

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460439

研究課題名(和文)混合型小細胞肺癌の発生機構：Notchシグナルからの解明

研究課題名(英文) Mechanisms on genesis of combined type small cell carcinoma; a study focusing on Notch signaling

研究代表者

伊藤 隆明 (Ito, Takaaki)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：70168392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：混合型肺小細胞癌では、小細胞癌像に加え、NOTCH1陽性、INSM1陰性の腺癌や扁平上皮癌など非小細胞癌像を含んでいる。混合型小細胞肺癌形成過程でのNOTCH発現機構として、エピジェネティクスな機序が考えられる。NOTCH1陰性の小細胞癌培養細胞株にtrichostatinA処理によりNOTCH1の発現が出現し、さらに、Chip assayにより、小細胞肺癌のNotch1遺伝子promoter領域ではアセチル化histone H3の結合低下が見られた。以上より、混合型小細胞肺癌形成には、Notch1シグナル経路の活性化が重要で、その制御にはhistone修飾が関与することが想定された。

研究成果の概要(英文)：Combined type of small cell lung carcinoma (SCLC) has both small cell cancer and non-small cell carcinoma components such as adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, which are positive for NOTCH1 and negative for INSM1, one of neuroendocrine transcription factor. Mechanisms of NOTCH1 expression in the process of genesis of the combined type SCLC could be epigenetically regulated. NOTCH1-negative classical SCLC cell lines expressed NOTCH1 after trichostatin A treatment, and Chip assay showed that level of acetylated histone H3 surrounding Notch1 promoter region was low in them. Taken together, genesis of combined type SCLC requires NOTCH expression, which could be regulated by histone modification.

研究分野：病理学

キーワード：小細胞肺癌 混合型 Notchシグナル エピジェネティクス DNAメチル化 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

混合型小細胞肺癌は、非小細胞癌成分を有した小細胞癌で、非小細胞肺癌成分は、大細胞癌、腺癌、扁平上皮癌などを含んでいる。混合型小細胞癌の発生については、腫瘍の発育が進むにつれ増加する、あるいは、化学療法などにより出現するなど考えられているが(Gosney, 1992)、stageI期の未化学療法・手術例でも混合型小細胞癌が存在することは、腫瘍の早期の段階から、このようなヘテロな組織像が形成されていることが想像される。

ヘテロな細胞構成を作り出す機構の一つに Notch シグナル経路がある(Artavanis-Tsakonas, et al., 1999)。私達は、肺の上皮細胞あるいは肺癌細胞の分化決定機構として、Notch1-Hes1-HASH1経路が重要な働きをしていることを示してきたが(Ito et al., 2003)、一般的には、小細胞癌では Notch1 の発現は弱く、神経の分化制御因子である ASCL1 が活性化し、一方で、非小細胞癌では NOTCH1 が発現し、ASCL1 の発現は認められない(Ito, et al, 2003)。また、H69 など神経内分泌分化が保持された古典的なヒト小細胞肺癌培養細胞株は NOTCH1 発現陰性で、接着分子の発現が弱く、一方で、H69 細胞由来の多剤耐性培養細胞株 H69AR は、NOTCH1 の発現が見られ、培養皿への接着能を示す。

腫瘍における蛋白質の発現機構については、遺伝子の転写・翻訳(ジェネティックな機構)が関わるとともに、遺伝子の転写・翻訳にはエピジェネティックな機構が関与している。肺癌の Notch1 の腫瘍におけるエピジェネティックな機構による発現制御異常についての研究はほとんどな報告されていない。一部の小細胞肺癌では、Notch 遺伝子の変異の報告がある(George et al., 2015)。古典的な小細胞肺癌細胞株に Notch1 遺伝子を導入し、免疫不全マウス

に同細胞を移植すると管腔形成を伴う腫瘍が発育することから(Wael et al., 2104)、混合型小細胞癌の形成機構としては小細胞癌内での Notch シグナルの活性化が意義あることと想像される。また、同一の腫瘍内で Notch1 発現が出現する機構としては、Notch1 遺伝子の異常、Notch1 蛋白質の分解不全、エピジェネティクス機構、microRNA による制御などが想定されるが、NOTCH1 蛋白質および RNA の発現のない H69 細胞からの NOTCH1 発現陽性・薬剤耐性細胞の出現(H69AR)や同一腫瘍内での2種類の組織型の共存は、そのヘテロな組織像の形成に、Notch1 遺伝子発現へのエピジェネティクス機構の関与が仮説として考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、発生や細胞の分化制御に重要な Notch シグナル経路が、混合型小細胞肺癌の形成を担っていること、同シグナルが生物学的な特性に影響しうること、また、Notch シグナル経路活性化の機序としてエピジェネティックな機構が関与している可能性などを検証するために、(1)小細胞癌手術症例の免疫組織学的な検索、(2)ヒト肺癌培養細胞株を用いた NOTCH1,2,3 の発現解析、(3)Notch シグナルに制御される神経内分泌分化促進性転写因子の探索、(4)ヒト肺小細胞癌株における Notch 遺伝子のメチル化の有無、(5)ヒト肺癌培養細胞株を用いた Notch1 遺伝子発現へのヒストン修飾の有無、(6)HDAC 阻害剤処理による小細胞肺癌培養細胞の増殖能、神経内分泌分化、epithelial mesenchymal transition (EMT)等の細胞生物学的な変化が起こるか否かの検討、(7)HDAC 阻害剤処理ヒト肺小細胞癌株の免疫不全マウスへの皮下移植実験による組織像変化の検討、などを行った。

