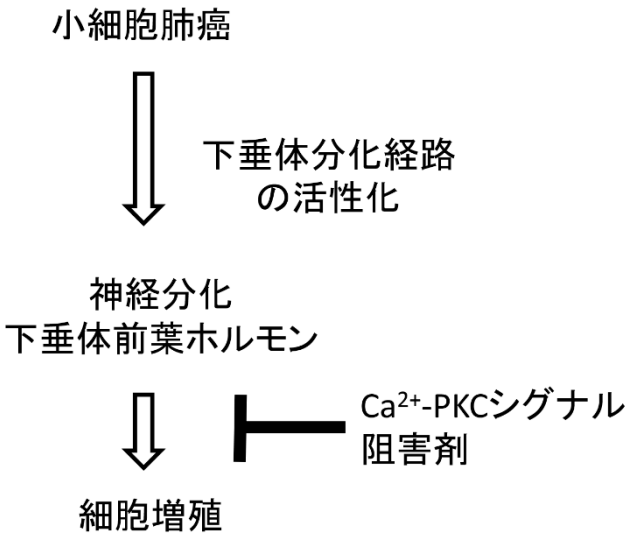
153　小細胞肺癌の脱分化誘導と治療感受性の解析	末永　雄介

【目的】小細胞肺癌は肺癌の中で最も悪性であり、化学療法や放射線療法といった古典的な治療法以外に有効な治療法はない。5 年生存率は約 20%であり、新たな治療法の開発が必要である。我々は、小細胞肺癌の一群が下垂体前葉の発生初期を制御する転写因子を高発現し、90%以上の 5 年生存率を示すことを発見した。本研究では、この独自の知見をもとに小細胞肺癌の分化や脱分化を誘導することで、治療感受性を増強できるかを調べた。

【方法】口腔外胚葉の発現パターンを示す小細胞肺癌株 SBC3、SBC5 を用いて、脱脂 FCS を含む培地で培養し、脱分化を誘導した。神経分化誘導には低接着プレートを用いた 3 次元培養を行った。神経分化誘導後の小細胞肺癌株を用いた化合物スクリーニングでは分子プロファイリング支援活動の支援を受けて入手した標準阻害剤キット 1〜4（kit1 ver3.2、kit2 ver2.3、kit3 ver1.6、kit4 ver2.3）とシグマ社より購入したエピジェネティクス関連化合物ライブラリー（80 種）の計 445 化合物を用いた。

【結果】SBC3 および SBC5 細胞では 3 次元培養により、下垂体分化経路の活性化が起こり、神経分化が誘導されることが明らかになった。また、神経分化後の SBC3 細胞では Ca^{2+}-PKC シグナル、CAMKⅡ、Ca ionophore などの阻害剤が選ばれ、神経分化に伴い、神経のシナプスやスパイン形成に重要な因子の阻害剤が細胞増殖を抑制することが示唆された。

