

博士論文

小細胞肺癌における TGF- β シグナルの機能解析

村井 文彦

目次

1. 要旨.....	3
2. 序論.....	4
2-1 小細胞肺がん	
2-2 TGF- β シグナル伝達系	
2-3 がんにおける TGF- β シグナル	
3. 実験方法.....	8
3-1 細胞培養・試薬	
3-2 細胞増殖試験	
3-3 がん移植実験	
3-4 遺伝子発現解析	
3-5 Western blotting	
3-6 強制発現系と shRNA による knockdown 系の構築	
3-7 siRNA による knockdown 系	
3-8 細胞周期解析	
3-9 クロマチン免疫沈降 (ChIP)	
3-10 免疫組織化学染色	
3-11 免疫蛍光染色	

3-12 統計解析

4. 結果.....	18
4-1 小細胞肺癌細胞における TGF- β シグナル伝達能の喪失	
4-2 小細胞肺癌の腫瘍形成に対する T β RII 強制発現の効果	
4-3 小細胞肺癌細胞の増殖に対する T β RII 強制発現の効果	
4-4 小細胞肺癌細胞の EZH2 による T β RII の発現低下	
4-5 EZH2 knockdown での小細胞肺癌細胞の増殖抑制と apoptosis 誘導	
4-6 小細胞肺癌細胞での TGF- β シグナルの活性化による Smad 依存的な ASCL1 発現制御	
4-7 小細胞肺癌細胞における ASCL1 の anti-apoptotic な作用	
4-8 ヒト肺癌組織における EZH2、T β RII、ASCL1 の発現	
5. 考察.....	30
5-1 小細胞肺癌細胞での TGF- β シグナルの活性化による apoptosis 誘導	
5-2 小細胞肺癌細胞における EZH2 による T β RII の発現低下	
5-3 小細胞肺癌細胞における ASCL1 の anti-apoptotic な作用	
6. 結語.....	39
7. 謝辞.....	40
8. 参考文献.....	41

9. 図・表.....	51
-------------	----

1. 要旨

小細胞肺癌は、有効な治療法に乏しい予後不良のがんである。小細胞肺癌細胞の生存に関わる分子メカニズムを解明することは、小細胞肺癌の治療に大きく貢献できると考えられる。本研究では、TGF- β シグナルの機能解析を通じて、小細胞肺癌細胞の新たな生存メカニズムを明らかにした。小細胞肺癌細胞では EZH2 の発現量が亢進しており、EZH2 が TGF- β type II receptor (T β RII) の epigenetic なメカニズムによる発現低下に関わることを見出した。また、この T β RII の発現低下が TGF- β 誘導性の apoptosis を抑制していた。更に、クロマチン免疫沈降シーケンシングにより、TGF- β の新たな標的遺伝子である ASCL1 を同定した。TGF- β は Smad 依存的な経路により ASCL1 の発現を抑制することで apoptosis を誘導するが、小細胞肺癌細胞ではこのメカニズムが破綻し、病的に細胞が生存している可能性が明らかになった。ヒト小細胞肺癌組織を用いた解析でも、EZH2 と T β RII と ASCL1 の発現プロファイルは分子細胞生物学的解析の結果と一致していた。これらの結果から、小細胞肺癌細胞の生存や進展に EZH2-T β RII-ASCL1 axis が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究から、これらの分子メカニズムを標的とした小細胞肺癌の治療が開発される可能性があると考えられた。

2. 序論

2-1 小細胞肺癌

肺癌は様々な悪性腫瘍の中でも死亡率の高いがんとして知られている (1)。肺癌は主に小細胞肺癌 (small cell lung cancer; SCLC) と非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer; NSCLC) の 2 つの種類に分けられ、それぞれの罹患率は、小細胞肺癌は約 15% で非小細胞肺癌は 84% である (2)。小細胞肺癌は世界保健機関 (world health organization; WHO) では high-grade な神経内分泌がんとして分類され、5 年生存率が 6% と非常に予後の悪いがんであり、非小細胞肺癌の 5 年生存率である 18% と比較しても非常に短い (2)。小細胞肺癌の治療では、外科的な治療が行われることはなく、etoposide、cisplatin、camptothecin などの抗がん剤治療や放射線治療が施行されることが一般的である。小細胞肺癌細胞は初期には抗がん剤投与により治療効果を得ることが可能であるが、がん細胞が薬剤耐性や放射線耐性を獲得することで再発が起こるという問題がある (3)。小細胞肺癌に対する新規治療戦略の構築、とくに小細胞肺癌に対する分子標的薬の研究開発が期待されており、このためには小細胞肺癌細胞の生存や進展に関わる分子メカニズムの解明が重要となる。一方で、小細胞肺癌細胞は神経内分泌細胞の特性を保持するなど、他の悪性腫瘍とは異なった

特徴的な性質があり、小細胞肺がんの特化した研究を行う必要がある。本研究は小細胞肺がんの分子メカニズムの解明を目的としたものであり、本疾患の治療に貢献できる可能性があると考えられる。

2-2 TGF- β シグナル伝達系

Transforming growth factor- β (TGF- β)は細胞の増殖や分化の調節など様々な生物学的活性を示す cytokine である。TGF- β シグナル伝達メカニズムについて図1に示す。TGF- β は膜貫通型の TGF- β type II receptor (T β RII)と TGF- β type I receptor (T β RI; activin receptor-like kinase 5 (ALK-5))という二つの異なった受容体に結合することで、細胞内にシグナルが伝達される。T β RII は細胞表面でしばしば homodimer を形成して存在し、TGF- β が結合していなくても恒常的に細胞内の serine/threonine kinase domain が活性化されている。TGF- β が結合すると T β RII は 2 分子の T β RI とで heterotetramer を形成し、T β RII の serine/threonine kinase domain は T β RI の細胞内 GS 領域 (glycine/serine-rich region)をリン酸化する。この結果、細胞内の receptor-regulated Smad (R-Smad)である Smad2 と Smad3 の C 末端 SXS の serine 残基をリン酸化し、2 分子の R-Smad と 1 分子の common-partner Smad (Co-Smad)である Smad4 とともに Smad の trimer complex を形成し、この複合体は核内移行する。核内移行した Smad-complex は、標的遺伝子内やその近傍に存

在する SBE (Smad binding element)に結合し、転写因子と転写活性共役因子や転写抑制共役因子と結合し標的遺伝子の遺伝子発現を制御している (4)。

2-3 がんにおける TGF- β シグナル

TGF- β はがんの進展において、腫瘍抑制的な機能と腫瘍促進的な機能という二面性を有している。TGF- β が腫瘍抑制的に機能する場合としては、主として TGF- β が G1 期においてがん細胞の細胞周期を停止させ、がん細胞の apoptosis を誘導することによる。G1 期における細胞周期の停止は、TGF- β が cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*; p21)と cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (*CDKN2B*; p15)の遺伝子発現を亢進し、v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (*MYC*)と cell division cycle 25A (*CDC25A*)の遺伝子発現を低下させることで誘導される。これらの因子の発現制御により、cyclin-dependent kinase (CDK) 2 や CDK4/6 のリン酸化による活性化が抑制され、CDK2-cyclin E complex や CDK4/6-cyclin D-complex による retinoblastoma タンパク (pRB)のリン酸化活性が抑制される。このため、pRB が転写因子である E2F から解離できず G1 期における細胞周期の停止が惹き起こされる (5)。肺がんにおいては、約 8%の非小細胞肺癌組織において T β RII を code している *TGFBR2* の mRNA が観察されず、強制発現による T β RII の発現回復により、TGF- β による増殖抑制が見られるよう

になる (6)。一方で、TGF- β が腫瘍促進的に機能する場合としては、主として TGF- β ががん細胞に epithelial-mesenchymal transition (EMT)を誘導し、がん細胞の浸潤や転移を促進することによる(7)。非小細胞肺癌細胞に EMT が誘導されると、がん細胞の運動能や浸潤能の亢進が観察されるが (8)、一方で転写因子 thyroid transcription factor-1 (TTF-1)は TGF- β による EMT を抑制し、非小細胞肺癌細胞の運動や浸潤を抑制する (9)。このように、非小細胞肺癌の進展において TGF- β は腫瘍抑制的に機能する場合もあれば、腫瘍促進的にも機能する場合もある。非小細胞肺癌における TGF- β の多様な作用が比較的良好に研究が進められているのに対し、小細胞肺癌における TGF- β の作用についてはほとんど理解されていない。約15年前に小細胞肺癌細胞において *TGFBR2* の発現が低下しているという報告があるが (10、11)、TGF- β の機能や T β RII の発現低下のメカニズムについては言及されていない。本研究では小細胞肺癌の進展における TGF- β の作用について明らかにすると共に、T β RII の発現低下メカニズムと小細胞肺癌の治療の開発につながる新規がん原遺伝子や新規がん抑制遺伝子を同定することを目的に研究を行った。

3. 実験方法

3-1 細胞培養・試薬

ヒト小細胞肺癌細胞 (H82、H146、H209、H345) とヒト非小細胞肺癌細胞 (A549、H441) は、American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT) は Dr. Norbert E. Fusenig (German Cancer Research Center) から供与頂いた。HEK293FT 細胞は Life Technologies から購入した。H82 細胞は RPMI 1640 medium (Life Technologies) に 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone) を添加した培地で培養した。H146 細胞と H209 細胞は RPMI 1640 medium に 10% FBS、10 mM HEPES (Life Technologies)、1 mM sodium pyruvate (Life Technologies) を添加した培地で培養した。H345 細胞は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 (1:1) medium (Life Technologies) に 5 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich)、5 µg/ml transferrin (Sigma-Aldrich)、30 nM sodium selenite (Sigma-Aldrich)、10 nM hydrocortisone (Sigma-Aldrich)、10 nM β-estradiol (Sigma-Aldrich)、15 mM HEPES、4.5 mM L-glutamine (Life Technologies) を添加した培地で培養した。A549 細胞と HaCaT 細胞は DMEM (Life Technologies) に 10% FBS を添加した培地で培養した。HEK293FT 細胞は DMEM に 10% FBS、1 mM sodium pyruvate、6 mM L-glutamine、1× MEM Non-Essential Amino Acids Solution

(Life Technologies)を添加した培地で培養した。TGF- β 3 (R & D Systems)は 4 mM HCl (Nacalai Tesque)に 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich)を添加した溶液で溶解した。Cycloheximide (Sigma-Aldrich)は dimethyl sulphoxide (DMSO, Nacalai Tesque)で溶解した。

3-2 細胞増殖試験

H82 細胞 (1×10^4 個)、H146 細胞 (3×10^4 個)、H345 細胞 (3×10^4 個)を 12 well plates に播種し TGF- β 3 (1 ng/ml)で 6 日間 (H82 細胞と H146 細胞)または 12 日間 (H345 細胞)刺激を行った。細胞増殖は Cell Count Reagent SF (WST-8 Assay Kit, Nacalai Tesque)を用いて、450 nm における吸光度と 595 nm における吸光度を Model 680 Microplate Reader (Bio-Lad)で測定し 450 nm における吸光度から 595 nm における吸光度を引いて評価した。

3-3 がん移植実験

In vivo 実験は実験動物倫理委員会の定める指針に従って行った。BALB/c *nu/nu* マウス (4 weeks、male)を Charles River Laboratories から購入し、BD Matrigel (BD Bioscience)と細胞懸濁液とを 1:1 の割合で混合したサンプルを BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に移植した (3×10^6 個、100 μ l)。腫瘍体積 (v)は腫瘍の長径 (a)と短

径 (b)を用いて以下の式で算出した。

$$v = \frac{a b^2}{2}$$

3-4 遺伝子発現解析

細胞からの RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて行い、complementary DNA (cDNA)は PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)の random hexamer protocol で行った。quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR)による遺伝子発現解析は StepOne Plus Real time-PCR System (Life Technologies)で Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies)を用いて行った。それぞれの遺伝子発現量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)の発現量で標準化した。qRT-PCR で用いた primer を表 1 に示す。Semi-quantitative RT-PCR (semi-qRT-PCR)では、RT-PCR を TaKaRa Taq DNA Polymerase (Takara)を用いて行い agarose gel を用いた電気泳動で PCR 産物を確認した。PCR 条件は 95°C (15 秒) → 55°C (30 秒) → 68°C (1 分) を 25-40 cycles で行った。semi-qRT-PCR で用いた primer を表 2 に示す。

3-5 Western blotting

細胞を phosphate-buffered saline (PBS)で wash した後に、radio-immunoprecipitation

assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.5% sodium deoxycholate)に cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) と EDTA-free phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)を添加したもので溶解した。タンパク質の濃度は BCA Protein Assay Reagent (ThermoFisher Scientific) で定量化し、等量のタンパク質を SDS-polyacrylamide gel による SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE を行った gel を Fluoro Trans W membrane (Pall)に転写した後、TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20)で溶解した 5% skim milk で blocking を行った。1 次抗体を 4°C で 16 時間反応させ、2 次抗体を常温で 1 時間反応させた後に ImageQuant LAS4000 (Fujifilm)で検出した。使用した抗体と希釈倍率を表 3 に示す。

3-6 強制発現系と shRNA による knockdown 系の構築

強制発現系と short hairpin RNA (shRNA) knockdown 系の構築はすべて lentivirus により行い、実験に用いた plasmid は三好浩之博士 (理化学研究所)より供与頂いた。cDNA 強制発現系の構築では、ヒト *TGFBR2* とヒト *ASCL1* の coding region を entry vector である pENTR201 に挿入させた。次に、destination vector である pCSII-EF-RfA や pCSII-CMV-RfA に LR Clonase II Enzyme Mix (Life Technologies)

による LR recombination で組換えを行った。同様に dominant negative type *TGFBR2* (dnTβRII)については、TβRII の serine/threonine kinase domain を欠損し green fluorescent protein (GFP) tag を付加した変異体を pCSII-EF-RfA に組換えた。また、強制発現の control として GFP を用いた。shRNA knockdown 系の構築では、ヒト *ASCL1* と *EZH2* に特異的な標的配列を Dharmacon siDESIGN Center (GE Healthcare)で探索し、その標的配列を含む塩基を annealing させ entry vector である pENTR4-H1 に挿入した。LR Clonase II enzyme mix (Life Technologies)を用いて destination vector である pCS-RfA-EG に組換えた。また、shRNA の negative control についても作成した (12)。HEK293FT 細胞に上述の destination vector とともに pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev を Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies)を用いて transfection し lentivirus を産生させた。培養溶液を Lenti-X Concentrator (Clontech)で濃縮させ lentivirus を得た。shRNA 作成に用いた oligonucleotide の配列を表 4 に示す。

3-7 siRNA による knockdown 系

Accell-small interfering RNA (siRNA) SMARTpool を Dharmacon (GE Healthcare)で購入し 1× siRNA buffer (100 μM、GE Healthcare)で溶解した。細胞に 1 μM siRNA を添加し 72 時間後に遺伝子の knockdown を評価した。購入した siRNA は表 5

に示す 4 種類の siRNA が混合されている。

3-8 細胞周期解析

細胞を PBS で wash した後に ice-cold 70% EtOH を添加し-20°C で 16 時間以上固定した。固定した細胞を 0.25 mg/ml RNase A (Sigma-Aldrich)を含む PBS に再浮遊させ、37°C で 1 時間反応させることで細胞中の RNA を分解させた。50 µg/ml propidium iodide (Life Technologies)で 30 分間 4°C で核染色をした後に、Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter)で細胞周期解析を行った。細胞周期における各々のステージの解析は FlowJo (Tomy Digital Biology)の Watson Pragmatic cell cycle analysis program で評価した。

3-9 クロマチン免疫沈降 (ChIP)

Dynabeads Sheep 抗 mouse IgG (4×10^7 beads、Life Technologies)と抗 Smad2/3 抗体 (5 µg)または isotype control (IgG1 抗体、5 µg、R & D Systems)とを 0.5% BSA 中で 4°C で 24 時間反応させ複合体を形成させた。細胞は 1% formaldehyde を用いて 10 分間常温で固定した後に、125 mM glycine で反応を停止させ sonication/ elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0)、1% SDS、cOmplete Protease Inhibitor Cocktail)で再浮遊後に Bioruptor (Cosmobio)で超音波処理を行った。超音

波処理したサンプルを 8°C、14000 rpm、10 分で遠心し得られた上清に含まれる DNA 断片を得た。その一部を抗体-dynabeads 複合体と immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM EDTA (pH 8.0)、1% Triton-X100、150 mM NaCl、cOmplete Protease Inhibitor Cocktail)中で 4°C で 24 時間反応させ免疫沈降を行った。免疫沈降させたサンプルを ChIP RIPA wash buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、500 mM LiCl、1 mM EDTA、0.7% sodium deoxycholate、1% Nonidet P-40)と TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0))で wash し、sonication/ elution buffer 中で 65°C で 16 時間 DNA 断片を溶出させた。溶出させた DNA 断片を PCR purification kit (Qiagen)で精製し解析に用いた。ChIP-qRT-PCR では FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche)を用いて StepOne Plus Real time-PCR system で Smad2/3 の enrichment を解析した。Smad2/3 の enrichment に対する negative control は Hemoglobin, beta (*HBB*)を用いた。ChIP-qRT-PCR に用いた primer を表 6 に示す。

ChIP-seq では double strand DNA (dsDNA)を Qubit dsDNA HS Assay Kits (Life Technologies)で定量し、IonXpress Plus gDNA Fragment Library Preparation (Life Technologies)でサンプル調整を行い、その DNA 濃度を Ion Library Quantification Kit (Life Technologies)で定量した。Ion PGM Template OT2 400 Kit (Life Technologies)で emulsion PCR と精製を行った後に、Ion PGM Hi-Q Sequencing

Kit-Technology Access を用いた Ion PGM Sequencer (Life Technologies) で sequencing を行った。得られたデータは National Center for Biotechnology Information (NCBI) hg19 human genome assembly にマップし、有意な Smad2/3 の結合領域の同定には CisGenome の default parameters と false discovery rate (FDR) < 0.1% の基準で行った。

