

Title	肺癌における神経内分泌分化を特徴づける因子の解明
Sub Title	Search for factors that characterize neuroendocrine differentiation in lung cancer
Author	石岡, 宏太(Ishioka, Kōta)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	肺腺癌においてEGFR阻害剤を投与後に小細胞癌化した臨床検体を用いて、全エクソン解析とRNA sequenceを行い比較を行った。小細胞肺癌は4つのsubtypeに分類されるという報告があるが、肺腺癌から小細胞肺癌へtransformationした小細胞癌がどのsubtypeに分類されるかの報告はない。今回得られた結果ではASCL1及びDLL3の上昇を認め、SCLC-Aのsubtypeに属すると考えられ、これまで報告されていない新たな知見と考えられた。また、FGF9遺伝子の発現上昇、EGFR遺伝子の発現低下なども確認されており、小細胞癌化メカニズム解明に向けてさらなる解析を行っている。 We performed whole exome sequence analysis and RNA sequence, using a clinical specimen that transformed from adenocarcinoma to small cell carcinoma after administration of EGFR inhibitors. It has been reported that small cell lung cancer is classified into four subtypes, but there is no report on which subtype a small cell cancer transformed from lung adenocarcinoma should be classified. The results showed elevated mRNA levels of ASCL1 and DLL3, suggesting that they belong to the subtype of SCLC-A, which may be a new finding. In addition, increased mRNA expression of the FGF9 and decreased mRNA expression of the EGFR have been confirmed, and further analysis is being carried out to elucidate the mechanism of small cell transformation.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2019 課題番号：18K15250 研究分野：肺癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K15250seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15250

研究課題名（和文）肺癌における神経内分泌分化を特徴づける因子の解明

研究課題名（英文）Search for factors that characterize neuroendocrine differentiation in lung cancer

研究代表者

石岡 宏太 (ISHIOKA, KOTA)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：80571124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：肺腺癌においてEGFR阻害剤を投与後に小細胞癌化した臨床検体を用いて、全エクソン解析とRNA sequenceを行い比較を行った。小細胞肺癌は4つのsubtypeに分類されるという報告があるが、肺腺癌から小細胞肺癌へtransformationした小細胞癌がどのsubtypeに分類されるかの報告はない。今回得られた結果ではASCL1及びDLL3の上昇を認め、SCLC-Aのsubtypeに属すると考えられ、これまで報告されていない新たな知見と考えられた。また、FGF9遺伝子の発現上昇、EGFR遺伝子の発現低下なども確認されており、小細胞癌化メカニズム解明に向けてさらなる解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は新規治療薬の開発がなかなか進まない現状があり、未だに予後は不良であり続けている。申請者らはFGF9-FGFR-MAPK pathwayが小細胞癌化に関わる可能性があることをこれまでの実験結果から見出しており、今回臨床検体を用いた検討でもそのことを支持する結果を得られた。小細胞癌に関わる遺伝子変化は現在さらに解析中であり、小細胞癌の生物学を明らかにすることで、これまで10年以上にもわたってほとんど進歩の無かった小細胞肺癌発癌過程の本質的な理解という学術的意義、さらには治療応用につながる可能性があるという社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We performed whole exome sequence analysis and RNA sequence, using a clinical specimen that transformed from adenocarcinoma to small cell carcinoma after administration of EGFR inhibitors. It has been reported that small cell lung cancer is classified into four subtypes, but there is no report on which subtype a small cell cancer transformed from lung adenocarcinoma should be classified. The results showed elevated mRNA levels of ASCL1 and DLL3, suggesting that they belong to the subtype of SCLC-A, which may be a new finding. In addition, increased mRNA expression of the FGF9 and decreased mRNA expression of the EGFR have been confirmed, and further analysis is being carried out to elucidate the mechanism of small cell transformation.

研究分野：肺癌

キーワード：FGF9 小細胞癌 神経内分泌変化

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌における分子レベルでの異常として癌抑制遺伝子である TP53 と RB 遺伝子の変異が知られるが、他癌種でも異常を多く認めており、未だ「小細胞肺癌特異的な異常」は明らかにされていない。TP53 と RB 遺伝子変異に加えて “Additional hit” が小細胞肺癌の発生に重要であるとされるが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない (1)。申請者らは *in vivo* において p53 と Rb の機能が欠失した肺上皮細胞に FGF9 を誘導することで小細胞肺癌化させることに成功しており、これらの現象から、神経内分泌腫瘍の性質に寄与するより詳細な分子メカニズムは何なのか、また神経内分泌腫瘍となりうるための必要十分な条件は何なのか、という疑問を明らかにしたいと考え今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は神経内分泌腫瘍の性質に寄与する詳細な分子メカニズムを解明し、神経内分泌腫瘍となりうる必要十分な条件を明らかにすることである。これにより今まで 10 年以上にもわたってほとんど進歩の無かった小細胞肺癌発癌過程の本質的な理解、さらには治療応用につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 肺腺癌の小細胞癌化臨床検体における全エクソーム解析、RNA-sequence 解析