Ca^{2+}-PKC シグナル阻害剤は神経分化誘導した小細胞肺癌の細胞増殖を抑制する



153. 小細胞肺癌の脱分化誘導と治療感受性の解析

末永　雄介

千葉県がんセンター研究所 がんゲノムセンター

Key words：小細胞肺癌，神経内分泌性格，下垂体分化，3 次元培養，化合物スクリーニング

緒　言

小細胞肺癌は肺癌の中で最も悪性であり、化学療法や放射線療法といった古典的な治療法以外に有効な治療法はない。5 年生存率は約 20%であり、新たな治療法の開発が必要である。小細胞肺癌の顕著な特徴として、神経内分泌マーカーを発現し、その一部は下垂体前葉ホルモンを産生することが知られている。しかし、肺から発生する癌が、なぜこのような特徴を示すのかは明らかにされていない。我々は肺腺癌 346 検体と小細胞肺癌 71 検体の全エクソームデータを解析し、小細胞肺癌では下垂体前葉の発生を制御する転写因子（ここでは NE-TF1、NE-TF2 と呼ぶ）の下流遺伝子に体細胞突然変異が有意に蓄積することを見出した。さらに、NE-TF1、NE-TF2 は小細胞肺癌で高発現し、下流遺伝子には転写が引きこす変異の特徴（A から G への変異が転写の鋳型鎖に比較し非鋳型鎖で多いという現象［1］）が検出された。これらの結果から、小細胞肺癌が発癌過程で NE-TF1、NE-TF2 が転写活性化し、下垂体分化経路を利用している可能性が示唆された。この考えと矛盾しないことに、下垂体発生の後期に働く転写因子である NEUROD1 と ASCL1 は小細胞肺癌の神経分化を制御し、細胞生存に重要であることが示されている［2，3］。患者の生存率と下垂体発生を制御する転写因子との関係を調べたところ、口腔外胚葉の発現パターン（OTX2、NE-TF1、NE-TF2 mRNA 高発現）を示す検体で 5 年生存率が 90%以上だった。口腔外胚葉は下垂体前葉の原基であるラトケ嚢が発生する組織である（図 1）。これらから、下垂体経路に沿って小細胞肺癌を分化または脱分化させることができれば、下垂体分化を阻害する化合物が同定でき、小細胞肺癌の有効な治療薬になるのではないかと着想した。そこで、本研究では小細胞肺癌細胞株の脱分化、分化法を開発し、化合物スクリーニングにより小細胞肺癌の薬剤候補を同定することを目的とした。

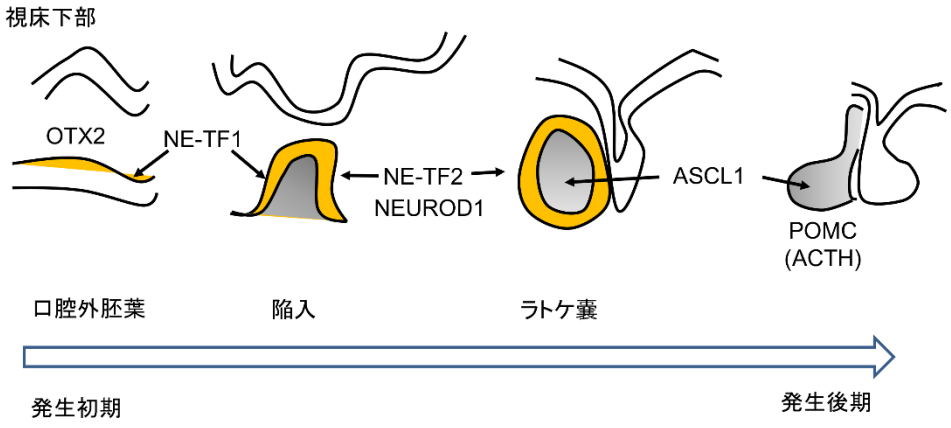


図 1. 下垂体前葉の発生を制御する転写因子とその発現時期

方法および結果

1. 小細胞肺癌株の脱分化誘導

小細胞肺癌細胞を脱脂した牛胎児血清（以下、FCS）を含む培地で培養することで、神経分化が抑制されるとの報告があったことから［4］、小細胞肺癌株 SBC3、SBC5 を同様に培養したところ、細胞形態が変化し、下垂体転写因子（HESX1）の発現が低下、口腔外胚葉のマーカー（PAX6、SIX3、OTX2）が上昇した（図 2）。しかし細胞増殖は停止し、薬剤感受性試験に必要な細胞数を得ることはできなかった。