3-10 免疫組織化学染色

肺がん組織の formalin 固定による paraffin 包埋標本は東京大学医学部附属病院において informed consent のもと得られ、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得て行われた。また、肺がん組織については、深山正久博士(東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 人体病理学・病理診断学分野)から供与頂いた。免疫組織化学染色は Ventana (Roche)もしくは VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories)を用いた手染めで行った。各々の組織切片は xylene で脱パラフィン化を行い、10 mM citrate buffer (pH 6.0)中で 121°C で 10 分間 autocleave をかけ抗原賦活化を行った。内在性の peroxydase は MeOH で希釈した 3% hydrogen peroxide を用いて 20 分間常温で処理し不活化させた。Blocking One (Nacalai tesque)中で希釈した 1 次抗体を 4°C で 16 時間反応させ、VECTASTAIN Elite ABC Kit に含まれる 2 次抗体を 40°C で 1 時間反応させた後に、

avidin/biotinylated peroxidase complex (ABC) reaction を 40°C で 30 分間行った。

3,3'-Diaminobenzidine (DAB、Vector Laboratories)を基質に検出を行った。定量化については、陽性細胞数の割合に応じた score を導入することで行った。また、ASCL1 の定量化については、ASCL1 が核内に存在している細胞のみを ASCL1 陽性細胞とした。免疫組織化学染色に用いた抗体と希釈倍率を表 7 に示す。

3-11 免疫蛍光染色

摘出した小細胞肺癌組織を dry-iced acetone 中で凍結させた。凍結切片は 4% paraformaldehyde を用いて常温で 5 分間固定し、0.2% Triton-X100 を用いて常温で 15 分間膜透過処理を行った。1 次抗体の Rat-抗 mouse CD31 抗体 (BD Pharmingen, 1:400)を 4°C で 16 時間反応させ、2 次抗体の抗-rat IgG-Alexa Fluor 488 抗体 (Life Technologies、1:400)を常温で 1 時間反応させた。蛍光画像は BZ-9000 Fluorescence Microscope (Keyence)で取得し、Image J software (National Institutes of Health)で定量化を行った。

3-12 統計解析

2 つのサンプル間の解析では F test で等分散性を評価した後に、Student's t test を行った。グループ間の解析では analysis of variance (ANOVA)を用いて行い、網羅

的遺伝子発現解析と免疫組織化学染色の評価には one-way ANOVA (Tukey's method)を適用し、*in vivo* 実験の解析では repeated measure ANOVA を適用した。検定では $P < 0.05$ を有意差ありとして判定した。

4. 結果

4-1 小細胞肺癌細胞における TGF- β シグナル伝達能の喪失

初めに、小細胞肺癌細胞 (H146、H82、H345、H209)において TGF- β シグナルが伝達されるか調べた。細胞内における TGF- β シグナル伝達には Smad2 のリン酸化により開始され、標的遺伝子である *SMAD7* の発現が誘導される。非小細胞肺癌の A549 細胞や、小細胞肺癌細胞の中でも H146 細胞で例外的に TGF- β による Smad2 のリン酸化が見られたが、多くの小細胞肺癌細胞 (H82、H345、H209)では Smad2 のリン酸化が見られなかった (図 2a)。同様に qRT-PCR による *SMAD7* の発現誘導についても、A549 細胞と H146 細胞では見られたが、他の小細胞肺癌細胞 (H82、H209、H345)では見られなかった (図 2b)。これより、多くの小細胞肺癌細胞では TGF- β シグナルの伝達能が喪失していると思われた。

次に、小細胞肺癌細胞で、TGF- β シグナル因子の発現について調べた。Semi-qRT-PCR (半定量的解析)から、TGF- β シグナル伝達能の喪失している細胞 (H82、H209、H345)では、T β RII を code する *TGFBR2* の発現が減少していることが分かった。一方で、I 型受容体 (*TGFBR1*)や Smad などの他の TGF- β シグナル因子については発現が認められた(図 2c)。これらの発現プロファイルは他の網羅的遺伝子発現解析の解析からも確認できる。NCBI の Gene expression

omnibus (GEO) datasets を用いて、小細胞肺癌細胞における TGF- β シグナル因子の発現を解析したところ、*SMAD2* や *SMAD4* ならびに *T β RI* を code している *TGFBR1* の発現は正常であったが、*TGFBR2* の発現のみが小細胞肺癌細胞において有意に減少していた (GEO accession number: GSE7097、GSE32036) (図 3a、3b)。更に小細胞肺癌組織においても、正常肺組織と比較して *TGFBR2* の発現が有意に減少していた (GEO accession number: GSE11969) (図 3c)。以上の結果から多くの小細胞肺癌では *T β RII* の発現が低下しており、TGF- β シグナルの伝達能が喪失していると考えられた。

4-2 小細胞肺癌の腫瘍形成に対する *T β RII* 強制発現の効果

小細胞肺癌の進展における TGF- β シグナルの機能について調べるために、lentivirus を用いて野生型の *T β RII* を強制発現させた H82 細胞 (H82-*T β RII* 細胞) と H345 細胞 (H345-*T β RII* 細胞)を樹立した。これらの細胞では TGF- β による Smad2 のリン酸化と *SMAD7* の発現誘導が確認され、TGF- β シグナルが回復していた (図 4a、4b)。次に、これらの細胞を用いて BALB/c *nu/nu* マウスに皮下移植を行い、腫瘍形成能を評価した。control の H345-GFP 細胞を移植したグループと比較して、H345-*T β RII* 細胞を移植したグループでは有意に腫瘍形成能が低下していた (図 4d)。一方で野生型の *T β RII* を発現している H146 細胞に GFP-tag

付きの dominant negative T β RII を強制発現させた H146 細胞 (H146-dnT β RII 細胞) を樹立した (図 5a)。この細胞では TGF- β による Smad2 のリン酸化と SMAD7 の発現誘導が消失しており、TGF- β シグナルが阻害されていた (図 5b、5c)。腫瘍形成能に対する TGF- β シグナルの阻害による影響を調べるために、H146-dnT β RII 細胞を用いて BALB/c *nu/nu* マウスの皮下移植を行ったところ、control の H146-GFP 細胞を移植したグループと比較して、H146-dnT β RII 細胞を移植したグループでは腫瘍形成能が促進していた (図 5d)。以上の結果から、TGF- β は *in vivo* において腫瘍抑制的に機能することが示唆された。更に、TGF- β が腫瘍微小環境に及ぼす影響を見るために、H146-dnT β RII 細胞を移植したマウスと H146-GFP 細胞を移植したマウスから腫瘍組織を摘出し、platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1; CD31) に対する染色から腫瘍血管新生の差を評価した。CD31 陽性細胞数を調べたが両者に顕著な違いを見出すことができず (図 5e)、TGF- β が小細胞肺癌細胞に与える腫瘍抑制効果には、TGF- β が腫瘍微小環境に及ぼす影響は少なく、TGF- β が小細胞肺癌細胞に直接的に及ぼす影響が重要であると示唆された。

4-3 小細胞肺癌細胞の増殖に対する T β RII 強制発現の効果

TGF- β が小細胞肺癌細胞の増殖を負に制御していると考え、*in vitro* での細胞増

殖試験を行った。T β RII を強制発現させた小細胞肺癌細胞 (H82-T β RII、H345-T β RII)では、TGF- β がこれらのがん細胞の増殖を抑制した (図 6a)。また、TGF- β シグナルを dnT β RII で遮断した H146-dnT β RII 細胞では、TGF- β による増殖抑制が阻害された (図 6a)。そこで、flowcytometry により、小細胞肺癌の細胞周期に対する TGF- β シグナル活性化時の作用を解析した。この結果、TGF- β により H345-T β RII 細胞における sub-G0/G1 の割合が増加していた (図 6b)。更に、H345-T β RII 細胞において、TGF- β により poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の分解が増強されていた (図 6c)。また、TGF- β は多くの細胞の CDK activator もしくは CDK inhibitors の発現を制御することで、細胞増殖抑制を誘導することが知られている。qRT-PCR を用いて TGF- β による *CDKN1A* (p21)、*CDKN2B* (p15)、*MYC*、*CDC25A* の発現制御を調べた。HaCaT 細胞では TGF- β により *CDKN1A* (p21)と *CDKN2B* (p15)の遺伝子発現量は増加し、*MYC* と *CDC25A* の発現量は低下したが、H345-T β RII 細胞では TGF- β によるこれらの遺伝子発現に変動は無かった (図 6d)。また、pRB の発現が H345 細胞では見られなかった (図 6c)。以上から、TGF- β シグナルの活性化による細胞増殖抑制には細胞周期の G1 期での停止ではなく apoptosis が関与していることが分かった。

4-4 小細胞肺癌細胞の EZH2 による T β RII の発現低下

Histone methyltransferase (HMT)は、histone H3 family や histone H4 family における lysine 残基や arginine 残基をメチル化することにより様々な遺伝子の発現を制御している (13)。そこで、小細胞肺癌における T β RII の発現が、HMT により epigenetic な作用で低下していると仮説を立て検証を行った。HMT のうち遺伝子発現を抑制的に制御する HMT (表 8)に焦点を当て、小細胞肺癌細胞でこれらの発現を調べた。NCBI GEO dataset の網羅的遺伝子発現解析を用いて *TGFBR2* の発現低下に関わると思われる分子 (表 8)の探索を行った。この結果、enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)の発現が、小細胞肺癌細胞や小細胞肺癌組織において、正常肺上皮細胞や正常肺組織と比較して顕著に増加していることが分かった (図 7a、7b、7c)。EZH2 は SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit (SUZ12) と embryonic ectoderm development (EED)とともに polycomb repressive complex 2 (PRC2)とよばれる複合体を形成することが知られている。SUZ12 と EED の発現についても小細胞肺癌細胞や小細胞肺癌組織において高発現している傾向が見られたが (図 7a、7b、7c)、EZH2 については mRNA レベルでもタンパク質レベルでも小細胞肺癌細胞において高発現していた (図 8a、8b)。これらの結果から T β RII の発現は *TGFBR2* 遺伝子座での PRC2、特に EZH2 による histone のメチル化により減少していると思われた。そこで、EZH2 の発現を shRNA

lentiviral vectors を用いて knockdown を行った (H345-shEZH2 細胞)。その結果、H345-EZH2 細胞では、*TGFBR2* の発現が亢進していた (図 8c)。そこで、H345-shEZH2 細胞において TGF- β シグナルが伝達されるか、TGF- β による Smad2 のリン酸化と *SMAD7* の発現誘導について調べた。TGF- β は H345-shEZH2 細胞における Smad2 のリン酸化を惹き起こし、*SMAD7* の発現も誘導させた (図 8d、8e)。以上の結果から、小細胞肺癌における T β RII の発現低下には、EZH2 による epigenetic な作用が関わっていることが示唆された。

4-5 EZH2 knockdown での小細胞肺癌細胞の増殖抑制と apoptosis 誘導

EZH2 の knockdown が H345 細胞における *TGFBR2* の発現回復に関わっていたことから、EZH2 が H345 細胞において TGF- β シグナルの活性化による apoptosis に重要であるか調べた。細胞周期解析により、TGF- β は H345-shNTC 細胞ではなく H345-shEZH2 細胞における sub-G0/G1 を増加させた (図 9a)。次に、H345-shEZH2 細胞を BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に移植を行い、腫瘍形成能を評価した。control の H345-shNTC 細胞を移植したグループと比較して、H345-shEZH2 細胞を移植したグループで腫瘍形成能が低下し、一部のマウスでは腫瘍が縮退した (図 9b)。

4-6 小細胞肺癌細胞での TGF- β シグナルの活性化による Smad 依存的な ASCL1 発現制御

次に、小細胞肺癌細胞において apoptosis に関連する TGF- β の新規標的遺伝子の探索を試みた。H345-T β RII 細胞に対して抗 Smad2/3 抗体を用いた、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq)により網羅的に解析した。特に、神経内分泌関連遺伝子とされる achaete-scute family bHLH transcription factor 1 (ASCL1)、synaptophysin (SYP)、neural cell adhesion molecule (NCAM)、v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene lung carcinoma derived homolog (MYCL)の発現は、小細胞肺癌の進展において重要な特徴とされており(14)、これらの遺伝子座における Smad2/3 の結合に着目した。これらの遺伝子座の内、ASCL1 と NCAM1 遺伝子座に Smad2/3 の結合が見られたが、SYP と MYCL 遺伝子座には Smad2/3 の結合が見られなかった (図 10a)。また、ChIP-seq 解析により、12 番染色体の ASCL1 遺伝子座には 2 か所の Smad2/3 結合領域 (103351326 – 103352062 bp、103351326 – 103352062 bp)が存在していた (図 10a)。NCAM1 遺伝子座には、11 番染色体上に複数の Smad2/3 結合領域が存在し、112869870 – 112871218 bp の領域に多く結合していた (図 10a)。なお、NCBI GEO datasets からの網羅的遺伝子発現解析の解析により、ASCL1 の発現が小細胞肺癌細胞と小細胞肺癌組織において亢進していた (図 11a, 11b)。次に、qRT-PCR により TGF- β の標的遺伝子

となり得るかどうか確認した。TGF- β 刺激により、H345-T β RII 細胞における *ASCL1* mRNA の発現は、刺激後1時間で低下し始め、4時間で最小値に達した (図 10b)。また、TGF- β はH146細胞においても刺激後2時間で *ASCL1* mRNA の発現を低下させた (図 10c)。更に、*ASCL1* タンパクも TGF- β で発現が低下した (図 10d)。網羅的遺伝子発現解析の結果と同様に (図 11a)、非小細胞肺癌細胞 (A549、H441)においては *ASCL1* mRNA の発現はほとんど無く、TGF- β による発現制御も見られなかった (図 10e)。一方で、*MYCL* mRNA と *NCAM1* mRNA と *SYP* mRNA は、小細胞肺癌細胞において TGF- β シグナルの活性化による発現制御を受けなかった (図 10b、10c)。以上の結果から、*ASCL1* は TGF- β の直接的な標的遺伝子であると推測されるとともに、TGF- β シグナルの活性化による *ASCL1* の発現抑制は小細胞肺癌細胞にとって特徴的な制御であると思われた。そこで、小細胞肺癌細胞における TGF- β シグナルの活性化による *ASCL1* の発現制御メカニズムについて検討を行った。初めに、ChIP-qRT-PCR により実際に Smad2/3 が H345-T β RII 細胞の *ASCL1* 遺伝子座に結合しているか確認したところ、TGF- β シグナルの活性化により Smad2/3 の結合が増加していた (図 12a)。一方で H345-shEZH2 細胞では *TGFBR2* の発現が亢進し TGF- β シグナルを伝達させるのに十分であったが (図 8c、8d、8e)、この細胞では TGF- β の存在に関わらず *ASCL1* の発現抑制も見られた (図 12b)。次に、*ASCL1* の発現制御が TGF- β により直接

的に制御されているのか検討するために、*de novo* タンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) で処理した。H345-T β RII 細胞において CHX 存在下でも TGF- β により、直接的な標的遺伝子である *SMAD7* mRNA の発現が誘導されたが、同様な条件で *ASCL1* の発現制御も見られた (図 12c)。これより、*ASCL1* は *SMAD7* 同様に TGF- β の直接的な標的遺伝子であると示唆された。TGF- β シグナルには Smad 依存的な経路と Smad 非依存的な経路の両方が存在する。Smad 依存的な経路では Smad-complex が TGF- β の標的遺伝子を発現制御している。一方で、Smad 非依存的な経路では、extracellular signal-regulated kinase (Erk)、stress-activated protein kinase (SAPK)/ c-jun N-terminal kinase (JNK)、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)経路を介して TGF- β の標的遺伝子を発現制御している。そこで、H345-T β RII 細胞における Smad4 の発現を shRNA により knockdown し (shSmad4)、*ASCL1* の発現制御においては Smad 依存的な経路と Smad 非依存的な経路のどちらが重要か調べた。TGF- β による *SMAD7* の発現誘導は、Smad4 の knockdown で減少した (図 12d、12e)。*ASCL1* については、negative control shRNA (shNTC)で処理した H345-T β RII 細胞で TGF- β による *ASCL1* 発現低下が見られたが、shSmad4 で Smad4 の knockdown を行うと、TGF- β による *ASCL1* の発現低下が減弱された (図 12e)。以上の結果から、TGF- β シグナルの活性化による *ASCL1* の発現抑制は、TGF- β によって直接的に制御されるとともに、Smad 依存的な経

路により抑制されていることが示唆された。

4-7 小細胞肺癌細胞における ASCL1 の anti-apoptotic な作用

ASCL1 の発現が小細胞肺癌において高発現していることが分かったことから (図 11a、11b)、TGF- β シグナルの活性化による ASCL1 の発現抑制が、小細胞肺癌細胞における TGF- β シグナルの活性化による apoptosis に重要であると仮説を立て検証することにした。初めに、shRNA を用いた ASCL1 の knockdown (shASCL1)を H345 細胞に対して行った (図 13a)。ASCL1 の knockdown により *in vitro* における細胞増殖が顕著に阻害されたが、それは H345-T β RII 細胞に TGF- β を処理した場合と同程度であった (図 13b)。また、細胞周期解析では、H345 細胞における ASCL1 の knockdown により sub-G0/G1 の割合が増加していた (図 13c)。次に、lentivirus を用いて小細胞肺癌細胞に ASCL1 の強制発現を行った。ASCL1 の強制発現により、H345-T β RII 細胞における ASCL1 の発現レベルが、TGF- β 刺激下でも維持されていた (図 13d)。また、細胞周期解析では ASCL1 を H345-T β RII 細胞に強制発現させることで、TGF- β による sub-G0/G1 の増加が減少した (図 13e)。以上の結果から ASCL1 が TGF- β シグナルの活性化による小細胞肺癌細胞の apoptosis の回避に重要であると考えられた。

更に、ASCL1 の knockdown が小細胞肺癌の腫瘍形成能を減少させる

か調べた。移植前に *in vitro* において ASCL1 に対する siRNA (siASCL1)を H345 細胞に transfection し、BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に移植を行った。ASCL1 mRNA の発現は siASCL1 の処理により、negative control for siRNA (siNTC)を処理した場合と比較して低下していた (図 13f)。siNTC を処理した H345 細胞を移植したグループでは、7 匹中 6 匹のマウスに腫瘍が形成されたが、siASCL1 を処理した H345 細胞を移植したグループでは、7 匹中 1 匹にのみ腫瘍が形成した (図 13g)。以上の結果から、ASCL1 は小細胞肺がんの腫瘍形成能にも関係していることが示唆された。

4-8 ヒト肺がん組織における EZH2、TβRII、ASCL1 の発現

最後に様々な組織型のヒト肺がん組織を用いた EZH2 と TβRII と ASCL1 のタンパク発現プロファイルを行った。肺がん症例から得られた各種肺がん組織と正常肺組織を免疫組織化学染色で評価した。なお、組織系の内訳は、小細胞肺がん ($n = 19$ (個々の検体 13 例と tissue microarray (TMA)の検体 6 例))、腺がん ($n = 44$)、扁平上皮がん ($n = 41$)、大細胞神経内分泌がん ($n = 6$)、正常肺組織 ($n = 12$) である。EZH2 はすべての小細胞肺がん細胞の核に存在しており、顕著に発現が亢進していた (図 14a)。また、EZH2 はほぼすべての扁平上皮がん細胞や大細胞神経内分泌がん細胞にも核内に発現が認められ、一部の腺がん細胞の核内にも

