

## 論文の内容の要旨

論文題目 肺小細胞癌における ASCL1 と miRNA に関する研究  
氏名 宮川 和子  
(田中)

肺癌は悪性新生物による死因の中で最も頻度が高い。肺小細胞癌 (Small cell lung cancer: SCLC) は肺癌の約 15% を占め、悪性度が高く、2 年生存率は約 15% と著しく低い。近年になり、肺小細胞癌におけるゲノム異常、遺伝子変異、トランスクリプトームの解析が進み、TP53 や RB1 の不活性化変異がほぼ全例に認められることや、MYC ファミリー遺伝子の増幅や NOTCH 遺伝子の不活性化変異が高頻度に生じていることが報告されている。

肺小細胞癌は神経内分泌マーカーが陽性の神経内分泌型 (Neuroendocrine: NE) と、非神経内分泌型 (non-NE) に大別されることが知られていたが、最近では主要な転写制御因子の発現状況により 4 つのサブタイプ (SCLC-A、-N、-P、-Y) が定義されるようになった。肺小細胞癌の大部分は、Achaete-scute complex homolog 1 (ASCL1) を発現して神経内分泌マーカーが陽性のサブタイプ (SCLC-A) である。ASCL1 は肺の神経内分泌細胞の分化を決定づけるマスター転写因子であり、肺小細胞癌マウスモデルでは腫瘍発生に不可欠な転写因子とされる。ASCL1 の標的遺伝子には、MYCL1、NFIB、BCL2、SRY-box transcription factor 2 (SOX2)、Ret proto-oncogene (RET)、Delta like canonical Notch ligand 3 (DLL3) などがある。SCLC-N は神経内分泌マーカーが陽性で Neuronal differentiation 1 (NEUROD1) の発現が高い。SCLC-P と SCLC-Y は non-NE に分類され、それぞれ POU class 2 homeobox 3 (POU2F3)、Yes1 associated transcriptional regulator (YAP1) の発現が高い。最近になり、肺小細胞癌のサブタイプの分子病態、バイオマーカー、治療標的候補などの解析が進んでいる。

マイクロ RNA (miRNA) は 21~25 塩基の non-coding RNA であり、標的となる mRNA と結合し、遺伝子発現を抑制する。肺癌では let-7、miR-200 ファミリー、miR-15a/miR-16 などが癌抑制性 miRNA として作用し、miR-17-92 cluster や miR-21 などが癌促進性に作用することが知られている。miRNA は遺伝子発現制御を通じて、肺癌の発症や進展における分子病態や、組織型の違いに関与している。分子サブタイプに基づいた肺小細胞癌の診断や治療の個別化を進めるには、転写制御因子と miRNA の関連性について、より詳細に解明する必要があると思われる。

肺小細胞癌において最も頻度が高い分子サブタイプである SCLC-A において、ASCL1 の転写標的遺伝子を同定した報告はいくつかある。しかし、ASCL1 によって制御される miRNA のプロファイルについては、まだ報告されていない。そこで、ASCL1 を発現する細胞株における miRNA の転写活性や、ASCL1 による miRNA の発現制御を調べ、肺小細胞癌の分子サブタイプとの関係を検討することとした。

本研究では主に、SCLC-A サブタイプに属する肺小細胞癌細胞株 Lu134A を用いて検討した。まず、CUT&Tag 法によりゲノムワイドでのヒストン修飾状態 (H3K27me3、H3K4me3、H3K27ac) を解析した。H3K27ac のシグナルに基づいてスーパーエンハンサーを同定すると、ASCL1、

Insulinoma-associated protein 1 (INSM1)、Forkhead box A1 (FOXA1)、NK2 homeobox 1 (NKX2-1) など、SCLC-A で重要とされる転写因子が含まれていた。ASCL1 の標的遺伝子の多くが H3K4me3 と H3K27ac にマークされ、ASCL1、NKX2-1、INSM1 は転写開始点周辺にシグナルが広範囲に認められた。一方、SCLC-A で抑制されている遺伝子は H3K27me3 によりマークされていた。

