

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 宮下 直也

本研究は神経内分泌分化を誘導するマスター転写因子である ASCL1 が肺腺癌の一部で発現していることに着目し、ASCL1 陽性肺腺癌の臨床的特徴、分子生物学的機序の解明と肺腺癌細胞株における ASCL1 の機能の解析を目的とした。組織マイクロアレイを活用した免疫組織化学染色、肺腺癌組織のトランスクリプトームデータの解析、ASCL1 陽性の肺腺癌細胞株を用いた細胞実験から、下記の結果を得ている。

1. 非小細胞肺癌患者 325 例（腺癌 224 例、扁平上皮癌 101 例）の組織マイクロアレイを用いた ASCL1 の免疫組織化学染色より、10.8% ($n = 35/325$) で ASCL1 蛋白の発現が陽性であることを確認した。また The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースの非小細胞肺癌データを解析し、ASCL1 は扁平上皮癌 (1.4%, $n = 7/502$) に比して腺癌 (8.3%, $n = 44/533$) により高い頻度で発現することを見出した。
2. ASCL1 発現と喫煙状況の関係性の調査で、元喫煙者 (6.7%, $n = 21/313$) または非喫煙者 (2.8%, $n = 2/71$) よりも現喫煙者 (15.7%, $n = 18/115$) により高い頻度で ASCL1 高発現例を認めることを確認した。また、ウプサラコホート研究の肺腺癌症例 ($n = 223$) の ASCL1 の発現と生存期間との関連の検証では、ASCL1 低発現と高発現のグループ間における患者の生存期間に統計的な違いは認めなかった。遺伝子変異との相関については、ASCL1 高発現は EGFR 変異陽性患者において有意に少ないことを発見した。
3. PD-L1 チェックポイント阻害薬の治療反応性と ASCL1 発現の関係の検証のために、ウプサラコホートより得た組織マイクロアレイサンプルに免疫組織化学染色を実施した。ASCL1 高発現の非小細胞肺癌症例では PD-L1 免疫染色陰性であり、PD1、PD-L1 チェックポイント阻害薬の効果が低い可能性が示唆された。さらに肺腺癌における ASCL1 と腫瘍免疫環境について解析するため、各免疫細胞のマーカー遺伝子を整理し、クラスター分析によって、TCGA 肺腺癌サンプルを遺伝子特性の異なる発現パターンを示す 4 つのクラスターに分離した。その結果、ASCL1 高発現群の殆どが免疫細胞マーカーの発現が低いクラスターに分類され、ASCL1 高発現肺腺癌では腫瘍内免疫細胞浸潤および免疫応答が比較的乏しく、免疫療法の障害となりうることが示唆された。

4. 26 の異なる肺腺癌細胞株の統合的なマルチオミクスデータセットである DBTSS データベースの解析では、遺伝子発現パターンを比較するため多次元スケーリングプロットにて *ASCL1* 陽性の 2 つの細胞株は明らかに差別化された遺伝子発現パターンを示すことを見出した。次に各細胞におけるスーパーエンハンサーを解析すると、*ASCL1* は *ASCL1* 陽性の VMRC-LCD および PC-7 細胞株におけるスーパーエンハンサーと関連するが、一方で他細胞株におけるスーパーエンハンサーの基準を満たしていないことを発見した。
5. *ASCL1* 陽性肺腺癌における *ASCL1* の機能を解析するため、2 つの異なる *ASCL1* siRNA を VMRC-LCD 細胞株にトランスフェクションし実験を行った。*ASCL1* ノックダウンを行うと細胞増殖は阻害され、細胞周期は G2/M 期アレストを認め、さらにアネキシン V 陽性アポトーシス細胞分画が増加することを確認した。
6. *ASCL1* 陽性肺腺癌細胞株において *ASCL1* 発現と関連する遺伝子を探索するため、si*ASCL1* で処理した VMRC-LCD 細胞の RNA-sequence 解析を行った。その結果、2 つの異なる *ASCL1* siRNA で 302 個の遺伝子をアップレギュレートし、357 個の遺伝子をダウンレギュレートすることを発見した。ダウンレギュレートされる遺伝子には、肺小細胞癌において *ASCL1* の標的遺伝子と知られる *DLL3*、*LFNG*、*RET* および *MYCL* などがあった。また RNA-sequence の結果から、*ASCL1* ノックダウンが選択的に VMRC-LCD 細胞のスーパーエンハンサー関連遺伝子を抑制することも確認した。すなわち、*ASCL1* は細胞のアイデンティティを決定する、スーパーエンハンサー媒介転写プログラムを制御するマスター制御因子として機能している可能性が示唆された。
7. *ASCL1* の腫瘍形成における役割を *in vivo* で明らかにするため、マウス肺腺癌 LLC 細胞を同系マウスの肺内に同所移植するモデルを構築した。*Ascl1* 強制発現 LLC 細胞投与群は、GFP 強制発現 LLC 細胞投与群に比して腫瘍体積、重量の増加傾向を認め、*Ascl1* 発現によって肺腺癌細胞の腫瘍形成能が促進されることが動物モデルで示された。

以上、本研究では、*ASCL1* 発現によって特徴的な臨床的または分子生物学的特性を示す、肺腺癌のサブグループが定義されることを示した。肺腺癌の治療において、治療標的となっているドライバー遺伝子変異が存在しない腺癌の新規治療の開拓は重要な課題であるが、本研究で *ASCL1* 陽性肺腺癌が特徴的な分子生物学的背景を持つことが明らかになり、肺腺癌の治療戦略に新しい展望を開き重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。