発現していた。だが、これらの肺がん組織における細胞の EZH2 のシグナル強度は、小細胞肺がん細胞の発現ほど高くは無かった (図 15)。一方で、正常肺上皮細胞では、EZH2 の発現は見られなかった (図 14a)。次に、TβRII の発現については、小細胞肺がん細胞においてほとんど発現していなかったが、正常肺上皮細胞では細胞膜表面に発現が見られた (図 14a)。他の組織型の肺がんについては、EZH2 の発現が認められた扁平上皮がん細胞と大細胞神経内分泌がん細胞では、TβRII の発現は見られなかった (図 15)。逆に EZH2 の発現が低下した腺がん細胞では TβRII の発現が認められ、EZH2 が発現している場合には TβRII の発現が認められなかった (図 15)。ASCL1 は小細胞肺がん細胞の核内に発現が認められたが、大部分の正常肺上皮細胞には見られなかった (図 14a)。以上の発現頻度に応じた EZH2 と TβRII と ASCL1 の発現プロファイルの結果を図 14b に示す。小細胞肺がん細胞、扁平上皮がん細胞、大細胞神経内分泌がん細胞では EZH2 と TβRII の発現は互いに逆相関しており、小細胞肺がん細胞では EZH2 と ASCL1 の発現は互いに正相関を示した。これらの結果は、ヒトの小細胞肺がん組織においても、EZH2 が epigenetic に TβRII の発現を抑制し、TβRII の発現抑制により ASCL1 の発現が亢進していることを意味すると考えられた。

5. 考察

本研究の結果から、小細胞肺がんの進展において、TGF- β は腫瘍抑制的に作用していると考えられた。また、この腫瘍抑制メカニズムには、以下の分子メカニズムを考えている。T β RII が発現している正常肺上皮細胞では、TGF- β により Smad 依存的な経路を介し直接的に ASCL1 の発現を低下させるメカニズムが存在することで、異常な細胞増殖を抑制している (図 16a)。だが、小細胞肺がん細胞では EZH2 が高発現し T β RII の発現を epigenetic に抑制し、TGF- β シグナル伝達を抑制している。このため、TGF- β による ASCL1 の抑制メカニズムが破綻され、これが小細胞肺がんにおける TGF- β による anti-apoptotic な作用ならびに腫瘍の進展に寄与していると考えられた (図 16b)。

5-1 小細胞肺がん細胞での TGF- β シグナルの活性化による apoptosis 誘導

本研究では TGF- β は小細胞肺がん細胞に apoptosis を誘導することで *in vivo* での腫瘍形成ならびに *in vitro* での細胞増殖を抑制させることを見出した (図 4、5、6)。これまで、がん細胞に対する TGF- β の腫瘍抑制効果としては、G1 期での細胞周期停止と apoptosis の誘導が重要であるとされてきた。G1 期での細胞周期停止については、TGF- β による *CDKN1A* (p21)と *CDKN2B* (p15)の発現上昇ならびに、

MYC (c-Myc)と *CDC25A* の発現低下が誘導され pRb の脱リン酸化が誘導されることが知られている。だが、本研究の結果からは、小細胞肺癌細胞では TGF- β シグナルの活性化による pRb の脱リン酸化とこれらの遺伝子の発現制御は見られなかった (図 6c、6d)。このことから、小細胞肺癌細胞では TGF- β シグナルの活性化による pRb を介した G1 期での細胞周期の停止は起きないと考えられる。このような遺伝子発現変動が小細胞肺癌で誘導されない原因については不明であり、小細胞肺癌におけるこれらの遺伝子やその近傍の定常状態におけるクロマチン開閉の状態や、TGF- β シグナル活性化時のクロマチン状態を見る必要がある。これらの遺伝子やその近傍では常にクロマチンが閉じているために、TGF- β シグナルが活性化していても発現変動が起こらない可能性が考えられる。TGF- β は更に様々な経路を介して多くの細胞に apoptosis を誘導することも知られている (5、15)。TGF- β で BCL2-like 11 (Bim) の発現誘導がおこると、BCL2-associated X protein (Bax) の活性化を介した mitochondria からの cytochrome C の放出が起こり caspase-9 と caspase-3 を介して apoptosis が誘導される (16)。また、TGF- β は p38-MAPK signal を介し growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45B) を誘導し、BH3 interacting domain death agonist (Bid) を介した cytochrome C を放出することで apoptosis を誘導する (17、18)。更に TGF- β は death-associated protein kinase (DAPK) を誘導し cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

(CDKN2A; p14/ p19)を活性化することで、p53 を介した apoptosis が誘導する (19)。

だが、本研究で行われた網羅的遺伝子発現解析や ChIP-seq のデータでは、TGF- β シグナルの活性化によるこれらの遺伝子の発現制御と apoptosis に関連性は見られなかった (村井文彦、他、未発表)。また、これら以外にも多くの遺伝子の発現を調べたが、TGF- β シグナルの活性化による pro-apoptotic factors (Bax、Bid、caspase など)や anti-apoptotic factors (Bcl2、Bcl-XL など)の発現制御も見られなかった (村井文彦、他、未発表)。これらの結果から、小細胞肺癌細胞における TGF- β 誘導性の apoptosis には、以上に示した遺伝子発現制御に依存しない経路で誘起されると示唆された。更に、pRB は p53 同様に pro-apoptotic な機能を持っていることが知られている (20)。DNA damage や E1A による oncogenic stress によって、pRB は転写因子 E2F1 と histone acetyltransferase (HAT)とともに複合体を形成し caspase-7 などの pro-apoptotic な遺伝子発現を誘導する。ただし、本研究で用いている小細胞肺癌細胞では、ATCC が公開しているデータによると TP53 の DNA 結合領域に変異が入っており、pRB の発現も H209 細胞を除いて見られない (図 6c、村井文彦、他、未発表)。このことから、小細胞肺癌細胞における TGF- β 誘導性の apoptosis は p53 や pRB に依存しないメカニズムで誘導されている可能性が考えられた。以上から、小細胞肺癌細胞における apoptosis には未知のメカニズムが関与していると思われる。

TGFBR2 内の変異や転写抑制による T β RII の機能不全が様々ながんで同定されている (21、22)。*TGFBR2* 内の変異には exon 3 内に存在する 10 個の連続した adenine (A10) に変異が導入されるケースが大腸がんや脳腫瘍で発見されている。また、T β RII の serine/threonine kinase domain や transmembrane domain に変異が入る場合も存在する。これまで、卵巣がん (V181I、W322C、S353P、N438D、M457T)、遺伝性非ポリポーシス大腸がん(T315M)、T 細胞性リンパ腫 (D404G)、消化管リンパ腫 (T458A)、頭頸部がん (E526Q、R537P) において発見されている (21、22、23)。小細胞肺がんでは A10 領域の変異が 15 症例中 1 症例のみで起きており、A10 領域の変異で frameshift 変異が起これ終始コドンが途中の exon 内で生じることで不完全な T β RII 産物が生じることになる (24)。また、不完全な T β RII 産物が生じるような変異が、21 種類の小細胞肺がん細胞の内 1 種類の細胞のみで起きている (10)。一方で、*TGFBR2* 遺伝子座を含む 3 番染色体短腕側では、ほぼすべての小細胞肺がんの患者由来の細胞で loss of heterozygosity (LOH) が生じているが、T β RII の発現低下への関与は否定的である (24)。これらの先行研究は、*TGFBR2* 内の変異が小細胞肺がんにおける T β RII の機能不全に関与する程度において必ずしも高くないことを示すものである。*TGFBR2* の発現抑制については網膜芽細胞腫や造血器腫瘍で報告されているが (22)、その詳細なメカニズムについてはほとんど理解されていない。非小細胞肺がん細胞の一部

では、*TGFBR2* 遺伝子の promoter 領域のメチル化が亢進するとともに、histone H3 のアセチル化の低下ならびに histone H3K4 メチル化の低下により *TGFBR2* 遺伝子の発現が抑制されているという報告がある (25)。小細胞肺癌細胞における *TGFBR2* 遺伝子の promoter 領域のメチル化について検討も行われているが (10、11)、これについても *TGFBR2* 遺伝子の発現抑制には関与していない可能性があった。本研究において、小細胞肺癌細胞やヒト小細胞肺癌組織を用いた解析で *TGFBR2* の発現が mRNA レベルでもタンパク質レベルでも大きく低下していた (図 2、3、14)。このことから、*TGFBR2* mRNA の転写抑制は小細胞肺癌において重要な特徴であると考えられる。*TGFBR2* mRNA の発現抑制には、histone deacetylase (HDAC) が関与しているという報告があるが (21、26)、HDAC 阻害剤である trichostatin A で小細胞肺癌細胞を処理しても *TGFBR2* mRNA の発現回復は見られなかった (村井文彦、他、未発表)。以上から、小細胞肺癌で見られる TβRII の発現抑制はこれまで知られていないメカニズムで惹き起こされていると考えられた。

5-2 小細胞肺癌細胞における EZH2 による TβRII の発現低下

本研究では、H3K27 の trimethylation を介して遺伝子発現を抑制する HMT である EZH2 が小細胞肺癌において高発現していることを見出した (図 7、8a、8b、

14a)。過去の報告でも、EZH2 だけではなく PRC2 を構成する EED と SUZ12 の発現量も増加していることが見出されているが (27)、EZH2 を含む PRC2 の小細胞肺癌細胞内での機能については言及されていない。本研究において、小細胞肺癌において特徴的な TβRII の発現抑制には、高発現している EZH2 によって epigenetic に抑制されているという新規の分子メカニズムを明らかにした。これは EZH2 ががんにおける TβRII の発現抑制に関与しているという初めての知見である。EZH2 が *TGFBR2* 遺伝子の転写活性を抑制するメカニズムについては不明である。*TGFBR2* 遺伝子の転写には転写活性を持つ転写因子 Sp1 が関与し、転写不活化には Sp3 が関与することが知られている。HAT の一つである p300 は histone をアセチル化する他に様々な分子のアセチル化を行う。p300 が Sp3 のアセチル化を誘導することで Sp3 が転写活性を有するようになり、Sp1 とともに *TGFBR2* 遺伝子の転写が行われる。これに対して HDAC1 が Sp1 や Sp3 に結合していると Sp3 のアセチル化が解除され、*TGFBR2* 遺伝子の転写が阻害される (21)。EZH2 についても Sp1 や Sp3 に結合し *TGFBR2* 遺伝子やその近傍に EZH2 が誘導されて、*TGFBR2* 遺伝子の発現を抑制している可能性があると思われる。ここで、H345-shEZH2 細胞では #1 と #2 とでは knockdown 効率が #1 の方が良いが (図 8c)、TGF-β による *SMAD7* mRNA の上昇率は #2 の方がより高く現れている (図 8e)。これについては、shRNA では siRNA に比べて off-target

効果が無視できないために、shEZH2 の配列に依存した off-target 効果のために見られた可能性があると考えている。

小細胞肺癌以外のがんにおいては、EZH2 は浸潤性の乳がんを高発現しており、がんの進展を促進させているという報告や (28)、前立腺がんにも発現しがんの悪性化に比例して EZH2 の発現が高まるという報告がある (29)。本研究における免疫組織化学染色では、小細胞肺癌組織において EZH2 の発現量が他の肺癌組織と比較して顕著に高くなっていた (図 14)。だが、EZH2 の小細胞肺癌における重要性についてはほとんど議論されていない。小細胞肺癌の発がん過程を言及した研究では、*Trp53* (p53 を code している)と *Rb1* (pRB を code している)の double knockout マウスにおいて神経内分泌に分化した正常肺細胞が小細胞肺癌の組織形態を示し、発がんが誘導されることを示した報告がある (30、31)。また、*TP53* と *RBI* 遺伝子への変異が実際にほぼすべての小細胞肺癌患者から発見されており、これらの遺伝子への変異は発がんの初期の段階で起こり、小細胞肺癌の進展を誘発すると考えられている (32)。一方で、EZH2 の発現が *Rb1* を knockout した MEF 細胞において上昇するという報告があるが (33)、小細胞肺癌でも *RBI* の機能不全により EZH2 が高発現し小細胞肺癌の発がんに寄与している可能性が考えられた。EZH2 は小細胞肺癌細胞における *TGFBR2* 遺伝子の発現抑制だけではなく、様々な遺伝子の発現を低下さ

せると考えられる。EZH2により発現抑制される遺伝子を網羅的に解析した研究では、ヒト小細胞肺癌細胞とヒト正常小気道上皮細胞とを比較している。この研究では、EZH2により小細胞肺癌において免疫反応や細胞接着に関わる分子の発現が多く低下していた (27)。これより、小細胞肺癌細胞では本研究で明らかにした細胞生存に関するメカニズムの他に、免疫から回避することで小細胞肺癌の進展に寄与していることも予想され、EZH2は小細胞肺癌の進展において大きく関与していると思われる。

EZH2阻害剤は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (diffused large B cell lymphoma; DLBCL)と一部の固形腫瘍の治療への応用が検討されるなど、その有用性について注目が集まってきている (34、35)。我々は、EZH2阻害剤であるGSK343 (Sigma-Aldrich)で小細胞肺癌細胞を処理すると、*TGFBR2*の発現が回復することを見出している (村井文彦、他、未発表)。このことから本研究は、EZH2阻害剤が、小細胞肺癌細胞におけるTβRIIの発現回復ならびに、TGF-βによるapoptosisの誘導により効果的に小細胞肺癌を治療できる可能性を示唆する。

5-3 小細胞肺癌細胞におけるASCL1のanti-apoptoticな作用

神経内分泌がんにおいて、TGF-βの標的遺伝子はほとんど明らかとなっていない

ため、そのような遺伝子を同定することは、小細胞肺癌細胞の生存メカニズムを理解する一助になると考えられる。本研究での網羅的遺伝子発現解析と ChIP-seq から、小細胞肺癌細胞における新規の TGF- β の標的遺伝子を同定した。その中から、小細胞肺癌において TGF- β 誘導性の apoptosis には、TGF- β シグナルの活性化による ASCL1 の発現低下が関わっていることを発見した。

ASCL1 は basic helix-loop-helix (bHLH) family に属する転写因子であり、神経前駆細胞 (neuronal progenitor cells; NPC) の維持や NPC から神経細胞への分化に大きく関与している (36)。また、神経内分泌に分化した正常肺上皮細胞にも ASCL1 の発現は認められるが、この細胞が腫瘍化し SCLC の表現型を示すようになると ASCL1 の発現は亢進する (30、31)。本研究では、ASCL1 が小細胞肺癌細胞において TGF- β 誘導性の apoptosis を回避することで、pro-survival に機能していることを見出した (図 13)。ASCL1 の強制発現の実験では、ASCL1 を強制発現させても control と比較して ASCL1 の発現は変化が無いように見受けられている (図 13d)。小細胞肺癌では内因性の ASCL1 が高発現しているため、強制発現による効果が見え難いと考えている。過去の報告では hedgehog シグナルが小細胞肺癌の進展に重要であるということが見出されているが (37、38)、本研究ではがん細胞において、TGF- β による ASCL1 の発現低下により apoptosis が誘導されるという新たなメカニズムを発見した。一方で、ASCL1 の発現が hedgehog

シグナルによって、制御されているかについては詳細な検討はされていない。

また、本研究は、TGF- β シグナルの活性化が小細胞肺癌細胞だけではなく、ASCL1 の発現が認められる肺カルチノイドや大細胞神経内分泌肺癌細胞や他臓器由来の神経内分泌がん細胞においても (39)、ASCL1 の発現抑制を介した apoptosis を誘導する可能性をも示唆すると思われる。ASCL1 が小細胞肺癌細胞の細胞増殖に寄与するメカニズムについては、十分に解明していない。だが、先行研究では ASCL1 が microRNA-375 の発現を亢進し、microRNA-375 の標的の一つである YAP-1 の発現が低下することで apoptosis が抑制されるという報告がある (40)。小細胞肺癌組織において microRNA-375 の発現が正常肺組織と比較して亢進していることを NCBI の GEO datasets の再解析で確認している (GEO accession number: GSE11945、村井文彦、他、未発表)。また、ASCL1 の下流の遺伝子を ASCL1 の ChIP-seq で網羅的に解析した研究では、ASCL1 は細胞周期を活性化させる分子の発現を亢進させることが報告されている (41)。このため、TGF- β シグナルの活性化で小細胞肺癌細胞の ASCL1 の発現が低下することで、ASCL1 によって制御される細胞周期を活性化させる分子の発現も低下し、apoptosis が誘導されると考えられる。小細胞肺癌細胞における TGF- β 誘導性の apoptosis への関与については更に詳細な検討が必要である。そして、多くのがん細胞では ASCL1 の発現はほとんど認められない。このようながん細胞にお

ける TGF- β による apoptosis 誘導は、既に報告されている経路により惹き起こされることが考えられる (5)。また、小細胞肺癌に恒常活性化型の Ras を強制発現させると、ASCL1 の発現が低下し神経内分泌に特徴的な分子の発現が低下することが知られている (14)。また、MYC (c-Myc)と恒常活性化型の Ras を小細胞肺癌細胞に強制発現させると ASCL1 の発現が低下することも知られている (42)。このような ASCL1 の発現が低下した小細胞肺癌細胞については MYC が anti-apoptotic な作用を持ち apoptosis から回避していることが予想される。

続いて、本研究では ASCL1 mRNA の発現が TGF- β シグナルの活性化によって、直接的に Smad 依存的な経路を介して抑制されていることを示した (図 10、12)。TGF- β シグナルによって間接的に誘導される遺伝子については、今回の研究では見出すことが出来なかったため、ASCL1 mRNA の発現が直接的に制御されることを示した実験 (図 12c)では、TGF- β シグナルによって間接的に誘導される遺伝子による評価を行っていない。だが、ASCL1 mRNA の発現は TGF- β 処理後直ちに SMAD7 mRNA 同様に発現制御を受けることから、ASCL1 mRNA の発現は TGF- β の直接的な標的遺伝子と考えられる (図 10b、10c)。ASCL1 を含め achaete-scute family bHLH transcription factor には ASCL1 から ASCL5 まで 5 種類存在することが知られているが、TGF- β シグナルの活性化によって発現制御を受けるのは ASCL1 のみである (図 10a、村井文彦、他、未発表)。ASCL1 mRNA

の発現は notch シグナルによっても発現抑制を受けることが小細胞肺癌細胞を用いた研究で明らかになっているが (43)、TGF- β シグナルと *ASCL1* mRNA との関連を解明した研究については、本研究が初めてである。本研究は小細胞肺癌だけでなく、TGF- β による *ASCL1* の発現抑制で導かれるであろう neuron の apoptosis の可能性や、これにより惹き起こされる神経疾患の解明にも繋がる研究である。