3. 研究の方法

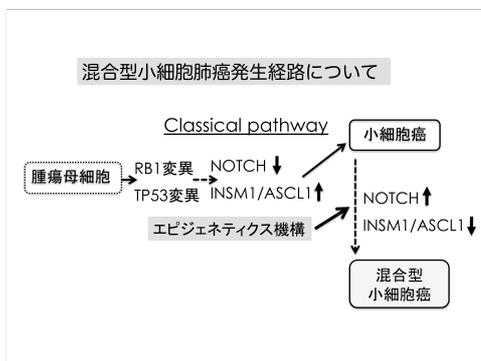
(1) ヒト肺癌手術例ホルマリン固定パラフィン切片(小細胞癌 19 例(混合型 8 例)、腺癌 86 例、扁平上皮癌 47 例)を用いて、NOTCH1 および各種神経内分泌分化マーカー、神経内分泌分化制御転写因子 INSM1 の免疫染色を行った。(2) ヒト肺癌培養細胞株(小細胞癌 7 株、非小細胞癌 6 株)を用いて、NOTCH1-3、ASCL1、INSM1 の Western blotting による発現解析を行った。(3) 神経内分泌分化制御転写因子 INSM1 が、Notch シグナルに制御されるかどうか、ヒト肺癌培養細胞株を用いて、Notch1 遺伝子導入実験、Notch1 および Hes1 遺伝子ノックダウン実験を行った。(4) ヒト肺小細胞癌株における Notch 遺伝子のメチル化の有無を見るために、NOTCH1 非発現小細胞癌株(H69、H1688)を用いて、5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 0.3-10mM 加え、1-4 日間培養後、蛋白質及び RNA を抽出し、Notch 関連分子の発現を検討した。(5) Notch1 遺伝子発現へのヒストン修飾の可能性を検討するために、小細胞癌培養細胞(H69、H1688)に、HDAC 阻害剤 Trichostatin A (TSA) 100-1000nM 加え、1-2 日間培養後、蛋白質及び RNA を抽出し、Notch 関連分子の発現を検討した。また、Chip assay を試み、Notch1 遺伝子 promoter 領域でのアセチル化 histone H3 の結合性を各種肺癌細胞株で検討した。(6) HDAC 阻害剤処理(TSA)により NOTCH1 が出現したが、これら細胞の増殖能、神経内分泌分化、EMT 等の変化について、Western blotting および免疫染色で検討した。(7) HDAC 阻害剤処理ヒト肺小細胞癌株の組織像を検討するために、高度免疫不全マウス(Rag2(-)Jak3(-)マウス)皮下に、これら細胞と無処置細胞とを皮下投与し、投与 1 ヶ月後に、形成された腫瘍のホルマリン固定・パラフィン切片を作成し、組織像を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト肺癌手術例ホルマリン固定パラフィン切片の免疫染色の結果：基本的に小細胞癌の純粋型は NOTCH1、NOTCH3 陰性、INSM1 及び神経内分泌マーカー陽性で、腺癌及び扁平上皮癌は NOTCH1 および NOTCH3 陽性、INSM1 及び神経内分泌マーカー陰性だった。混合型小細胞肺癌の、非小細胞癌成分は、NOTCH1 および NOTCH3 陽性、INSM1 及び神経内分泌マーカー陰性で、混合型小細胞癌の形成には、Notch シグナルが関与する可能性が示唆された。(2) ヒト肺癌培養細胞株発現解析：NOTCH1,3 発現陽性細胞株は、神経内分泌分化制御転写因子 INSM1 や神経内分泌マーカー陰性、NOTCH1,3 陰性の古典的な小細胞癌株は神経内分泌分化制御転写因子 INSM1 や神経内分泌マーカー陽性で、相互排他的な関係にあった。NOTCH1 陽性の variant 型の小細胞癌株は、混合型肺小細胞癌に近い形質を有していると思われる。(3) 神経内分泌分化制御転写因子 INSM1 の制御機構について：古典的な小細胞肺癌株への Notch1、Hes1 遺伝子導入により、INSM1 の発現及び神経内分泌マーカーの発現は減少し、一方、NOTCH1 の発現する variant 型の小細胞癌の Notch1、Hes1 遺伝子ノックダウン実験により、INSM1 および神経内分泌マーカーの発現が誘導できた。以上より、INSM1 発現は、Notch1-Hes1 シグナル経路により制御されていると考えられた。(4) 5-aza-dC 投与実験：NOTCH1 陰性小細胞癌培養株では、5-aza-dC 処理により、NOTCH1 蛋白質、Notch1 mRNA の発現は誘導されなかったことから、小細胞肺癌の Notch1 発現低下は、DNA メチル化によらないと考えられた。(5) HDAC 阻害剤 TSA 投与実験：TSA 処理により、NOTCH1 蛋白質、Notch1 mRNA の発現は誘導され、またアセチル化 histone H3、H4 が誘導された。以上より、小細胞肺癌における Notch1 の発現制