次に、ASCL1 による遺伝子発現制御を検討した。Lu134A 細胞において ASCL1 をノックダウンすると、ASCL1 とその標的遺伝子 (DLL3、INSM1 など) の発現は低下し、YAP1 の発現が上昇した。また、ASCL1 ノックダウンにより、過去の報告で同定された 141 個の ASCL1 標的遺伝子 (ASCL1 遺伝子シグネチャー) の発現が抑制されることを Gene set enrichment analysis (GSEA) で確認した。さらに、ASCL1 ノックダウンにより、スーパーエンハンサー関連遺伝子が選択的に発現抑制を受けていることがわかり、ASCL1 は Lu134A 細胞のアイデンティティ形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

続いて ASCL1 により制御される miRNA を同定するため、Lu134A 細胞において miRNA アレイ解析を行った。ASCL1 ノックダウンにより 111 個の miRNA の発現が低下し、37 個の miRNA の発現が上昇していた。次に、公共データベース Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) の肺小細胞癌細胞株 50 種における miRNA の発現プロファイリングデータを入手し、miRNA アレイ解析の結果を比較したところ、4 つの miRNA (miR-375、miR-7-5p、miR-429、miR-200b-3p) が ASCL1 により正に制御され、miR-455-3p は ASCL1 により負に制御されることが示唆された。中でも miR-375 は ASCL1 と強い正の相関、miR-455-3p は ASCL1 と強い負の相関がみられた。CCLE の肺小細胞癌細胞株 50 種は、ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 の発現レベルによって 4 つのクラスターに分けられ、miR-375 は神経内分泌マーカーとともに SCLC-A、SCLC-N で発現が高く、miR-455-3p は SCLC-A で全般的に低い傾向が認められた。

Lu134A 細胞の CUT&Tag データでは、MIR375 と MIR7-3 の遺伝子座において H3K4me3 と H3K27ac のシグナルが濃縮しており、エピジェネティックな活性化がみられた。また、SCLC-A の細胞株 (H128、H2107、H889 細胞) における ChIP-seq データの解析により、それぞれの遺伝子座に ASCL1 が結合することが確認され、ASCL1 によって直接的に miR-375 と miR-7-5p の発現が誘導されることが示唆された。また、miRNA の遺伝子座における H3K27me3 と H3K27ac のシグナルを網羅的に比較してクラスタリングを行うと、2 つのクラスターが得られた。H3K4me3 と H3K27ac のシグナルが優位なクラスターには MIR375 が含まれていた。一方で、H3K4me3、H3K27ac のシグナルが弱く、かつ、H3K27me3 シグナルが強いものに MIR455 が含まれていた。H3K27ac のシグナルに基づき、Lu134A に特異性の高いスーパーエンハンサー関連 miRNA の遺伝子座として、MIR375 や MIR9-2 を含む 9 個のゲノム領域を同定した。特に、MIR375 は他の組織や細胞ではスーパーエンハンサーと関連しておらず、Lu134A (あるいは SCLC-A の細胞) において特異的にスーパーエンハンサーが形成されていると示唆された。

以上をまとめると、Lu134A 細胞において、一部の miRNA 遺伝子座がヒストン修飾によるエピジェネティックな制御により活性化しており、MIR375 と MIR9-2 はスーパーエンハンサーと関連していた。また、miR-7-5p と miR-375 は ASCL1 により正に制御されることが示唆された。

これらの miRNA の標的遺伝子を同定するため、TargetScan で予測される標的遺伝子と、CCLE

の肺小細胞癌細胞株 50 種において発現レベルが ASCL1 と相関を示す遺伝子を比較した。その結果、miR-7-5p、miR-9-5p、miR-375 の標的遺伝子として、それぞれ DNA polymerase epsilon 4 (POLE4)、Nuclear factor kappa B subunit 1 (NFKB1)、YAP1 に着目した。これらの遺伝子は正常肺組織や他の組織型の肺癌と比較して肺小細胞癌で発現が低いことも確認した。Pole4 のノックアウトマウスは胎生致死で発生異常を呈するが、p53 の欠損が加わるとリンパ腫の発生頻度が増すとの報告がある。ほぼ全例に TP53 不活性化変異がみられる肺小細胞癌では、POLE4 の発現抑制は腫瘍促進作用を有する可能性がある。免疫反応を誘導する転写因子 NF $\kappa$ B ファミリーに属する NFKB1 は、その発現低下によって腫瘍免疫応答が抑制され、免疫チェックポイント阻害剤の効果が得られない要因になりうる。