最後に、本研究は *EZH2* や *ASCL1* を標的にする治療戦略が小細胞肺癌の治療に対して有効であり、これらの分子や *TBR1* の発現が小細胞肺癌の進展や発がんに対するバイオマーカーとしても有効である可能性を示唆するものである。

6. 結語

- ◆ 小細胞肺癌では T β RII の発現低下により、TGF- β シグナルの伝達が抑制されている。
- ◆ T β RII の強制発現で TGF- β による小細胞肺癌細胞の apoptosis が誘導され、腫瘍形成能が低下する。
- ◆ 小細胞肺癌細胞における T β RII の発現低下には、EZH2による epigenetic な作用が関与している。
- ◆ TGF- β は直接的に Smad 依存的な経路を介して、小細胞肺癌細胞の ASCL1 の発現を低下させる。
- ◆ ASCL1 は小細胞がん細胞の TGF- β シグナルの活性化による apoptosis を抑制している。
- ◆ ヒト小細胞肺癌組織では、EZH2が高発現、T β RII は低発現、ASCL1 が高発現している。

7. 謝辞

本研究を行うにあたって、鯉沼代造博士には ChIP-seq の実験指導を頂きました。

また、森下保幸技術職員には免疫組織化学染色と免疫蛍光染色の実験指導を頂

きました。江幡正悟博士ならびに宮園浩平教授には、多くのご指導を賜りまし

た。感謝申し上げます。

8. 参考文献

1. Sun, S., Schiller, J. H., and Gazdar, A. F. Lung cancer in never smokers-a different disease. *Nat. Rev. Cancer* 7, 778-790 (2007)
2. American Cancer Society, Inc. *Cancer Facts & Figures 2013* (2013)
3. Jackman, D. M., and Johnson, B. E. Small-cell lung cancer. *Lancet* 366, 1385-1396 (2005)
4. Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471 (1997)
5. Pardali, K., and Moustakas, A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1775, 21-62 (2007)
6. Anumanthan, G., Halder, S. K., Osada, H., Takahashi, T., Massion, P. P., Carbone, D. P., and Datta, P. K. Restoration of TGF- β signalling reduces tumorigenicity in human

lung cancer cells. *Br. J. Cancer* 93, 1157–1167 (2005)

7. Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156-172 (2009)

8. De Craene, B., and Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 13, 97-110 (2013)

9. Saito, R. A., Watabe, T., Horiguchi, K., Kohyama, T., Saitoh, M., Nagase, T., and Miyazono, K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 69, 2783-2791 (2009)

10. Hougaard, S., Nørgaard, P., Abrahamsen, N., Moses, H. L., Spang-Thomsen, M., and Skovgaard Poulsen, H. Inactivation of the transforming growth factor β type II receptor in human small cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 79, 1005-1011 (1999)

11. de Jonge, R. R., Garrigue-Antar, L., Vellucci, V. F., and Reiss, M. Frequent

inactivation of the transforming growth factor beta type II receptor in small-cell lung carcinoma cells. *Oncol. Res.* 9, 89-98 (1997)

12. Katayama, K., Wada, K., Miyoshi, H., Ohashi, K., Tachibana, M., Furuki, R., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakajima, A., Kadowaki, T., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Kamisaki, Y., and Mayumi, T. RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Lett.* 560, 178-182 (2004)

13. Greer, E. L., and Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 13, 343-357 (2012)

14. Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Meuwissen, R., and Berns, A. A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell* 19, 244-256 (2011)

15. Ikushima, H., and Miyazono, K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 10, 415-424 (2010)

16. Ohgushi, M., Kuroki, S., Fukamachi, H., O'Reilly, L. A., Kuida, K., Strasser, A., and Yonehara, S. Transforming growth factor β -dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 10017-10028 (2005)

17. Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K., and Saito, H. Smad-dependent GADD45 β expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . *EMBO J.* 21, 6473-6482 (2002)

18. Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A. G., Hoffman, B., Fornace, A. J. Jr, Liebermann, D. A., Bottinger, E. P., and Roberts, A. B. Transforming growth factor- β -induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45 β through p38 activation. *J. Biol. Chem.* 278, 43001-43007 (2003)

19. Jones, P. A. Cancer. Death and methylation. *Nature* 409, 143-144 (2001)

20. Ianari, A., Natale, T., Calo, E., Ferretti, E., Alesse, E., Screpanti, I., Haigis, K.,

Gulino, A., Lees, J. A. Proapoptotic function of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Cancer Cell* 15, 184-194 (2009)

21. Chowdhury, S., Ammanamanchi, S., and Howell, G. M. Epigenetic Targeting of Transforming Growth Factor β Receptor II and Implications for Cancer Therapy. *Mol. Cell Pharmacol.* 1, 57-70 (2009)

22. Kim, S. J., Im, Y. H., Markowitz, S. D., and Bang, Y. J. Molecular mechanisms of inactivation of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 159-168 (2000)

23. Lynch, M. A., Nakashima, R., Song, H., DeGross, V. L., Wang, D., Enomoto, T., and Weghorst, C. M. Mutational analysis of the transforming growth factor β receptor type II gene in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 58, 4227-4232 (1998)

24. Tani, M., Takenoshita, S., Kohno, T., Hagiwara, K., Nagamachi, Y., Harris, C. C., and Yokota, J. Infrequent mutations of the transforming growth factor beta-type II receptor gene at chromosome 3p22 in human lung cancers with chromosome 3p

deletions. *Carcinogenesis* 18, 1119-1121 (1997)

25. Osada, H., Tatematsu, Y., Sugito, N., Horio, Y., and Takahashi, T. Histone modification in the TGFbetaRII gene promoter and its significance for responsiveness to HDAC inhibitor in lung cancer cell lines. *Mol. Carcinog.* 44, 233-241 (2005)

26. Yamashita, S., Takahashi, S., McDonnell, N., Watanabe, N., Niwa, T., Hosoya, K., Tsujino, Y., Shirai, T., and Ushijima, T. Methylation silencing of transforming growth factor- β receptor type II in rat prostate cancers. *Cancer Res.* 68, 2112-2121 (2008)

27. Sato, T., Kaneda, A., Tsuji, S., Isagawa, T., Yamamoto, S., Fujita, T., Yamanaka, R., Tanaka, Y., Nukiwa, T., Marquez, V. E., Ishikawa, Y., Ichinose, M., and Aburatani, H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci. Rep.* 3, 1-9 (2013)

28. Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., Ghosh, D., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Hayes, D. F., Sabel, M. S., Livant, D., Weiss, S. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes

neoplastic transformation of breast epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 11606-11611 (2003)

29. Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature 419, 624-629 (2002)

30. Sutherland, K. D., Proost, N., Brouns, I., Adriaensen, D., Song, J. Y., and Berns, A. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of *Trp53* and *Rb1* in distinct cell types of adult mouse lung. Cancer Cell 19, 754-764 (2011)

31. Meuwissen, R., Linn, S. C., Linnoila, R. I., Zevenhoven, J., Mooi, W. J., and Berns, A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both *Trp53* and *Rb1* in a conditional mouse model. Cancer Cell 4, 181-189 (2003)

32. Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M.L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., Plenker, D., Leenders, F., Sun, R., Zander, T., Menon, R., Koker, M., Dahmen, I., Müller,

C., Di Cerbo, V., Schildhaus, H. U., Altmüller, J., Baessmann, I., Becker, C., de Wilde, B., Vandesompele, J., Böhm, D., Ansén, S., Gabler, F., Wilkening, I., Heynck, S., Heuckmann, J. M., Lu, X., Carter, S. L., Cibulskis, K., Banerji, S., Getz, G., Park, K. S., Rauh, D., Grütter, C., Fischer, M., Pasqualucci, L., Wright, G., Wainer, Z., Russell, P., Petersen, I., Chen, Y., Stoelben, E., Ludwig, C., Schnabel, P., Hoffmann, H., Muley, T., Brockmann, M., Engel-Riedel, W., Muscarella, L. A., Fazio, V. M., Groen, H., Timens, W., Sietsma, H., Thunnissen, E., Smit, E., Heideman, D. A., Snijders, P. J., Cappuzzo, F., Ligorio, C., Damiani, S., Field, J., Solberg, S., Brustugun, O. T., Lund-Iversen, M., Sängler, J., Clement, J. H., Soltermann, A., Moch, H., Weder, W., Solomon, B., Soria, J. C., Validire, P., Besse, B., Brambilla, E., Brambilla, C., Lantuejoul, S., Lorimier, P., Schneider, P. M., Hallek, M., Pao, W., Meyerson, M., Sage, J., Shendure, J., Schneider, R., Büttner, R., Wolf, J., Nürnberg, P., Perner, S., Heukamp, L. C., Brindle, P. K., Haas, S., and Thomas, R. K. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* 44, 1104-1110 (2012)

33. Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., Helin, K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22, 5323-5335 (2003)

34. McCabe, M. T., Ott, H. M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G. S., Liu, Y., Graves, A. P., Della Pietra, A. III., Diaz, E., LaFrance, L. V., Mellinger, M., Duquenne, C., Tian, X., Kruger, R. G., McHugh, C. F., Brandt, M., Miller, W. H., Dhanak, D., Verma, S. K., Tummino, P. J., and Creasy, C. L. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108-112 (2012)

35. Helin, K., Dhanak, D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* 502, 480-488 (2013)

36. Imayoshi, I., and Kageyama, R. bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. *Neuron* 82, 9-23 (2014)

37. Park, K. S., Martelotto, L. G., Peifer, M., Sos, M. L., Karnezis, A. N., Mahjoub, M. R., Bernard, K., Conklin, J. F., Szczepny, A., Yuan, J., Guo, R., Ospina, B., Falzon, J., Bennett, S., Brown, T. J., Markovic, A., Devereux, W. L., Ocasio, C. A., Chen, J. K., Stearns, T., Thomas, R. K., Dorsch, M., Buonamici, S., Watkins, D. N., Peacock, C. D.,

and Sage, J. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat. Med.* 17, 1504-1508 (2011)

38. Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A., and Baylin, S. B. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313-317 (2003)

39. Borges, M., Linnoila, R. I., van de Velde, H. J., Chen, H., Nelkin, B. D., Mabry, M., Baylin, S. B., and Ball, D. W. An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature* 386, 852-855 (1997)

40. Nishikawa, E., Osada, H., Okazaki, Y., Arima, C., Tomida, S., Tatematsu, Y., Taguchi, A., Shimada, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Toyokuni, S., Sekido, Y., and Takahashi, T. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer Res.* 71, 6165-6173 (2011)

41. Castro, D. S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L. G., Hunt, C., Dolle, D., Bithell, A., Eттwiller,

L., Buckley, N., and Guillemot, F. A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev.* 25, 930-945 (2011)

42. Barr, L. F., Campbell, S. E., Penno, M. B., Ball, D. W., and Baylin, S. B. Cell-substratum interactions mediate oncogene-induced phenotype of lung cancer cells. *Cell Growth Differ.* 7, 1149-1156 (1996)

43. Sriuranpong, V., Borges, M. W., Strock, C. L., Nakakura, E. K., Watkins, D. N., Blaumueller, C. M., Nelkin, B. D., and Ball, D. W. Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1. *Mol. Cell Biol.* 22, 3129-3139 (2002)

9. 図・表

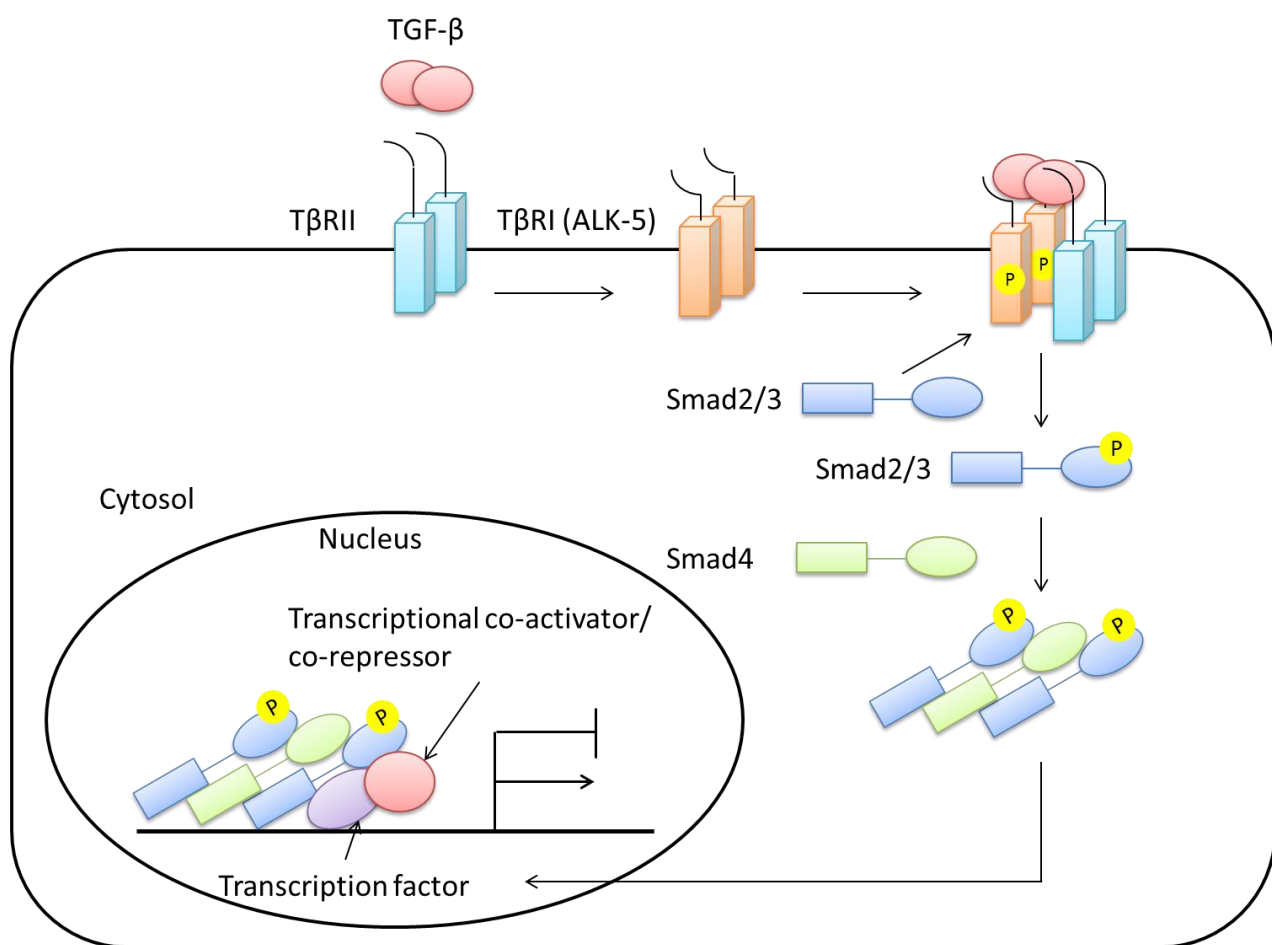


図1 TGF-βシグナル伝達の概略。

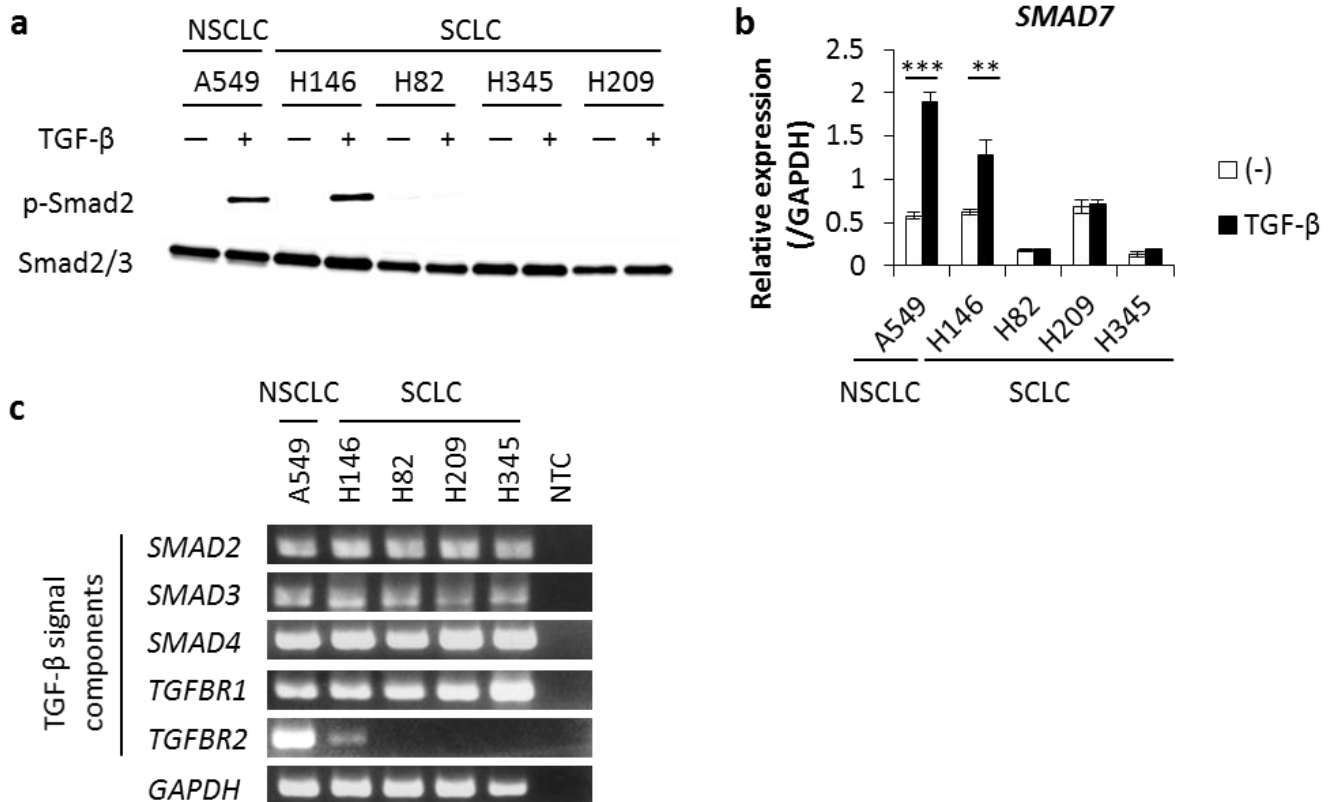


図2 T β RIIの発現低下により、小細胞肺癌細胞においてはTGF- β シグナル伝達能が低下する。

(a) 小細胞肺癌細胞をTGF- β で2時間刺激し、図中に示した抗体と細胞溶解液を用いたWestern blotを行った。A549細胞はpositive controlである。(b) (a)における細胞を用いてSMAD7 mRNAの発現量をqRT-PCRで評価した。A549細胞はpositive controlである。結果は平均値 \pm SD(標準偏差)を表す。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) (c) 小細胞肺癌細胞におけるTGF- β シグナル因子の発現をsemi-qRT-PCRで評価した。A549細胞はpositive controlである。