御はヒストン修飾によると考えられた。一方、NOTCH3 の発現誘導は起こらなかった。Chip assay からは、Notch1 遺伝子 promoter 領域でのアセチル化 histone H3 の結合性は非小細胞肺癌株で高く、NOTCH1 発現小細胞肺癌株で軽度認められるも、古典的な小細胞肺癌株では、低値を示した。(6) HDAC 阻害剤 TSA 処理による細胞生物学的な効果：NOTCH1 の発現誘導とともに、リン酸化 histone H3 の低下とともに細胞増殖能の低下、cleaved caspase3 の増加とともにアポトーシス亢進、神経内分泌分化の低下、E-cadherin 発現増加、vimentin, slug, snail 低下など、小細胞癌細胞の上皮化などを認めた。Notch1 遺伝子の単独遺伝子導入と同様な変化であり (Wael et al. 2014; Hassan et al. 2014) HDAC 阻害剤による効果ではあるが、誘導された NOTCH1 の作用の関与があると考えられた。(7) HDAC 阻害剤 TSA 処理ヒト肺小細胞癌株 H1688 の移植実験：皮下腫瘍の組織像では、通常な小細胞癌像とともに多数の管腔形成を認め、こられは Alcian blue 陽性所見を認め、真の管腔の形成が誘導され、実験的な混合型小細胞肺癌が作成されたと思われた。

以上、混合型小細胞肺癌の形成には Notch シグナル経路が重要で、その発現制御としてエピジェネティクスな機構が関与していると考えられた(下図)。



引用文献

Gosney JR: Pulmonary endocrine pathology. Butterworth-Heinemann,

Oxford, pp1-184, 1992.

Artavanis-Tsakonas S, et al.: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284: 770-776, 1999.

Ito T, et al.: Mechanisms of neuroendocrine differentiation in pulmonary neuroendocrine cells and small cell carcinoma. Endocr Pathol 14: 133-139, 2003.

George J, et al.: Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. Nature 524:47-63, 2015.

Wael HA, et al.: Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. Lung Cancer, 85:131-140, 2014.

Hassan, WA, et al.: Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. Lung Cancer, 86:304-310, 2014.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、共同研究者に下線)

[雑誌論文](計9件)

Hassan W, Yoshida R, Kudoh S, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T: Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. Lung Cancer, 85:131-140, 2014. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.05.001.

Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T: Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. Lung Cancer, 86:304-310, 2014. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.10.007.

Suzuki M, Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, Mori T, Yoshimoto K, Shibata H, Ito T, Baba Y, Baba H: Aberrant methylation and

silencing of IRF8 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*,8:1025-1030, 2014

Hassan WA, Udaka N, Ueda A, Ando Y, Ito T: Neoplastic lesions in CADASIL syndrome: report of an autopsied Japanese case. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 7533-7539, 2015. eCollection 2015.

Tenjin Y, Uramoto H, Kobayashi H, Matsumoto M, Ito T, Kohroggi H: Combined large cell neuroendocrine carcinoma with both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Jpn J Lung Cancer* 55: 89-92, 2015

Fujino K, Motooka Y, Hassan WA, Abdalla MOA, Sato Y, Kudoh S, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Kobayashi H, Kubota I, Wakimoto J, Suzuki M, Ito T: INSM1 is a crucial regulator of neuroendocrine differentiation in lung cancer. *Am J Pathol*, 185: 3164-3177, 2015. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.08.018.

Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Kameyama H, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T: Notch1 controls cell chemo-resistance in small cell lung carcinoma cells. *Thoracic Cancer*, 7: 123-128, 2016. doi: 10.1111/1759-7714.12297.

Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Motooka Y, Ito T: Evaluation of role of Notch3 signaling pathway in human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142(5), 981-993, 2016. doi:10.1007/s00432-016-2117-4.

Ito T, Hassan WA, Matsuo A: Notch signaling and Tp53/RB1 pathway in pulmonary neuroendocrine tumorigenesis. *Transl Cancer Res*, 5: 213-219, 2016. doi: 10.21037/tcr.2016.03.11

〔学会発表〕(計3件)

藤野孝介、工藤信次、新森加納子、長谷川功紀、伊藤隆明: 肺癌細胞における zinc-finger 転写因子 INSM1 の意味。第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015.05.01-02.

伊藤隆明、本岡大和、藤本孝介、工藤信次、佐藤陽之輔: 混合型小細胞肺癌における Notch1 の発現意義と機構について。第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016.05.12-14.

本岡大和、藤本孝介、工藤信次、佐藤陽之輔、伊藤隆明: 肺癌における Notch2 発現の意義について。第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016.05.12-14.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆明 (ITO, Takaaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 70168392

(2) 研究分担者

新森 加納子 (NIIMORI, Kanako)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 30457600

長谷川 功紀 (HASEGAWA, Koki)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50525798

(3) 連携研究者

該当者なし