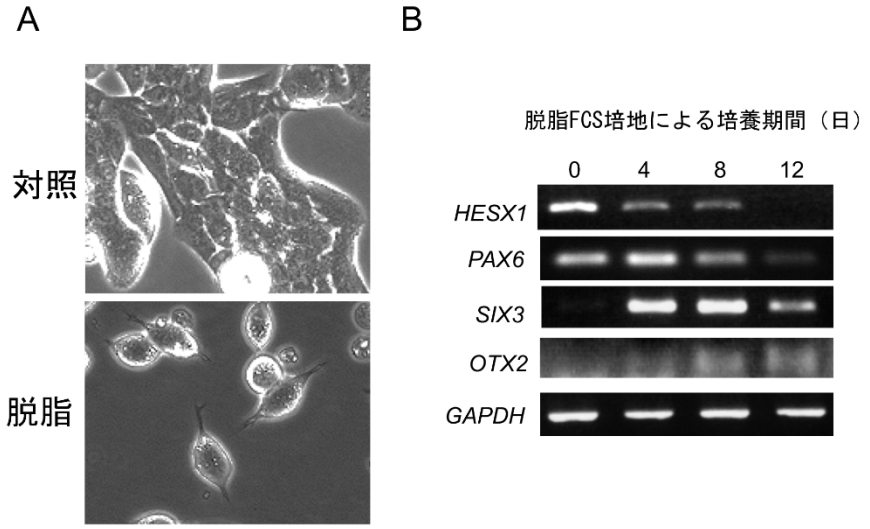


図 2. 小細胞肺癌の脱分化誘導

A) 脱脂 FCS を用いた培地で見られる SBC3 の細胞形態の変化

B) RT-PCR。下垂体マーカー発現（HESX1）が減少し、より発生初期の転写因子（PAX6、SIX3、OTX2）が誘導された。

2. 小細胞肺癌株の神経分化誘導

肺癌が神経内分泌細胞様に分化する機構として、神経分化に関与する転写因子 ASCL1 と NEUROD1 が小細胞肺癌において発現上昇し、細胞生存を維持することが報告されている［2, 3］。これら転写因子は下垂体発生において NE-TF1 と NE-TF2 の下流に位置し、より分化した細胞で発現する。我々は小細胞肺癌 16 細胞株においてこれら 4 つの転写因子の発現量を調べ、二つの小細胞肺癌株（SBC3、SBC5）では 2 次元培養において ASCL1、NEUROD1、POMC が全く発現せず、下垂体初期の転写因子（OTX2、NE-TF1、NE-TF2）を高発現することを見出した（図 3）。しかし、低接着プレートを用いた 3 次元培養では、これら細胞株でも ASCL1、NEUROD1、POMC の発現が誘導され（図 4）、多くの小胞が形成された（図 4B）。この小胞は胚性幹細胞から *in vitro* で下垂体を分化させるときに観察されるラトケ嚢様小胞［5］に類似していた。