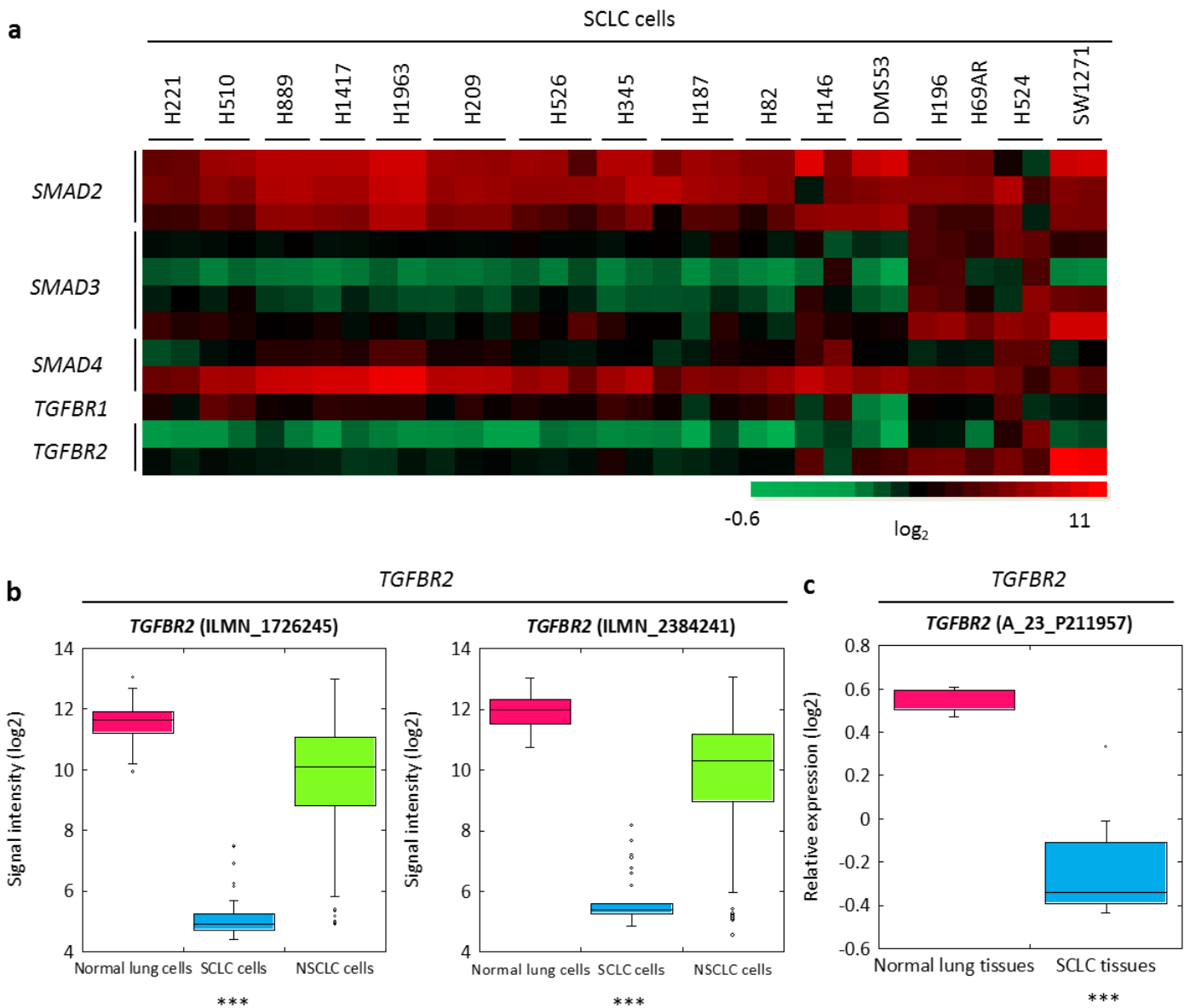


図 3 *TGFBR2* の発現は小細胞肺がんにおいて強く抑制されている。

(a) 小細胞肺がん細胞 ($n = 16$)における TGF- β シグナル因子の発現を NCBI GEO database (GEO accession number: GSE7097)から得た網羅的遺伝子発現解析の結果を用いて解析した。(b)正常肺上皮細胞 ($n = 59$)、小細胞肺がん細胞 ($n = 29$)、非小細胞肺がん細胞 ($n = 118$)における *TGFBR2* の発現を NCBI GEO database (GEO accession number: GSE32036) から得た網羅的遺伝子発現解析の結果を用いて解析した。(***, $P < 0.001$) (c) 正常肺組織 ($n = 5$)と小細胞肺がん組織における ($n = 9$)における *TGFBR2* の発現を NCBI GEO database (GEO accession number: GSE11969) から得た網羅的遺伝子発現解析の結果を用いて解析した。(***, $P < 0.001$)

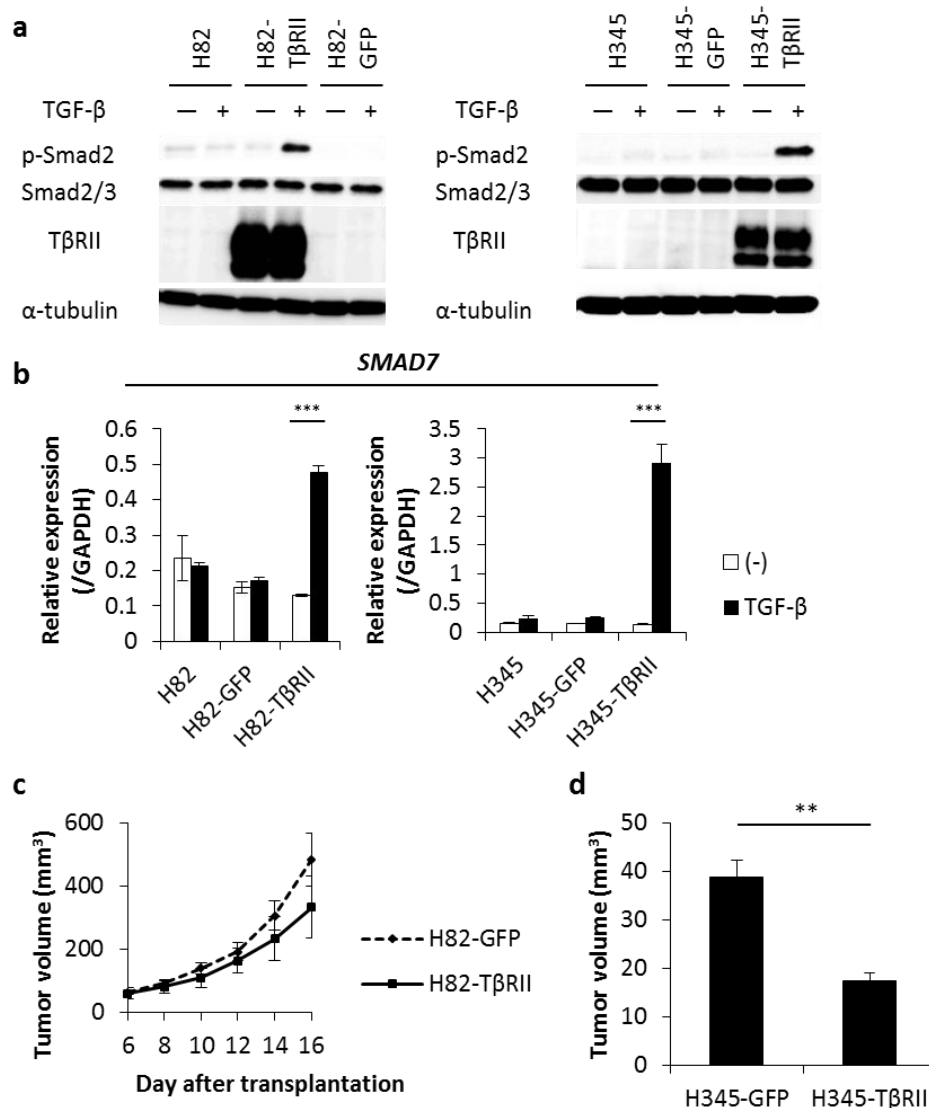


図 4 TβRII の強制発現は *in vivo* における小細胞肺がんの腫瘍形成能を低下させる。

(a) 小細胞肺がん細胞に lentivirus vector を用いて、GFP (H82-GFP 細胞と H345-GFP 細胞) もしくは TβRII (H82-TβRII 細胞と H345-TβRII 細胞) を強制発現させた。TGF-β で 2 時間刺激を行い、図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。(b) (a) における細胞を用いて SMAD7 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 ± SD を表す。(***, $P < 0.001$) (c) BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に H82-GFP 細胞 ($n = 9$) もしくは H82-TβRII 細胞 ($n = 6$) を移植し、腫瘍体積を図中に示す時間に測定した。結果は平均値 ± SEM (標準誤差) を表す。(d) BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に H345-GFP 細胞 ($n = 7$) もしくは H345-TβRII 細胞 ($n = 9$) を移植し、腫瘍体積を移植後 17 日目に測定した。結果は平均値 ± SEM を表す。(**, $P < 0.01$)

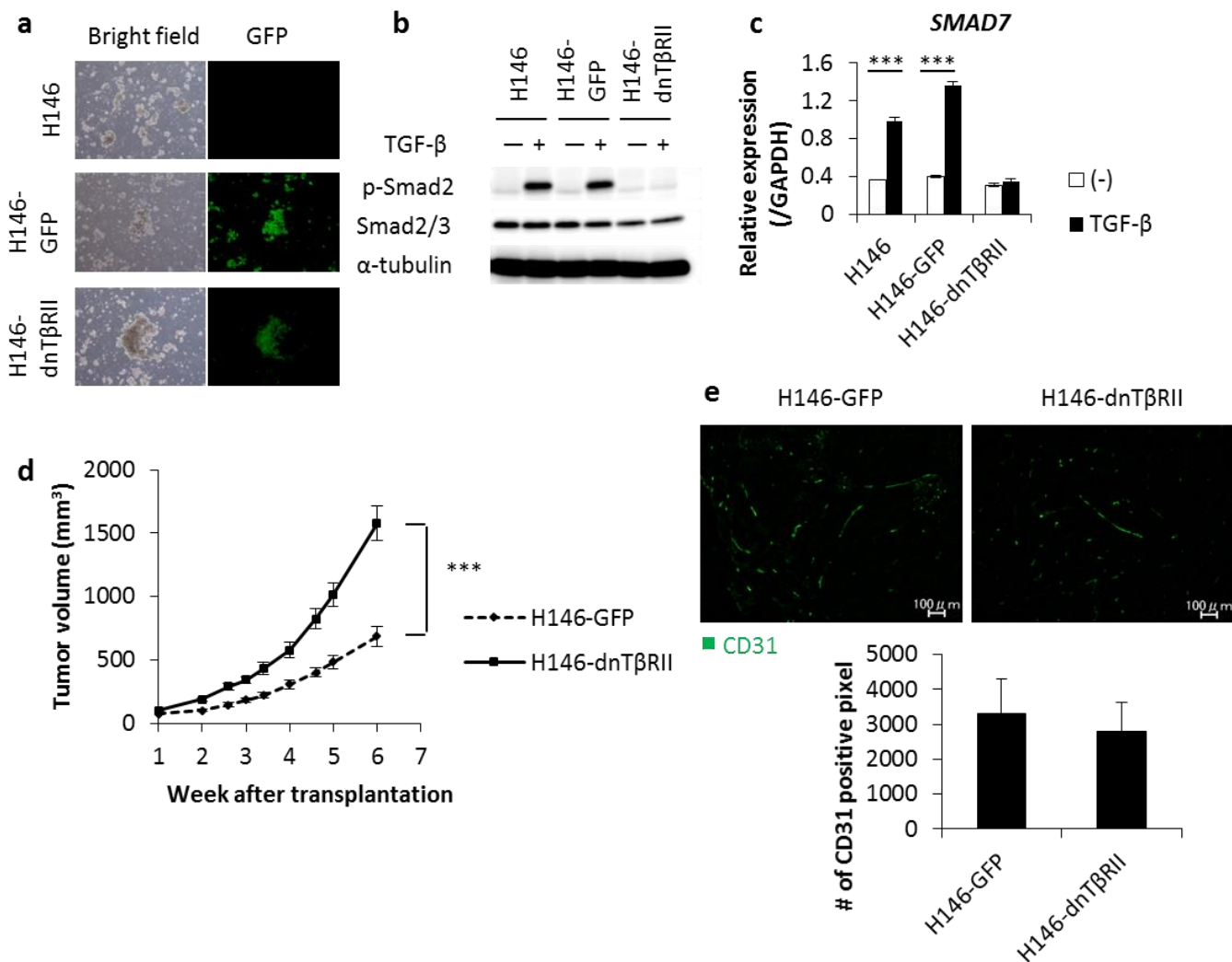


図5 TGF-βシグナルの遮断により、*in vivo*における小細胞肺がんの腫瘍形成能が促進される。

(a) H146細胞に lentivirus vector を用いて GFP (H146-GFP細胞)もしくは dnTβRII (H146-dnTβRII細胞)を強制発現させた。GFPの蛍光を蛍光顕微鏡で確認した。(b) H146-GFP細胞と H146-dnTβRII細胞を TGF-βで2時間刺激を行い、図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。(c) (b)における細胞を用いて *SMAD7* mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 ± SD を表す。(***, $P < 0.001$) (d) BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に H146-GFP細胞 ($n = 9$)または H146-dnTβRII細胞 ($n = 10$)を移植し、腫瘍体積を図中に示す時間に測定した。結果は平均値 ± SEM (標準誤差)を表す。(***, $P < 0.001$) (e) (d)におけるマウスを移植後6週間後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は、抗 CD31 抗体を用いて染色した (上)。CD31 陽性領域を示す結果は平均値 ± SD を表す (下)。

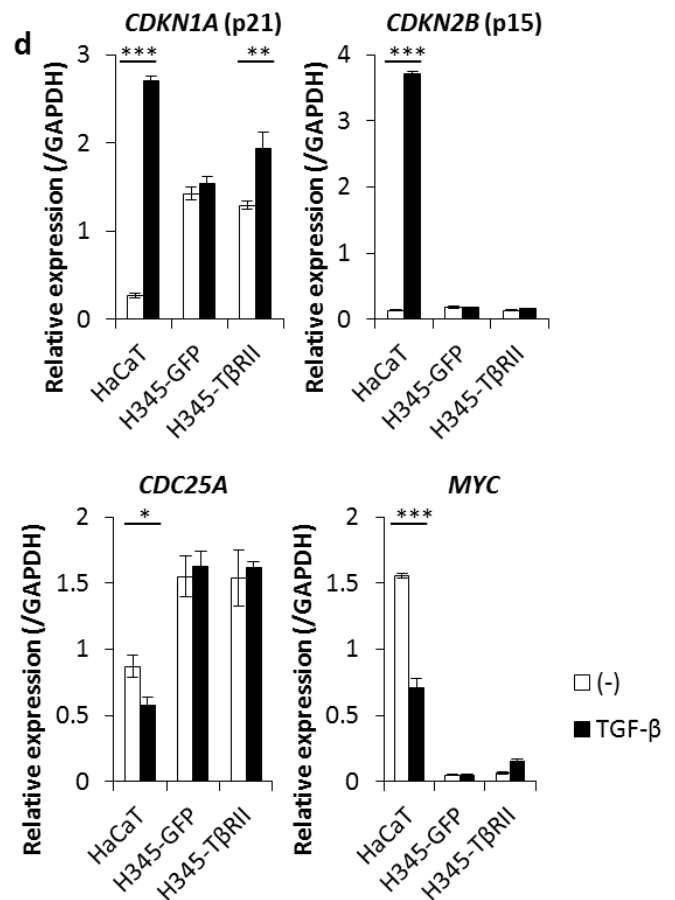
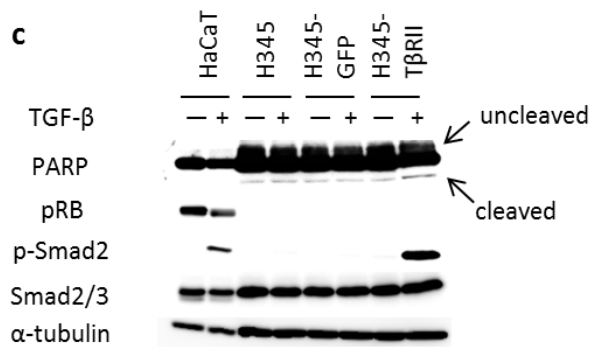
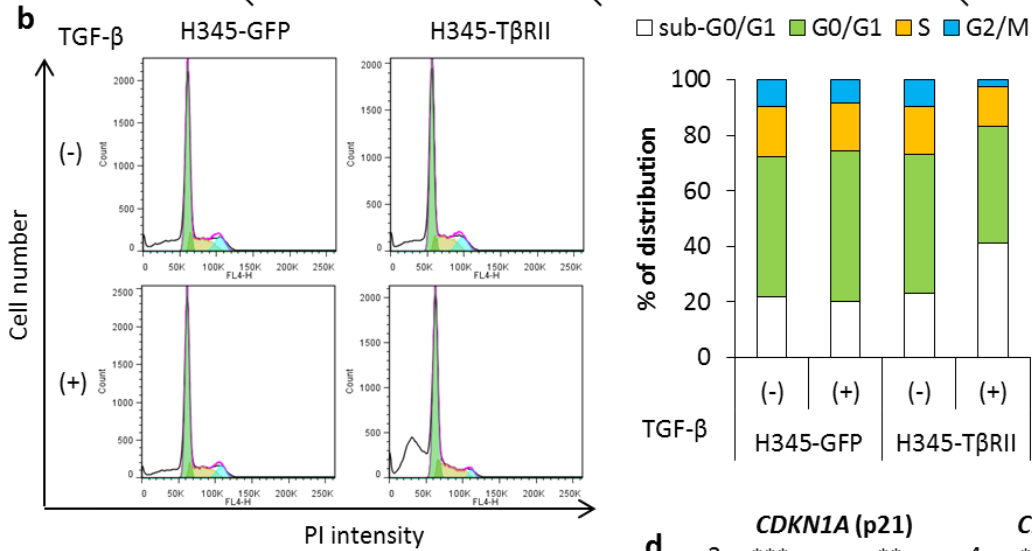
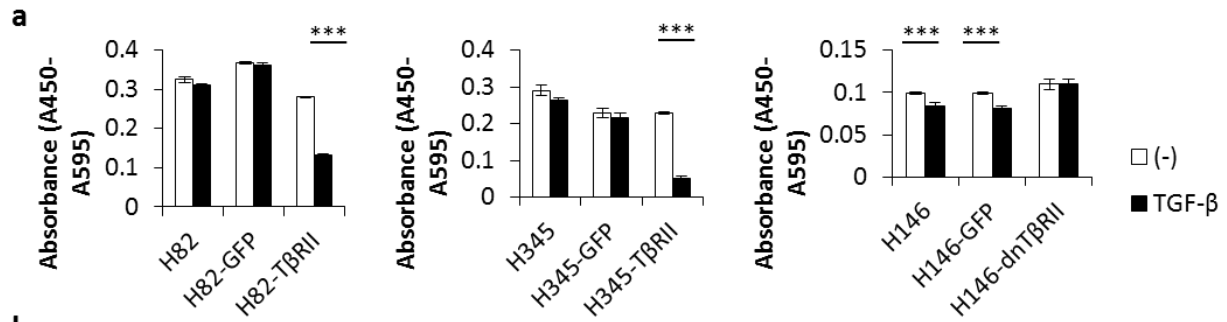


