POU 遺伝子 (POU3F1, POU3F2, POU3F3, POU3F4, POU4F1, POU4F2, POU4F3) に対する発現ベクターを構築し、それらを肺癌培養細胞に遺伝子導入することにより惹起される神経内分泌形質誘導能について、分子生物学的および形態的に検討した。

4. 研究成果

(1) ホメオボックス遺伝子 LHX2、LHX6、FOXA1、FOXA2、BRN2 (POU3F2) が小細胞癌株において高発現していることが明らかになった。

(2) LHX2、LHX6、FOXA1、FOXA2 については遺伝子導入による神経内分泌マーカー (neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1), synaptophysin,

chromogranin A) の変動は確認されなかったが、BRN2 (POU3F2) についてはいずれの神経内分泌マーカーの発現も亢進させることが明らかになった。

(3) 小細胞肺癌株では BRN2 (POU3F2) のみならず、全ての III/IV 型 POU 遺伝子が高発現していることが明らかになった。

(4) 小細胞癌および大細胞神経内分泌癌では高率に BRN2 (POU3F2) の発現が見られた。また中間悪性を示す非定型のカルチノイド腫瘍においても BRN2 (POU3F2) を発現する症例が存在することが明らかになった。

(5) 7 種いずれの III/IV 型 POU 遺伝子も神経内分泌形質を誘導する能力を有していることが明らかになった。III/IV 型 POU 遺伝子導入により、大細胞癌株には神経内分泌マーカー (neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1), synaptophysin, chromogranin A) のみならず、神経内分泌細胞特異的 bHLH 転写因子 (NeuroD、ASCL1) の発現をも誘導されることが明らかになった。また上記 7 種の中では POU3F4 および POU4F2 が最も強力な神経内分泌分化誘導能を有していることも判明した。大細胞癌株に POU3F4 および POU4F2 遺伝子導入を行うことにより、細胞は小型化し、また神経突起様の突起物を形成するような形態変化が惹起された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ishii J, Sato H, Yazawa T, Shishido-Hara Y, Hiramatsu C, Nakatani Y, Kamma H. Class III/IV POU transcription factors expressed in small cell lung cancer cells are involved in proneural/neuroendocrine differentiation. *Pathology International* 64: 415-422, 2014. (査読有) DOI: 10.1111/pin.12198.

Endo T, Yazawa T, Shishido-Hara Y, Fujiwara M, Shimoyamada H, Ishii J, Sato H, Tachibana K, Takei H, Kondo H, Goya T, Endo S, Kamma H. Expression of developing neural transcription factors in lung carcinoid tumors. *Pathology International* 64: 365-374, 2014. (査読有) DOI: 10.1111.pin.12183.

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. Laboratory Investigation 93: 408-421, 2013. (査読有) DOI: 10.1038/labinvest.2013.2.

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 of small cell lung cancer. Pathology International 63: 158-168, 2013. (査読有) DOI: 10.1111/pin.12042.

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. Pathology International 62: 232-245, 2012. (査読有) DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02781.x.

〔学会発表〕(計9件)

矢澤卓也。神経系細胞特異的転写因子の機能解析結果を基盤とした小細胞肺癌の細胞形質解析。第18回日本内分泌病理学会(招待講演)。2014年11月2日。都道府県会館(東京都千代田区)。

石井順、矢澤卓也、佐藤華子、宍戸-原由紀子、平松千恵、下山田博明、藤原正親、菅間博。肺の神経内分泌系悪性腫瘍とIII/IV型POU遺伝子。第103回日本病理学会総会。2014年4月24日。広島国際会議場(広島県広島市)。

矢澤卓也。小細胞肺癌の細胞形質を制御する転写因子の機能解析から見えてくるもの。第59回日本病理学会秋期特別総会(招待講演)。2013年11月22日。富士屋ホテル(山梨県甲府市)。

遠藤哲哉、石井順、榮田昌史、藤原正親、宍戸-原由紀子、下山田博明、平野和彦、寺戸雄一、菅間博、矢澤卓也。肺神経内分泌腫瘍におけるBRN2、ASCL1、TTF1の発現性の検討。第102回日本病理学会総会。2013年6月7日。ロイトン札幌(北海道札幌市)。

榮田昌史、佐藤華子、石井順、菅間博、原由

紀子、平松千恵、下山田博明、藤原正親、遠藤哲哉、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(北海道札幌市)。

石井順、佐藤華子、榮田昌史、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(北海道札幌市)。

矢澤卓也。神経内分泌マーカーの発現機序解析から見えてくるもの。第55回日本病理学会関東支部会学術集会(招待講演)。2012年6月9日。杏林大学医学部(東京都三鷹市)。

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(東京都新宿区)。

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。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(東京都新宿区)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤卓也 (YAZAWA, Takuya)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 50251054

(2) 研究分担者

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

原 由紀子 (HARA, Yukiko)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：40313267

下山田 博明 (SHIMOYAMADA, Hiroaki)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：60381472

藤原 正親 (FUJIWARA, Masachika)
杏林大学・医学部・講師
研究者番号：20407026

菅間 博 (KAMMA, Hiroshi)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：10195191

(3)研究協力者

石井 順 (ISHII, Jun)
榮田昌史 (SAKAEDA, Masashi)