

審査の結果の要旨

氏名 宮川（田中） 和子

本研究は肺小細胞癌の分子サブタイプを決定づける転写標的因子 ASCL1 が制御する miRNA を明らかにすることを目的とした。CUT&Tag を用いたヒストン修飾の解析、肺小細胞癌細胞株を用いた細胞実験、公共データの解析から下記の結果を得ている。

1. CUT&Tag により肺小細胞癌細胞株 Lu134A のヒストン修飾を解析し、スーパーエンハンサー（SE）関連遺伝子に ASCL1 サブタイプ肺小細胞癌（SCLC-A）に重要な遺伝子（ASCL1、INSM1、NKX2-1、FOXA1）が含まれること、ASCL1 の標的遺伝子（ASCL1 遺伝子シグネチャー）がエピジェネティックに活性化されていること、SCLC-A で発現が抑制される遺伝子が H3K27me3 により転写抑制を受けていることを明らかにし、Lu134A 細胞が SCLC-A に属することを確認した。
2. Lu134A 細胞において ASCL1 ノックダウン後に行った RNA-sequence 解析では、ASCL1 とその標的遺伝子の発現が低下し、YAP1 の発現が上昇することを確認した。ASCL1 ノックダウンにより ASCL1 標的遺伝子群の発現が抑制され、特に SE 関連遺伝子が有意に強く抑制され、ASCL1 がマスター転写因子であることが示された。
3. Lu134A 細胞において ASCL1 ノックダウン後に行った miRNA アレイ解析で、111 個の miRNA が減少し、37 個の miRNA が増加することを発見した。発現変化のあった miRNA のうち、Cancer Cell Line Encyclopedia（CCLE）の肺小細胞癌細胞株の遺伝子発現データを用いた解析で、ASCL1 により正の制御を受ける miRNA として miR-375、miR-7-5p、miR-429、miR-200b-3p、負の制御を受ける miRNA として miR-455-3p を同定した。中でも miR-375 と miR-455-3p は ASCL1 とそれぞれ正負の相関があり、クラスタリング分析では miR-375 は神経内分泌マーカーと同様の発現パターンを示し、miR-455-3p は SCLC-A 細胞株で発現が少ないことを発見した。
4. ASCL1 により正の制御を受ける 2 つの miRNA（miR-375、miR-7-5p）について、YAP1 サブタイプ肺小細胞癌（SCLC-Y）と SCLC-A の細胞株での発現量を定量的 PCR で確認し、この 2 つの miRNA は SCLC-A で特異的に発現していることを発見した。さらに、SCLC-A と NEUROD1 サブタイプ肺小細胞癌（SCLC-N）の細胞株における ChIP-sequence 解析により miR-375 と miR-7-5p の遺伝子座に ASCL1 の結合部位が同定

され、ASCL1により直接的に制御されていることを示した。

5. Lu134A 細胞の CUT&Tag により SE 関連 miRNA を同定し、Lu134A 細胞に特異性の高い SE 関連 miRNA として miR-375 や miR-9-5p を含む 6 個の miRNA を同定し、特に miR-375 は他の組織や細胞で同定されておらず、Lu134A に特異的な SE 関連 miRNA であることを示した。
6. Targetscan による標的遺伝子データと CCLE の miRNA と遺伝子の発現量の相関から miR-375、miR-7-5p、miR-9-5p の標的遺伝子を探索し、miR-375 の標的遺伝子として既報にある YAP1 が本研究でも同定された。miR-7-5p の標的遺伝子として POLE4、miR-9-5p の標的遺伝子として NFKB1 を同定し、細胞株や組織サンプルのデータを用い、各々が肺小細胞癌において発現が抑制されていることを明らかにした。さらに、ASCL1 ノックダウン後の RNA-sequence 解析から、miR-375 と miR-9-5p に共通する標的遺伝子 (YAP1、NOTCH2 など) が有意に強く抑制されていることを発見した。ASCL1 陽性肺小細胞癌の免疫組織染色では、ASCL1 と YAP1 の分布が対比的であり、ASCL1 が miR-375 と miR-9-5p を介して YAP1 を抑制していることが示唆された。
7. ASCL1 により負の制御を受ける miR-455-3p について細胞株や組織サンプルデータを用い、肺小細胞癌で発現が低いことを確認した。肺腺癌細胞株 A549 と SCLC-Y 細胞株 SBC5 に miR-455-3p mimic をトランスフェクション後に RNA-sequence を行い、miR-455-3p の標的遺伝子として BCL2L12、NFIB、NR2F1 を同定した。BCL2L12 ノックダウンによる機能解析で、BCL2L12 は腫瘍の増殖を促し、アポトーシス阻害効果があることを明らかにした。また、NFIB と NR2F1 は miR-455-3p mimic により発現が低下することを示した。

以上、本研究では ASCL1 により制御される miRNA と SCLC-A における SE 関連 miRNA を同定し、その標的遺伝子を明らかにした。特に miR-375 が miR-9-5p と協調して YAP1 を制御することは肺小細胞癌のサブタイプ決定に寄与する重要な因子であると考えられる。肺小細胞癌の分子病態やサブタイプを決定づける転写ネットワークに miRNA が関与していることが明らかになり、サブタイプごとの診断や治療への応用に重要な貢献をなすと考えられる。よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。