図 6 TGF- β は *in vitro* における H345-T β RII 細胞の増殖を抑制し、細胞周期停止ではなく apoptosis を誘導する。

(a) 小細胞肺癌細胞を TGF- β で 6 日間 (H82 細胞、H146 細胞)もしくは 12 日間 (H345 細胞)刺激を行い、細胞増殖試験を行った。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) **(b)** H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞を TGF- β で 12 日間刺激し細胞周期解析を行った。sub-G0/G1, G0/G1 期, S 期, G2/M 期を histograms で示す (左)。各々のステージにいる細胞の割合を示す (右)。 **(c)** H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞に TGF- β で 12 日間刺激を行い、図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。HaCaT 細胞は TGF- β で 48 時間刺激を行い positive control として用いた。 **(d)** H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞を TGF- β で 2 時間 (*MYC*) または 24 時間 (*CDKN1A*, *CDKN2B*, and *CDC25A*)刺激を行った。図中に示す遺伝子発現量を qRT-PCR で評価した。HaCaT 細胞は positive control として用いた。結果は平均値 \pm SD を表す。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

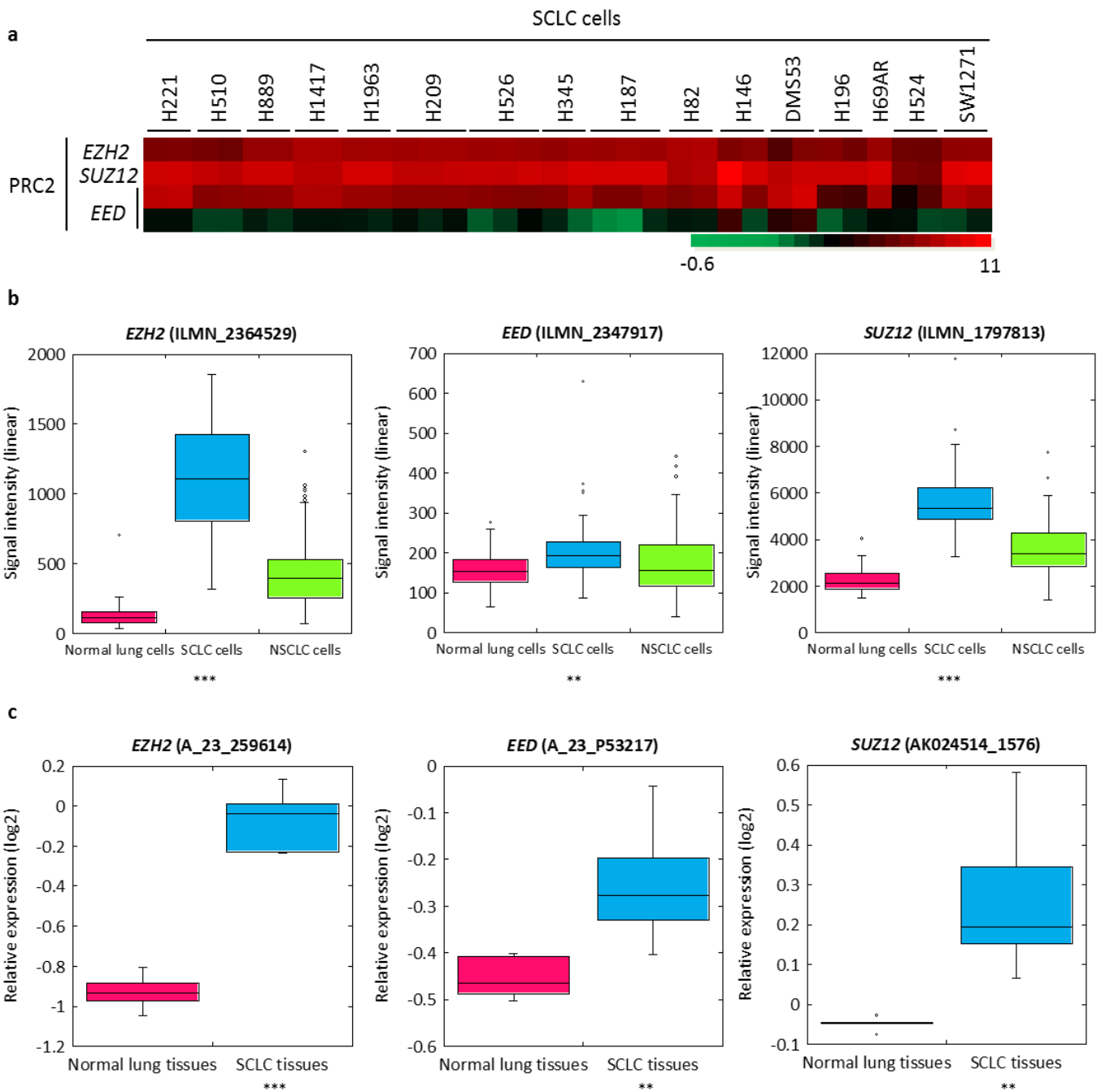


図 7 PRC2 構成因子の発現量は、小細胞肺がんにおいて上昇している。

(a) 小細胞肺がんにおける PRC2 構成因子の発現量を図 3a と同じデータを用いて調べた。(b) 正常肺上皮細胞と肺がん細胞における PRC2 構成因子の発現量を図 3b と同じデータを用いて調べた。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) (c) 正常肺組織と小細胞肺がん組織における PRC2 構成因子の発現量を図 3c と同じデータを用いて調べた。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

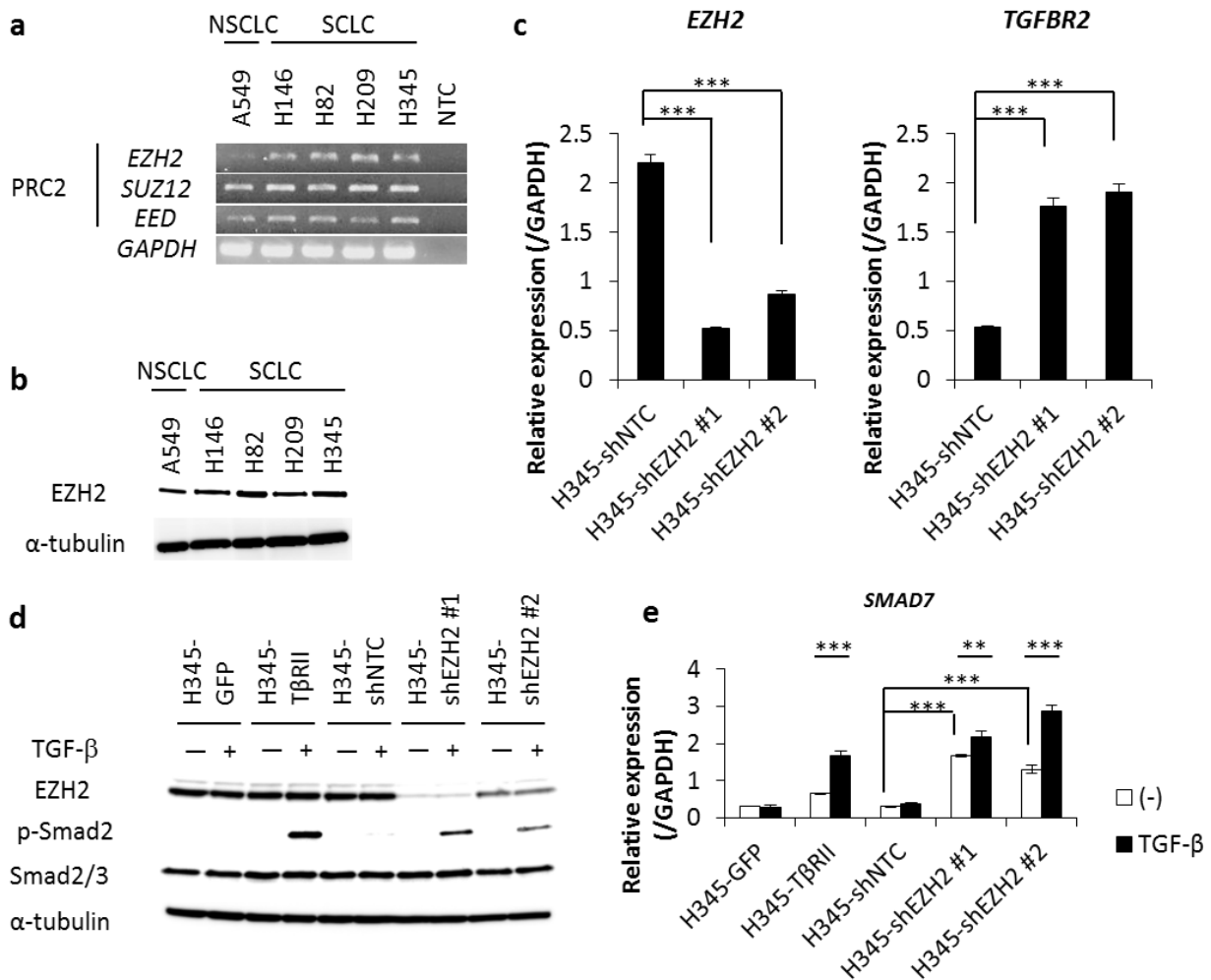


図 8 EZH2 は小細胞肺癌細胞に高発現し、T β RII の発現を抑制している。
(a) 小細胞肺癌細胞と A549 細胞における PRC2 構成因子の発現量を semi-qRT-PCR で評価した。**(b)** 図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。**(c)** H345 細胞に lentivirus vector を用いて control shRNA (H345-shNTC) もしくは EZH2 shRNA (H345-shEZH2) を強制発現させた。H345-shNTC 細胞と H345-shEZH2 細胞における TGFBR2 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) **(d)** H345-shNTC 細胞と H345-shEZH2 細胞を TGF- β で 2 時間刺激した。図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞はそれぞれ negative control ならびに positive control として用いた。**(e)** H345-shNTC 細胞と H345-shEZH2 細胞を TGF- β で 4 時間刺激した。SMAD7 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞はそれぞれ negative control ならびに positive control として用いた。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

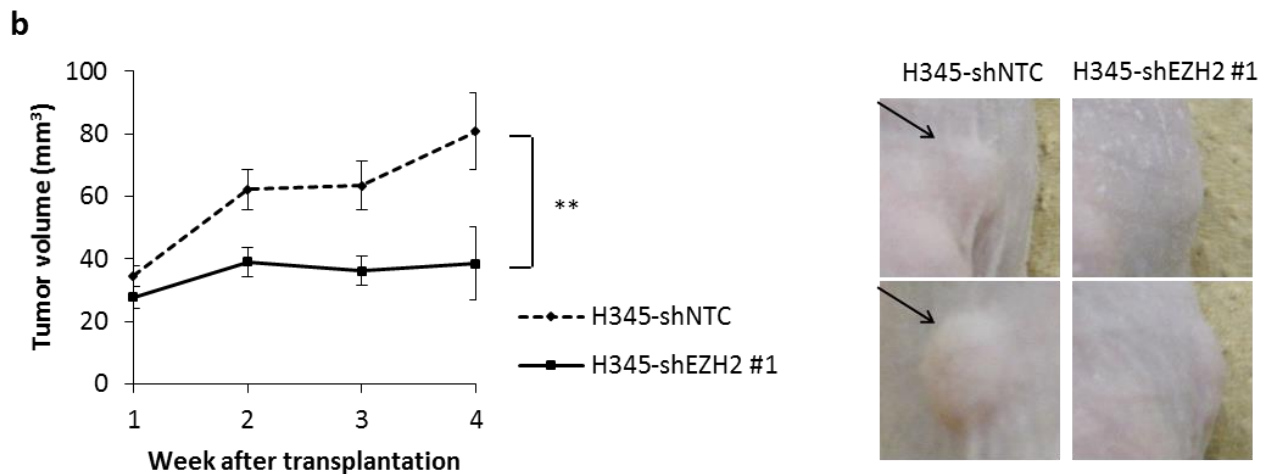
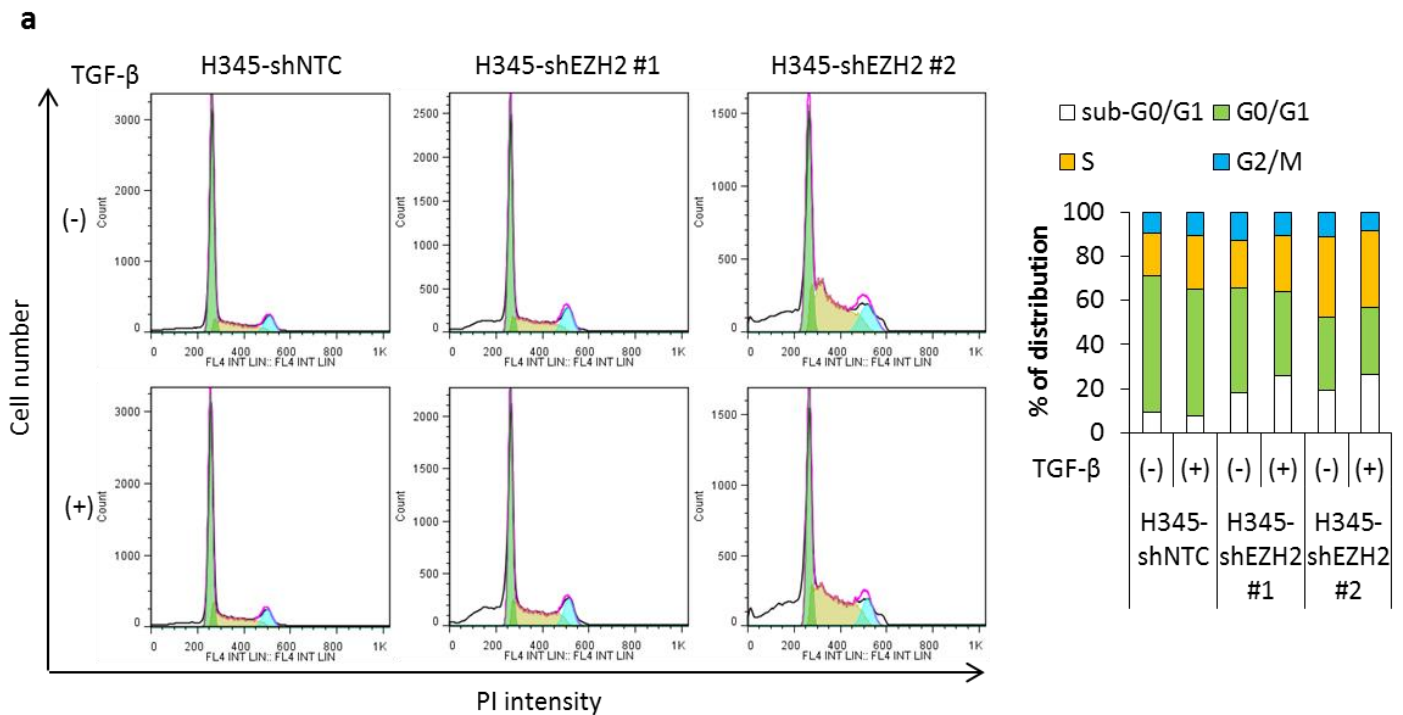
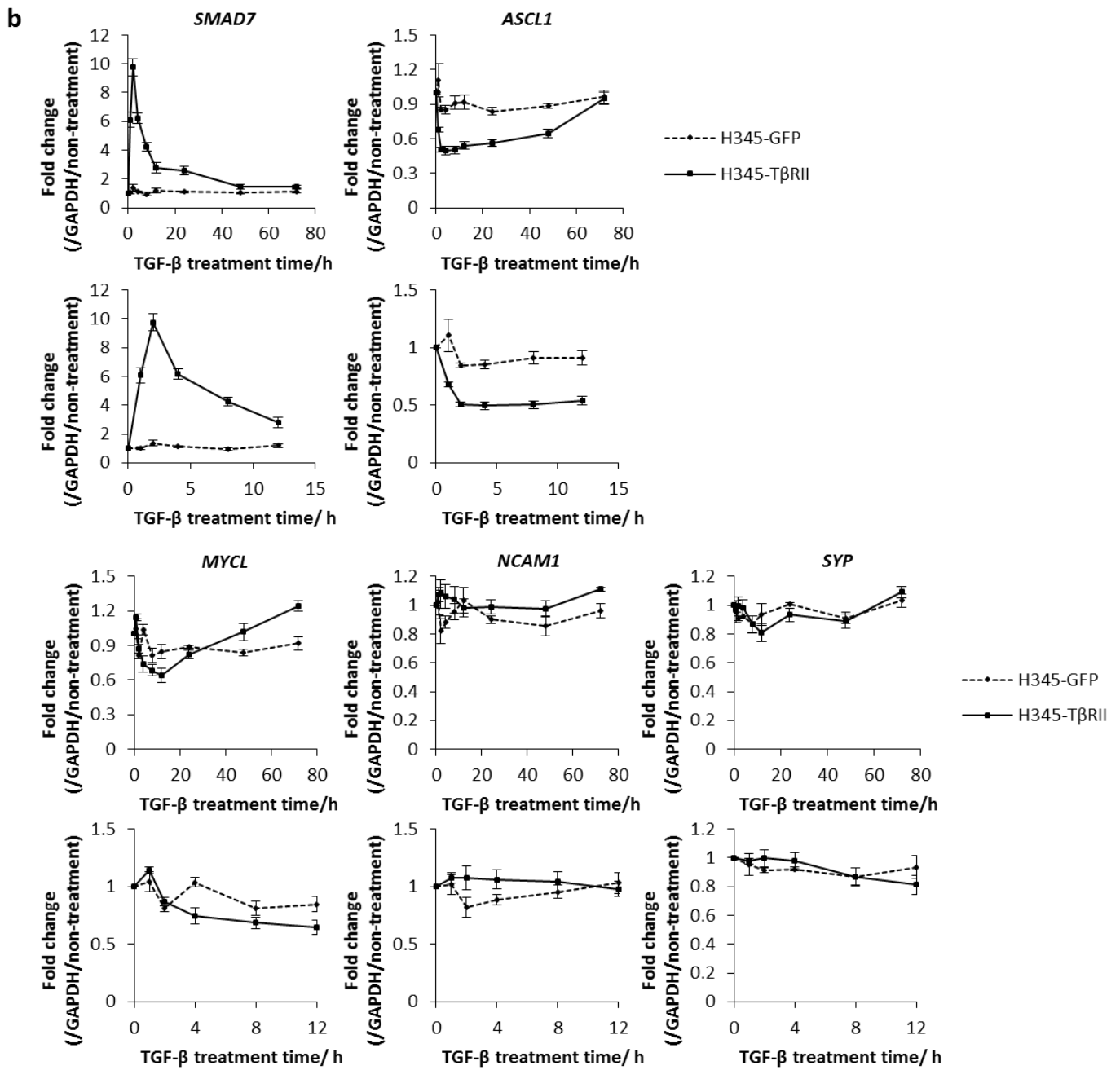
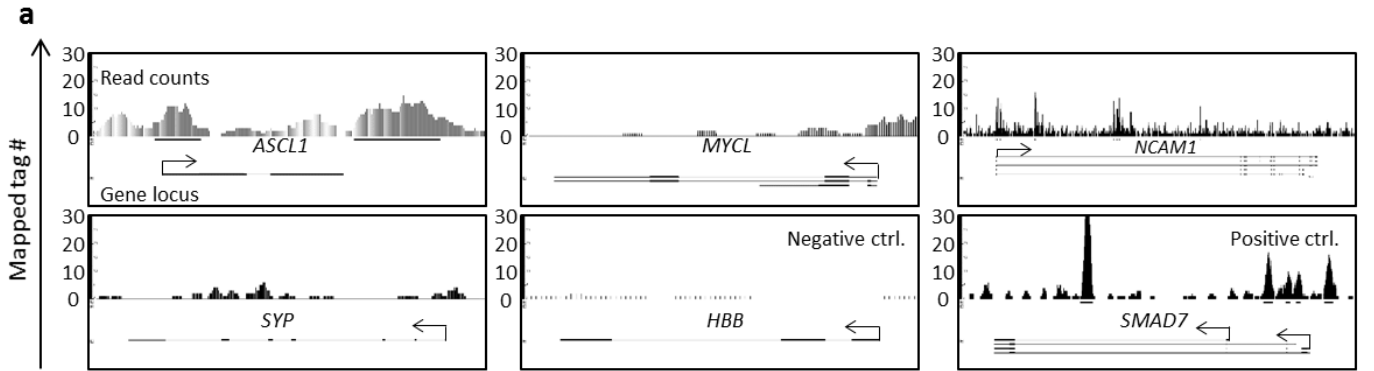