Lu134A 細胞での RNA-seq 解析の結果をみると、ASCL1 ノックダウンにより miR-7-5p、miR-9-5p、miR-375 の予測される標的遺伝子の発現が上昇しており、miRNA による発現抑制が解除されている傾向がみられた。特に miR-9-5p と miR-375 とに共通する標的遺伝子群の発現上昇の傾向が明瞭であり、共通する標的遺伝子には YAP1 や NOTCH2 が含まれていた。最近になり、SCLC-A において NOTCH シグナルが活性化することで、SCLC-N や SCLC-Y に移行しうるとの報告がされている。したがって、SCLC-A では miR-9-5p と miR-375 が協調的に標的遺伝子を抑制し、特に YAP1 と NOTCH2 の発現抑制に関わることで、分子サブタイプの形成に関与していることが示唆された。

次に ASCL1 によって負の制御を受ける miRNA を検討した。Lu134A 細胞における CUT&Tag データでは、MIR455 の遺伝子座で H3K27me3 のシグナルが濃縮しており、エピジェネティックな転写抑制が生じていた。FANTOM5 データベースにある小気道上皮細胞の miRNA 発現データと、SCLC-A の細胞株 (DMS53、H209、Lu130 細胞) の ChIP-seq データ、Lu134A 細胞の CUT&Tag データを統合して解析し、SCLC-A で抑制されている 7 個の miRNA を同定し、その中には miR-455-3p が含まれていた。肺小細胞癌の組織検体 81 例の RNA-seq データの解析では、MIR455 の宿主遺伝子である COL27A1 は ASCL1 と負の相関を示し、また、正常肺組織や他の組織型の肺癌と比較し、肺小細胞癌で miR-455-3p の発現が低下していることも確認した。

miR-455-3p の標的遺伝子を調べるため、miR-455-3p の mimic を細胞に導入する gain-of-function の実験を行い、RNA-seq により発現変動を示す遺伝子を網羅的に同定した。Lu134A 細胞と SBC5 細胞において miR-455-3p mimic 導入により発現が低下した遺伝子と、TargetScan と miRDB において予測される miR-455-3p の標的遺伝子を比較し、共通するものとして BCL2L12 を同定した。BCL2L12 ノックダウンによる機能解析では、BCL2L12 は複数の細胞株において、血清飢餓によるアポトーシスを阻害する作用を示した。さらに、CCLE の肺小細胞癌細胞株 50 種において、発現レベルが miR-455-3p と負の相関を示す遺伝子と比較し、miR-455-3p の標的遺伝子として Nuclear factor I B (NFIB) と Nuclear receptor subfamily 2 group F member 1 (NR2F1) を同定した。SBC5 細胞と A549 細胞に miR-455-3p mimic を導入し、NFIB と NR2F1 の発現が低下することを定量的 RT-PCR で確認した。

NFIB は ASCL1 の標的遺伝子でもあり、また NFIB を強制発現させたマウスでは転移が促進される。ASCL1 は NFIB の発現を直接的に誘導するだけでなく、miRNA を介した間接的な制御

によっても、NFIB の発現レベルを調節しうることが示唆された。NR2F1 は神経細胞の分化に関与する転写因子であるが、神経内分泌細胞の分化にも関わる可能性がある。肺小細胞癌の組織検体の RNA-seq データの解析では、NR2F1 と ASCL1 の発現レベルは正の相関を示した。

National Cancer Insutitute (NCI) の肺小細胞癌細胞株データベースを用いて、miRNA の発現と様々な薬剤への感受性の関連を分析した。miR-375 は BCL2 阻害薬 ABT-737 への感受性と正の相関があり、miR-455-3p は MET 阻害薬 Crizotinib や BRAF 阻害剤 Vemurafenib への感受性と正の相関が示された。

以上をまとめると、本研究では、ASCL1 により制御される miRNA として、miR-7-5p、miR-375、miR-455-3p を同定した。また、スーパーエンハンサーに関連し、肺小細胞癌に特異性が高いと考えられる miRNA として miR-9-5p および miR-375 を同定した。これらの miRNA は協調的に作用し、肺小細胞癌の病態や分子サブタイプに関与している可能性がある。本研究ではさらに、機能的重要性が推測される、これらの miRNA の標的遺伝子候補を探索した。本研究で同定された miRNA や標的遺伝子候補の臨床的意義については今後詳細な検討が必要であるが、miRNA を介した転写ネットワークが肺小細胞癌の病態形成に関与しうることが明らかとなり、新規診断・治療法開発の糸口となる知見が得られた。