申請者らは予備実験として、我々は TP53 遺伝子、RB 遺伝子の機能的欠失を伴った肺腺癌細胞株 H2228 に対し、FGF9 を過剰発現し *in vitro*、*in vivo* での検討を行い、FGF9 を過剰発現することで神経内分泌変化を誘導できるという結果を得ていた。

EGFR 阻害剤投与後に肺腺癌から小細胞癌へ変化した臨床検体 4 例に関して免疫染色を行ったところ、いずれも FGF9 は高発現であった。そのため、当初検討していた *in vitro*、*in vivo* モデルによる網羅的解析を行うのではなく、十分に組織採取が可能であった実際の臨床症例において、肺腺癌組織、小細胞癌組織それぞれの検体を全エクソーム解析、RNA-sequence、pathway 解析を行い変化する転写因子や発現遺伝子群を検討した。

(2) Rb 遺伝子ノックアウトモデルにおける RNA-sequence 解析

小細胞肺癌はほぼ全例において TP53、RB 遺伝子変異を有し機能的欠失を伴っている。これらが小細胞癌化への必要条件とすれば、これら遺伝子の有無の違いが下流シグナルに対して与える影響を明らかにすることで小細胞癌化へ必要な因子を同定できる可能性がある。

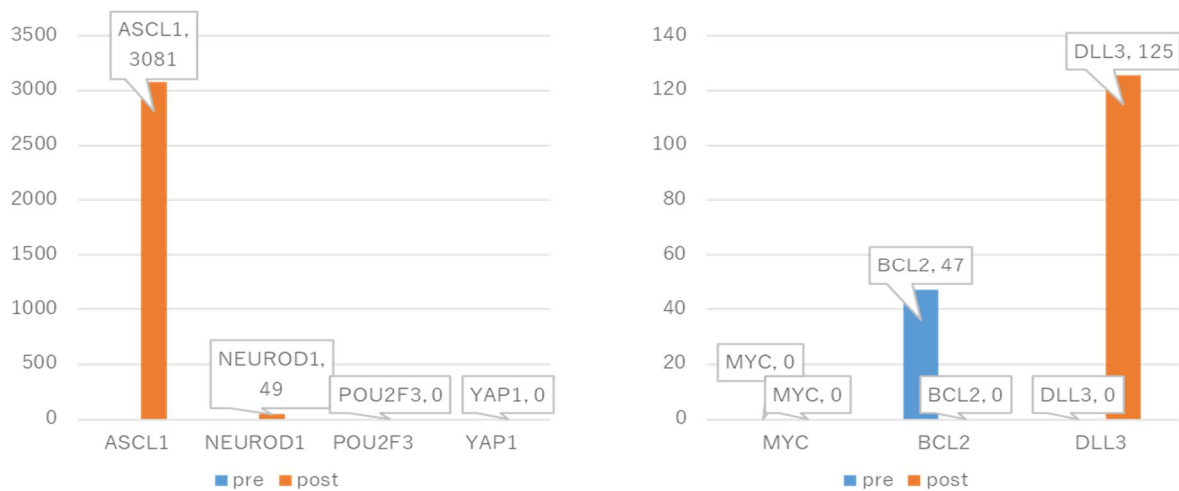
H1975 細胞は EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞であり、かつ、P53 遺伝子変異を同時にもつ細胞株である。RB 遺伝子異常は有さないため、まずは RB 遺伝子の関与を検討すべく、CRISPER/Cas9 を用いた RB 遺伝子のノックアウトを行った細胞株を作製した。RB 遺伝子異常の有無に分けて網羅的解析を行うことで神経内分泌変化に必要な候補遺伝子を同定できる可能性がある。H1975 (RB loss) 細胞と H1975-parent 細胞それぞれに FGF9 を過剰発現し、*in vitro*、*in vivo* での NGS を含めた解析を行うことを予定した。