図9 EZH2 の knockdown により *in vitro* において TGF- β による apoptosis が誘導され、*in vivo* において腫瘍形成能が抑制される。

(a) H345-shNTC 細胞と H345-shEZH2 細胞を TGF- β で 12 日間刺激し、細胞周期解析を行った。sub-G0/G1、G0/G1 期、S 期、G2/M 期を histograms で示す (左)。各々のステージにいる細胞の割合を示す (右)。(b) BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に H345-shNTC 細胞 ($n = 7$) または H345-shEZH2 #1 細胞 ($n = 7$) を移植し、腫瘍体積を図中に示す時間に測定した。結果は平均値 \pm SEM を表す (左)。矢印は腫瘍を示し、H345-shEZH2 #1 細胞を移植した一部のマウスでは腫瘍形成能が低下し、また一部のマウスでは腫瘍が退縮していた。 (**, $P < 0.01$)



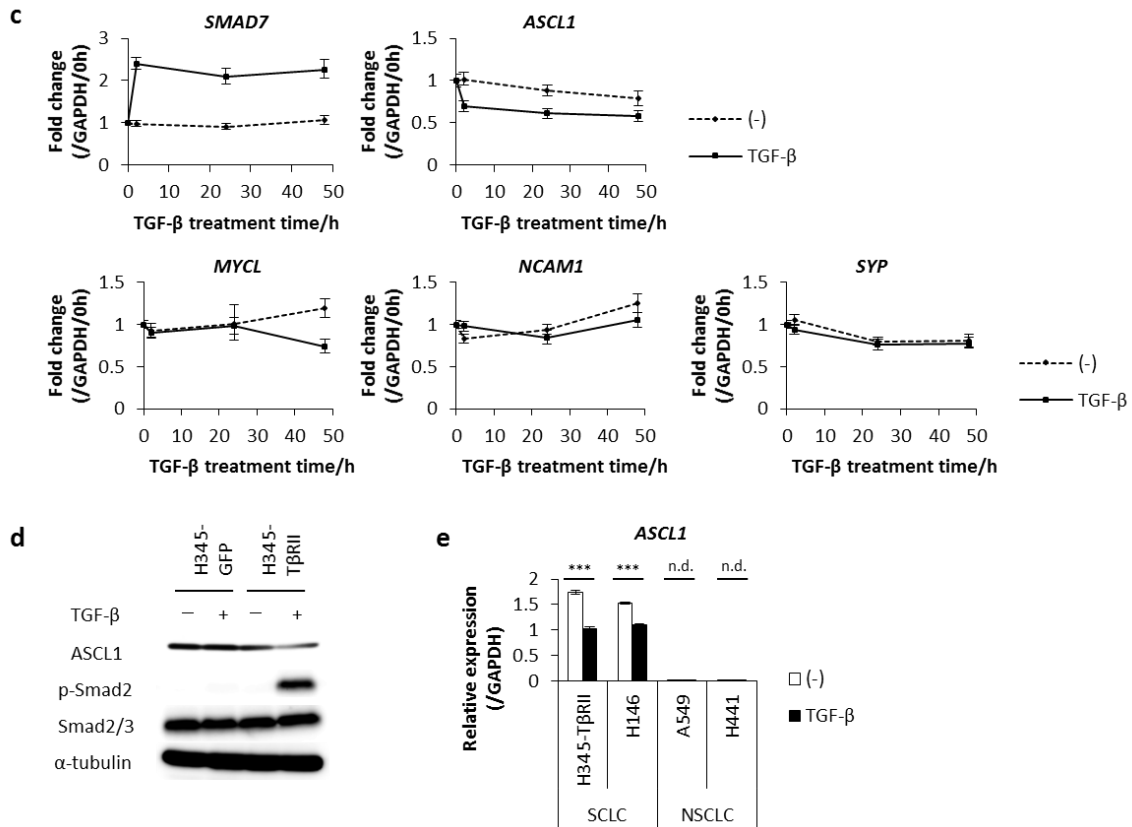


図 10 小細胞肺癌細胞における ASCL1 の発現量は TGF-βシグナルの活性化により低下する。

(a) H345-TBRII 細胞を TGF-βで 1.5 時間刺激し、genomic DNA を抗 Smad2/3 抗体で免疫沈降した後に ChIP-seq を行った。縦軸は DNA fragment の mapped tag numbers を示す。矢印は各遺伝子の転写開始点を表す。(b) H345-GFP 細胞と H345-TBRII 細胞に TGF-βを図中に示す時間刺激した。それぞれの神経内分泌関連遺伝子 (ASCL1、MYCL、NCAM1、SYP) と SMAD7 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。また、TGF-βを 0 時間から 12 時間まで刺激したときの拡大図を下段に示す。結果は平均値 ± SD を表す。(c) H146 細胞に TGF-βを図中に示す時間刺激した。それぞれの神経内分泌関連遺伝子 (ASCL1、MYCL、NCAM1、SYP) と SMAD7 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 ± SD を表す。(d) H345-GFP 細胞と H345-TBRII 細胞を TGF-βで 12 日間刺激した。図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。(e) 小細胞肺癌細胞 (H345-TBRII 細胞と H146 細胞) と非小細胞肺癌細胞 (A549 細胞と H441 細胞) を TGF-βで 4 時間刺激した。ASCL1 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 ± SD を表す。(***, $P < 0.001$; n.d., not detected.)

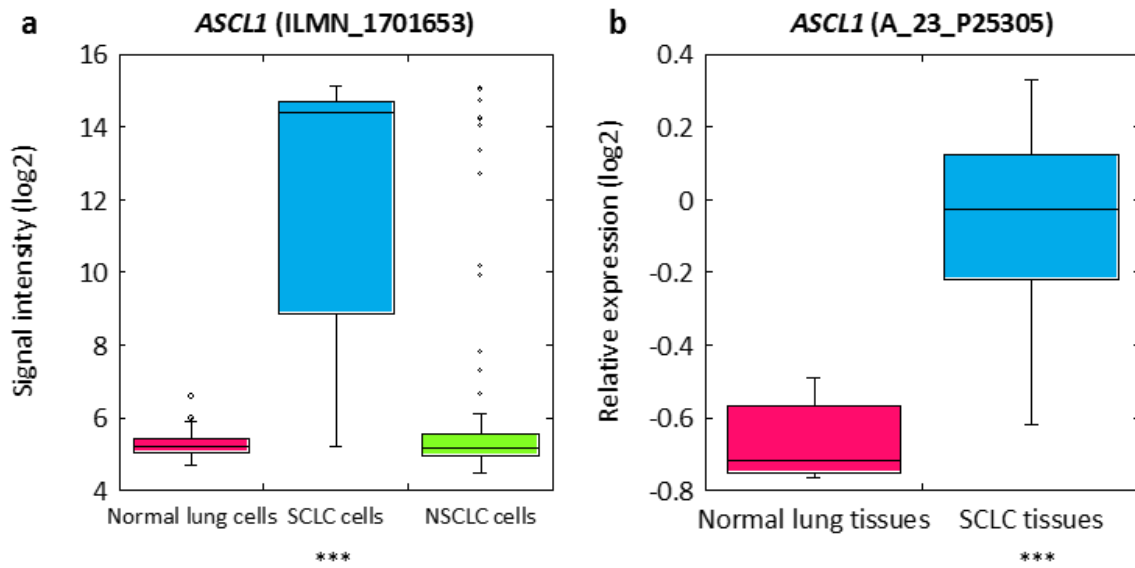


図 11 *ASCL1* の発現量は小細胞肺がんにおいて高発現している。

(a) 正常肺上皮細胞と肺がん細胞における *ASCL1* の発現量を図 3b と同じデータを用いて調べた。(***, $P < 0.001$) (b) 正常肺組織と小細胞肺がん組織における *ASCL1* の発現量を図 3c と同じデータを用いて調べた。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

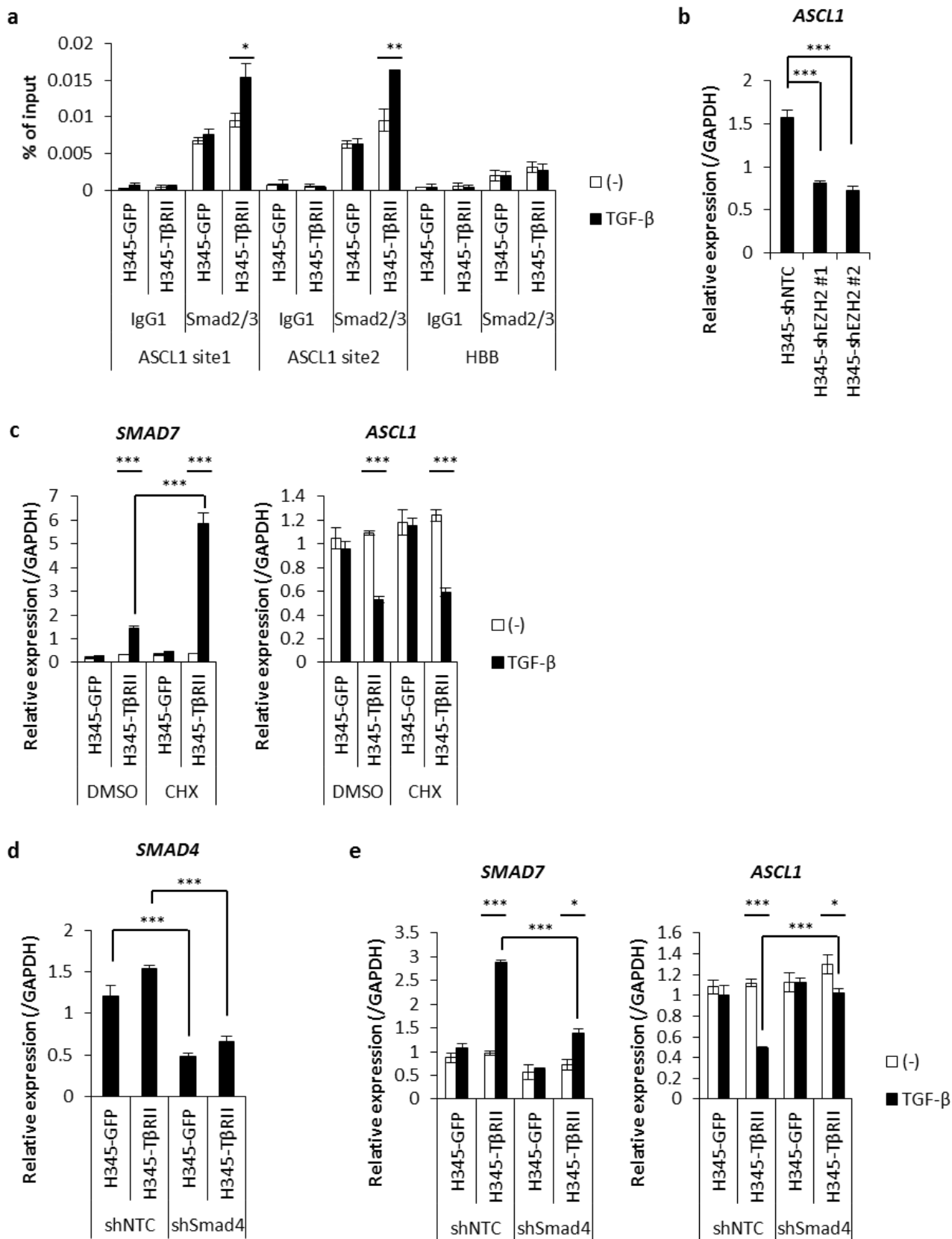
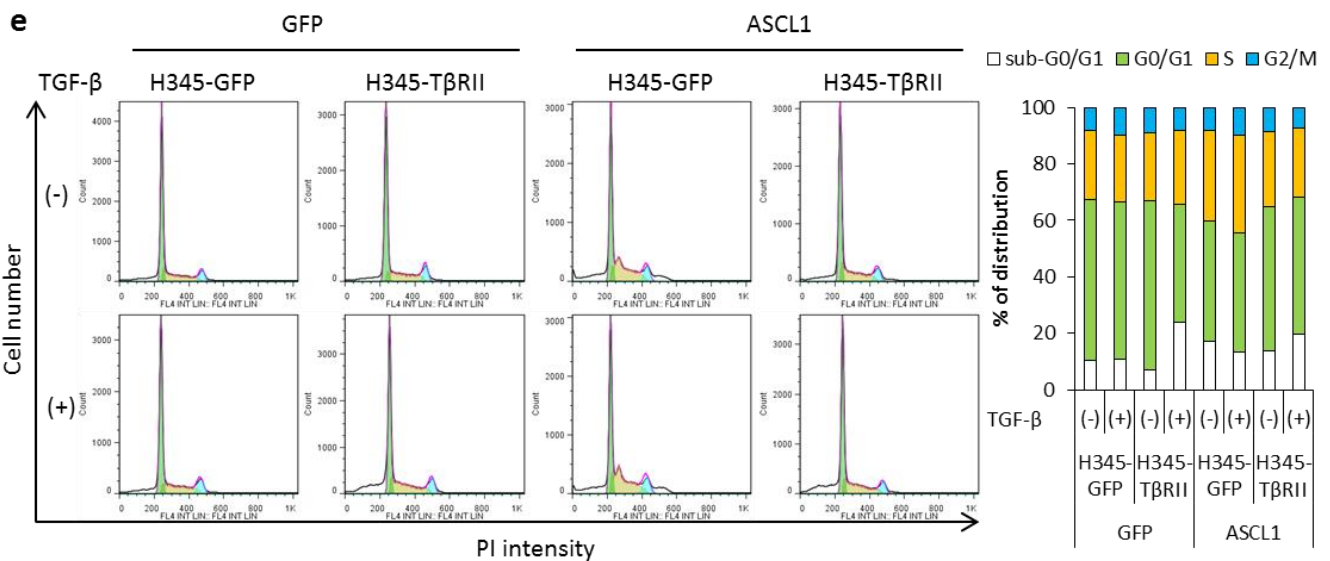
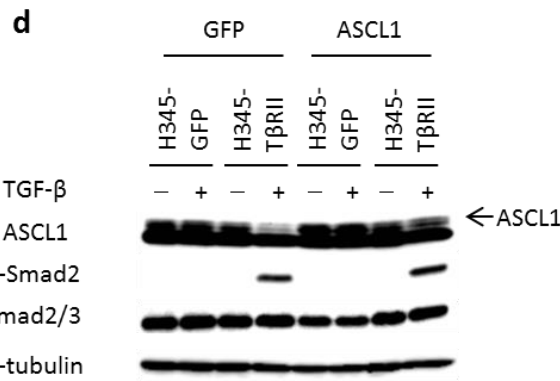
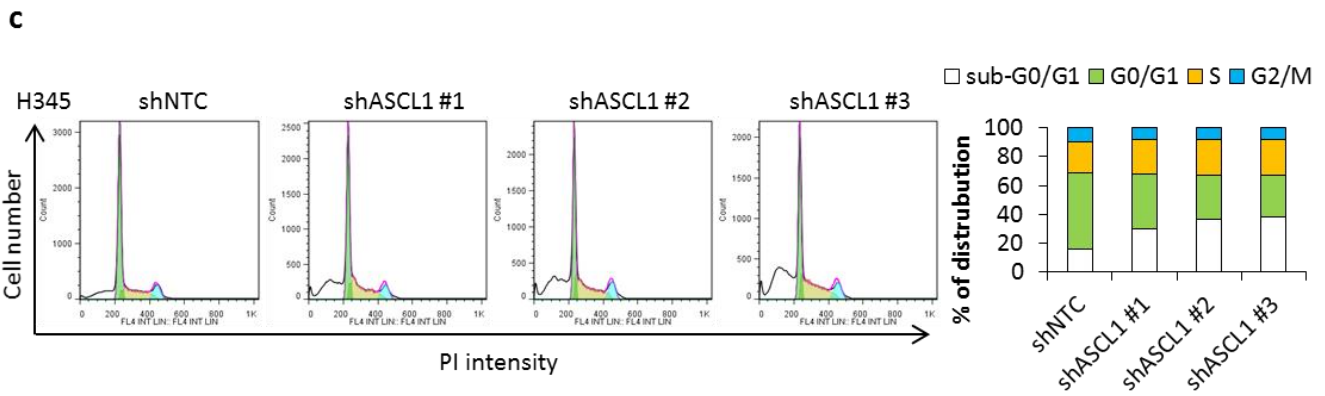
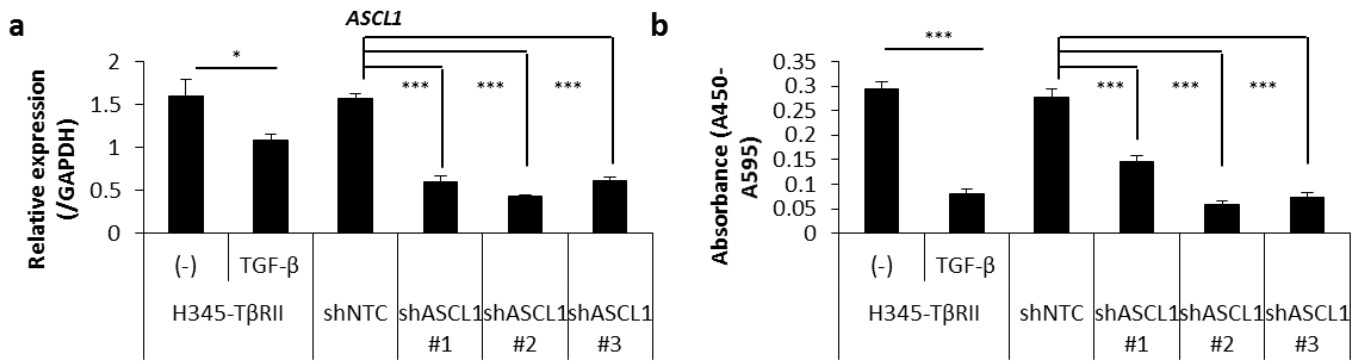