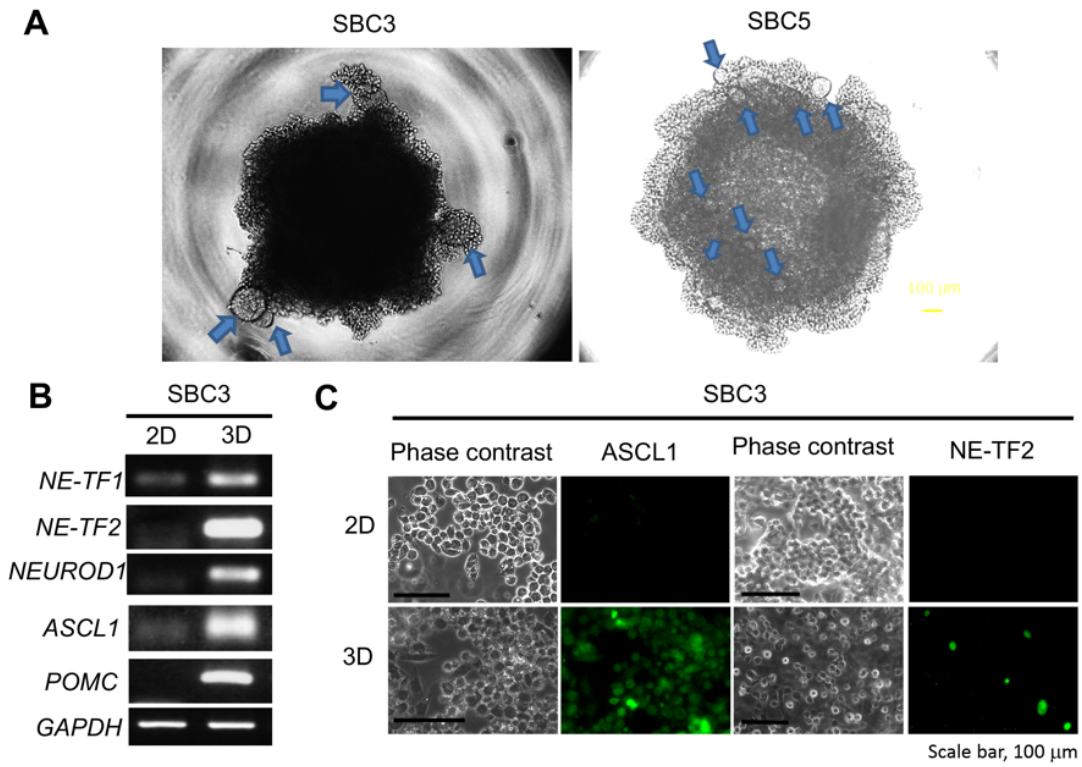


図 3.　三次元培養による小細胞肺癌細胞の小胞形成と下垂体分化

A)　低接着プレートで 3 次元培養後 7 日、多数の小胞を認める（矢印）

B)　RT-PCR。転写因子と POMC 発現は 3 次元培養（3D）で上昇する。

C)　疫染色。ASCL1 と NE-TF2 は 3 次元培養により誘導される。

3.　神経分化誘導後の小細胞肺癌株を用いた化合物スクリーニング

SBC3 および SBC5 細胞を 2 か月間の 3 次元培養し、再び 2 次元で接着培養すると、全ての細胞が分泌顆粒を持ち、その後も安定的に POMC 発現量が高く維持され、分化状態が保持された。この 3 次元培養（3D）を 2 か月（2Mo）行い、下垂体分化経路を活性化した細胞株を 2Mo3D と名付け、親株（SBC3 と SBC5）と比較し 2Mo3D で殺細胞効果が高い化合物を探索した。下垂体分化経路を活性化した細胞（2Mo3D）において細胞死を誘導する化合物を探索するため、2Mo3D 及び親株の細胞懸濁液を 1,000 細胞／well で 100 μl ずつ 96 well plate に播種し、翌日、5 μM で化合物を処理、6 日後、各 well に 10 μl の検出試薬を加え、37℃の CO_2 インキュベーターで 4 時間静置した（MTT アッセイ）。プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、コントロール（化合物未処理、または DMSO のみ添加）に比較し吸光度を低下させる（殺細胞効果または細胞増殖抑制効果がある）化合物を同定した。化合物ライブラリーは分子プロファイリング支援活動の支援を受けて入手した標準阻害剤キット 1～4（kit1 ver3.2、kit2 ver2.3、kit3 ver1.6、kit4 ver2.3）とシグマ社より購入したエピジェネティクス関連化合物ライブラリー（80 種）の計 445 化合物を用いた。その結果、2Mo3D では Ca^{2+}-PKC シグナルの阻害剤、CAMKⅡ、Ca ionophore などの阻害剤が親株に比較して細胞増殖を抑制し、神経分化に伴い、神経のシナプスやスパイン形成に重要な因子の阻害剤が細胞増殖を抑制することが示唆された。

考　察

本研究によって、神経分化誘導した小細胞肺癌に選択的に増殖抑制効果を示す化合物を同定することができた。今後、マウス移植モデルなどの動物実験によりこれら候補薬剤の有効性を評価する必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は千葉県がんセンター遺伝子診断部の横井左奈部長である。

文　献

1） Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, Covington KR, Shinbrot E, Hess JM, Rheinbay E, Kim J, Maruvka YE, Braunstein LZ, Kamburov A, Hanawalt PC, Wheeler DA, Koren A, Lawrence MS, Getz G, Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. Cell. 2016 Jan 28;164(3):538-49. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.050.

2） Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Horio Y, Takahashi T, ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):10680-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1404

3） Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, He M, Augustyn A, Osborne JK, Girard L, Minna JD, Gazdar AF, Cobb MH, Johnson JE, ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. Cell Rep. 2016 Aug 2;16(5):1259-1272. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.081.

4） Terasaki T, Shimosato Y, Nakajima T, Tsumuraya M, Ichinose H, Nagatsu T, Kato K, Reversible squamous cell characteristics induced by vitamin A deficiency in a small cell lung cancer cell line. Cancer Res. 1987 Jul 1;47(13):3533-7. PMID: 2438038

5） Ozone C, Suga H, Eiraku M, Kadoshima T, Yonemura S, Takata N, Oiso Y, Tsuji T, Sasai Y, Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. Nat Commun. 2016 Jan 14;7:10351. doi: 10.1038/ncomms10351.