4. 研究成果

本研究では分子生物学的手法を用いて肺上皮細胞、非小細胞肺癌に対して神経内分泌分化を誘導し、その課程における詳細な分子メカニズムを解明することを目的とした。

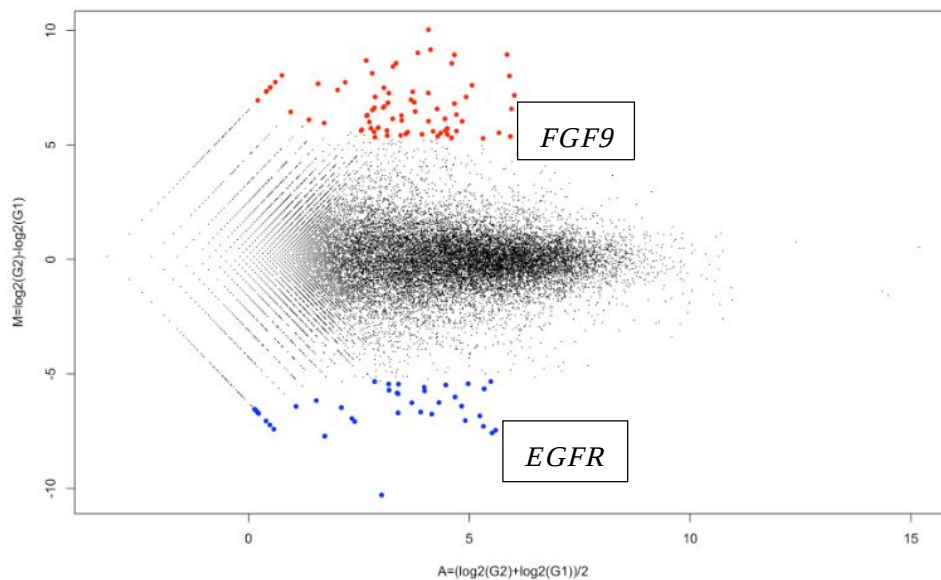
(1) 肺腺癌において EGFR 阻害剤を投与後に小細胞癌化した実症例の臨床検体を用いて全エクソーム解析と RNA sequence を行い小細胞癌化前後での比較検討を行った。全エクソーム解析では EGFR exon21 L858R 遺伝子変異を小細胞癌化前後で認めており、小細胞癌化後も確かに腺癌の EGFR 遺伝子変異が保持されていることが確認された。現在、代表遺伝子変異の変化、コピー数変化、subclone 解析などを行いさらなる追加検討を行っている。小細胞肺癌は 4 つの subtype に分類されるという報告がある (2) が、これまで肺腺癌から小細胞肺癌へ transformation した小細胞癌がどの subtype に分類されるかの報告はなされていない。今回得られた結果では *ASCL1* 及び *DLL3* の上昇が見られたことから、4 つの subtype のうち SCLC-A に属すると考えられ、これまで報告されていない新たな知見が得られた (図 1)。

(図1) 小細胞癌化前後における小細胞癌 subtype に関わる遺伝子発現量の変化



また、小細胞癌化前後での発現上昇した 310 遺伝子と発現低下した 231 遺伝子において、FGF9 は上昇遺伝子には発現低下遺伝子として含まれており、小細胞癌化を促進する遺伝子変化としてこれまでの研究結果を支持する結果が得られている (図2)。現在、遺伝子プロファイルの違いの可視化、pathway 解析 など RB,P53,FGF9 遺伝子に関連した小細胞癌化のメカニズムに関してのさらなる分析を行っている。

(図2) 小細胞癌化前後における発現上昇遺伝子群 (赤) と発現低下遺伝子群 (青)



(2) 小細胞癌化と RB 遺伝子の関与を検討するため、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞であり、かつ、P53 遺伝子変異を同時にもつ H1975 細胞を用いて CRISPR/Cas9 で RB 遺伝子ノックアウトを行った H1975(RB loss) 細胞を作製した。そして H1975(RB loss) 細胞と H1975-parent 細胞それぞれに FGF9 を過剰発現し、*in vitro*, *in vivo* において細胞形態や組織型の違いを検討した。*In vitro* においては細胞の大きさ、核の状態などの違いはなく、また、培養液中で浮遊細胞化するなど培養性質の変化は認められなかった。しかし、神経内分泌マーカーである ASCL1 に関しては H1975(RB loss)-FGF9 細胞で有意に高い発現を認めた。さらに、EGFR 阻害剤による EGFR シグナル抑制により、ASCL1 が著明に上昇した。この結果を受け、H1975(RB loss)-FGF9 細胞皮下

移植マウスを用いて、osimertinib 投与による EGFR シグナル阻害が神経内分泌化に寄与するかを確認したが、残念ながら *in vivo* において神経内分泌変化を確認することはできなかった（データなし）。そのため、これらの実験系で予定していた神経内分泌分化前後での網羅的解析は行わない方針とした。

- (1) Schaffer BE, et al. Loss of p130 accelerates tumor development in a mouse model for human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2010 May 15;70(10):3877-83
- (2) Rudin CM, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer.* 2019 May;19(5):289-297

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

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