図 12 ASCL1 は TGF- β シグナルの活性化により直接的に Smad 依存的な経路で制御される。

(a) H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞を TGF- β で 1.5 時間刺激し、抗 Smad2/3 抗体で免疫沈降した。ASCL1 遺伝子上での Smad2/3 の enrichment を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。ASCL1 site1 と ASCL1 site 2 はそれぞれ 103351326 – 103352062 bp の領域と 103351326 – 103352062 bp の領域を表す。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$) (b) H345-shNTC 細胞と H345-shEZH2 細胞における ASCL1 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) (c) H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞を CHX (3 μ M)で 24 時間前処理した後に、TGF- β で 4 時間刺激した。SMAD7 と ASCL1 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) (d) H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞に lentivirus vector を用いて control shRNA (shNTC)もしくは Smad4 shRNA (shSmad4)を強制発現させた。SMAD4 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。(e) (d)における細胞を TGF- β で 4 時間刺激し、SMAD7 と ASCL1 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$)



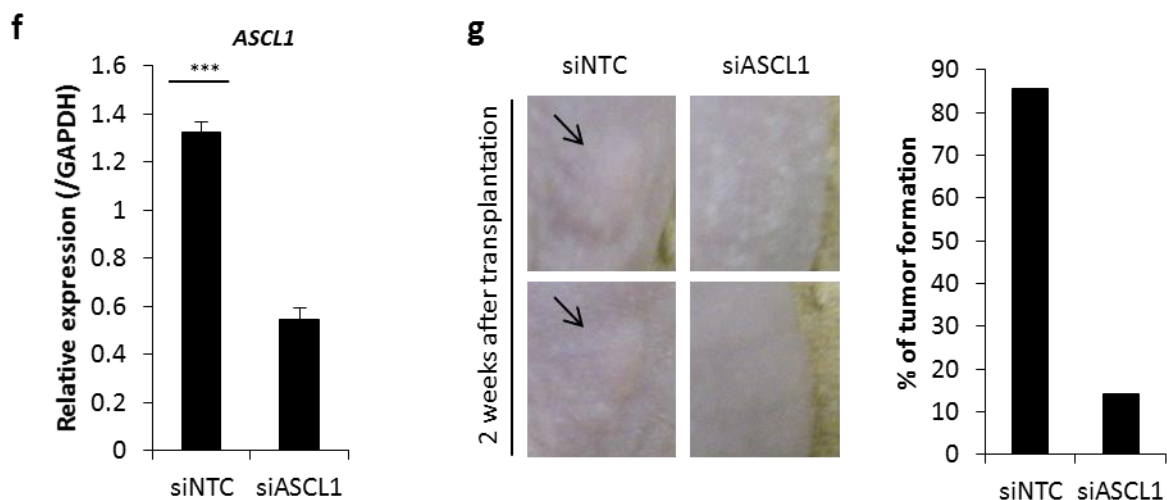


図 13 ASCL1 は TGF- β シグナルの活性化による小細胞肺がんの apoptosis 誘導に重要である。

(a) H345 細胞に lentivirus vector を用いて control shRNA (shNTC) もしくは ASCL1 shRNA (shASCL1) を強制発現させた。ASCL1 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。H345-T β RII 細胞は TGF- β で 48 時間刺激し control として用いた。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) (b) (a) における細胞を 12 日間培養し細胞増殖試験を行った。H345-T β RII 細胞は TGF- β で 12 日間刺激し、positive control として用いた。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) (c) (a) における細胞を 12 日間培養し細胞周期解析を行った。sub-G0/G1、G0/G1 期、S 期、G2/M 期を histograms で示す (左)。各々のステージにいる細胞の割合を示す (右)。(d) H345-GFP 細胞と H345-T β RII 細胞に lentivirus vector を用いて GFP もしくは ASCL1 を強制発現させた。これらの細胞を TGF- β で 12 日間培養した。図中に示した抗体と細胞溶解液を用いた Western blot を行った。(e) (d) の細胞において細胞周期解析を行った。sub-G0/G1、G0/G1 期、S 期、G2/M 期を histograms で示す (左)。各々のステージにいる細胞の割合を示す (右)。(f) H345 細胞に control siRNA (siNTC) もしくは ASCL1 siRNA (siASCL1) で処理した。ASCL1 mRNA の発現量を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm SD を表す。(***, $P < 0.001$) (g) BALB/c nu/nu マウスの皮下に (f) の細胞 (siNTC, $n = 7$, siASCL1, $n = 7$) を移植した。矢印は腫瘍を表す (左)。また、各々の細胞に対する腫瘍形成率を右に示す。

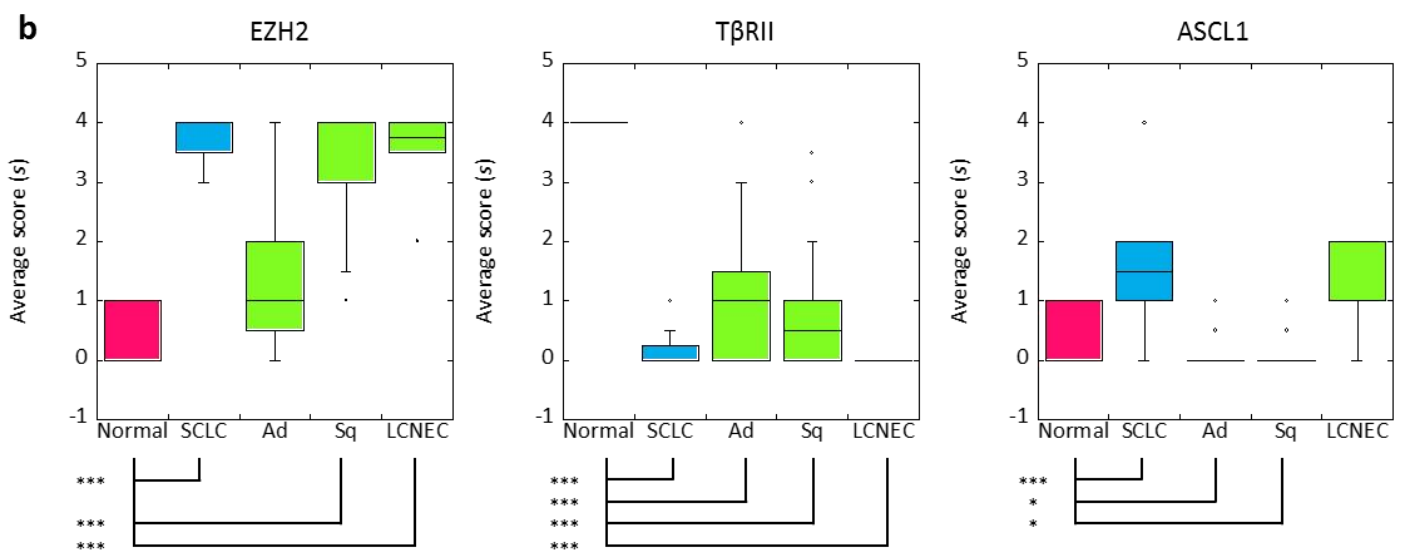
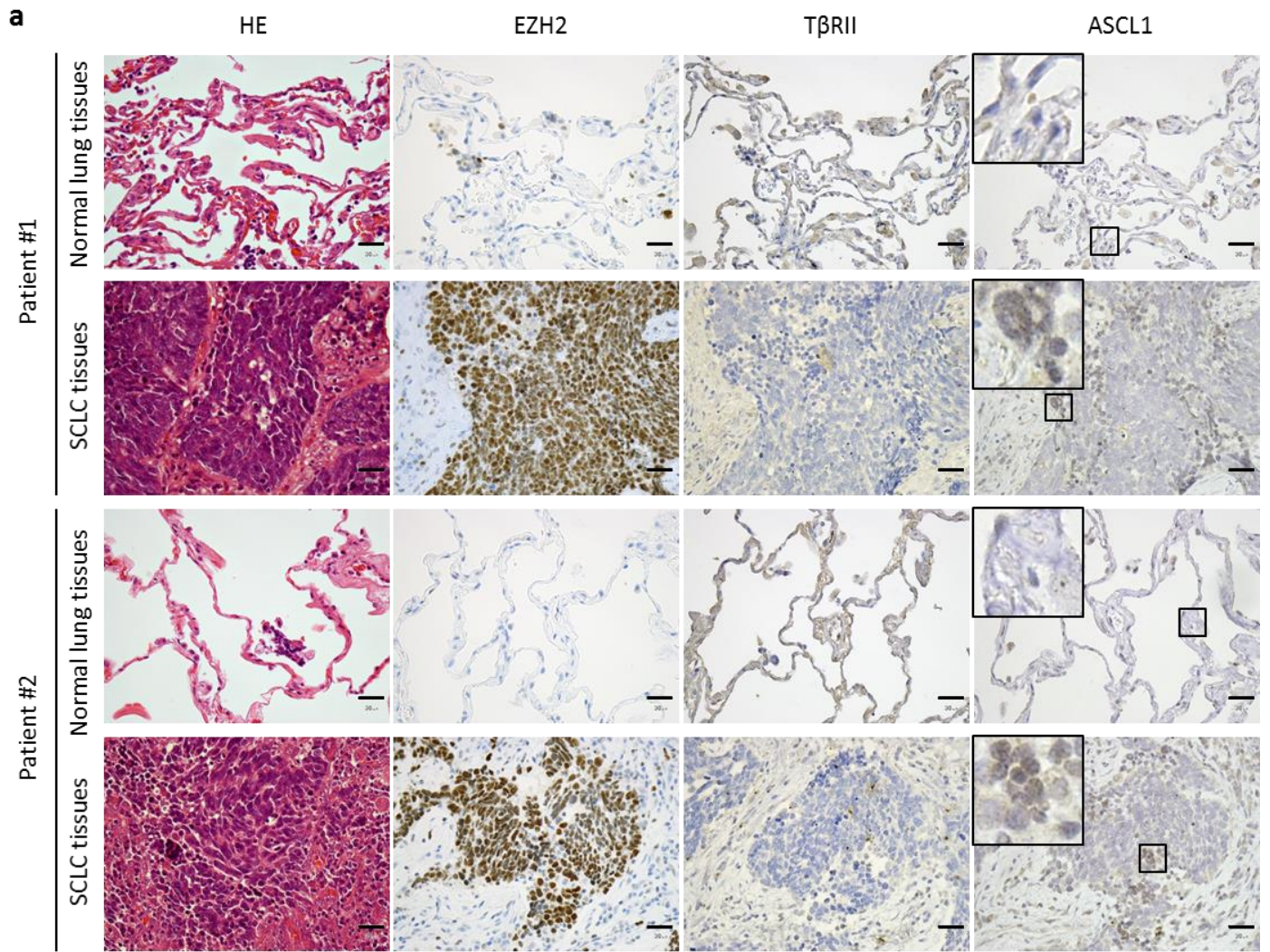


図 14 ヒト正常肺組織と肺がん組織における EZH2 と TβRII と ASCL1 の発現プロファイル

(a) 同じ患者由来の正常肺組織と小細胞肺がん組織を hematoxylin-eosin (HE) ならびに抗 EZH2 抗体と抗 TβRII 抗体と抗 ASCL1 抗体で染色した。代表的な染色画像を示すと共に、ASCL1 の染色像については点線部分の拡大写真も示した (inner frame)。Scale bars は 30 μm を示す。(b) (a) と 図 15 における発現プロファイルを陽性細胞数 (f) に応じて点数化 (s) した。 s と f の関係は $80 \leq f \leq 100, s = 4$; $50 \leq f < 80, s = 3$; $20 \leq f < 50, s = 2$; $0 < f < 20, s = 1$; $f = 0, s = 0$ である。Normal は正常肺、SCLC は小細胞肺がん、Ad は腺がん、Sq は扁平上皮がん、LCNEC は大細胞神経内分泌がんである。(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$)

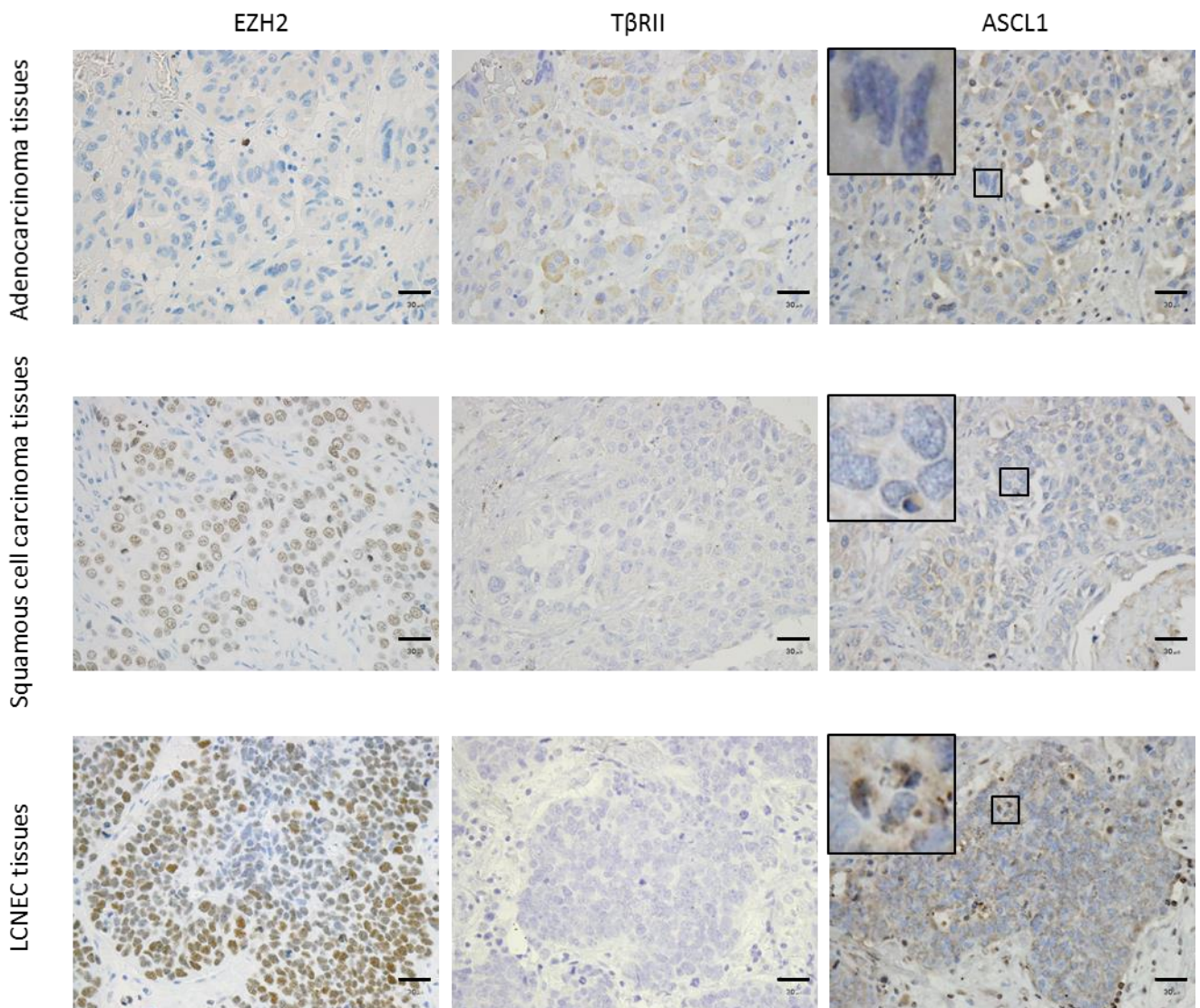


図 15 様々な組織型のヒト肺がん組織における EZH2 と TβRII と ASCL1 の発現
 肺がん組織のうち腺がん、扁平上皮がん、大細胞神経内分泌がんを抗 EZH2 抗体と抗 TβRII 抗体と抗 ASCL1 抗体で染色した。代表的な染色画像を示すと共に、ASCL1 の染色像については点線部分の拡大写真も示した (inner frame)。Scale bars は 30 μm を示す。

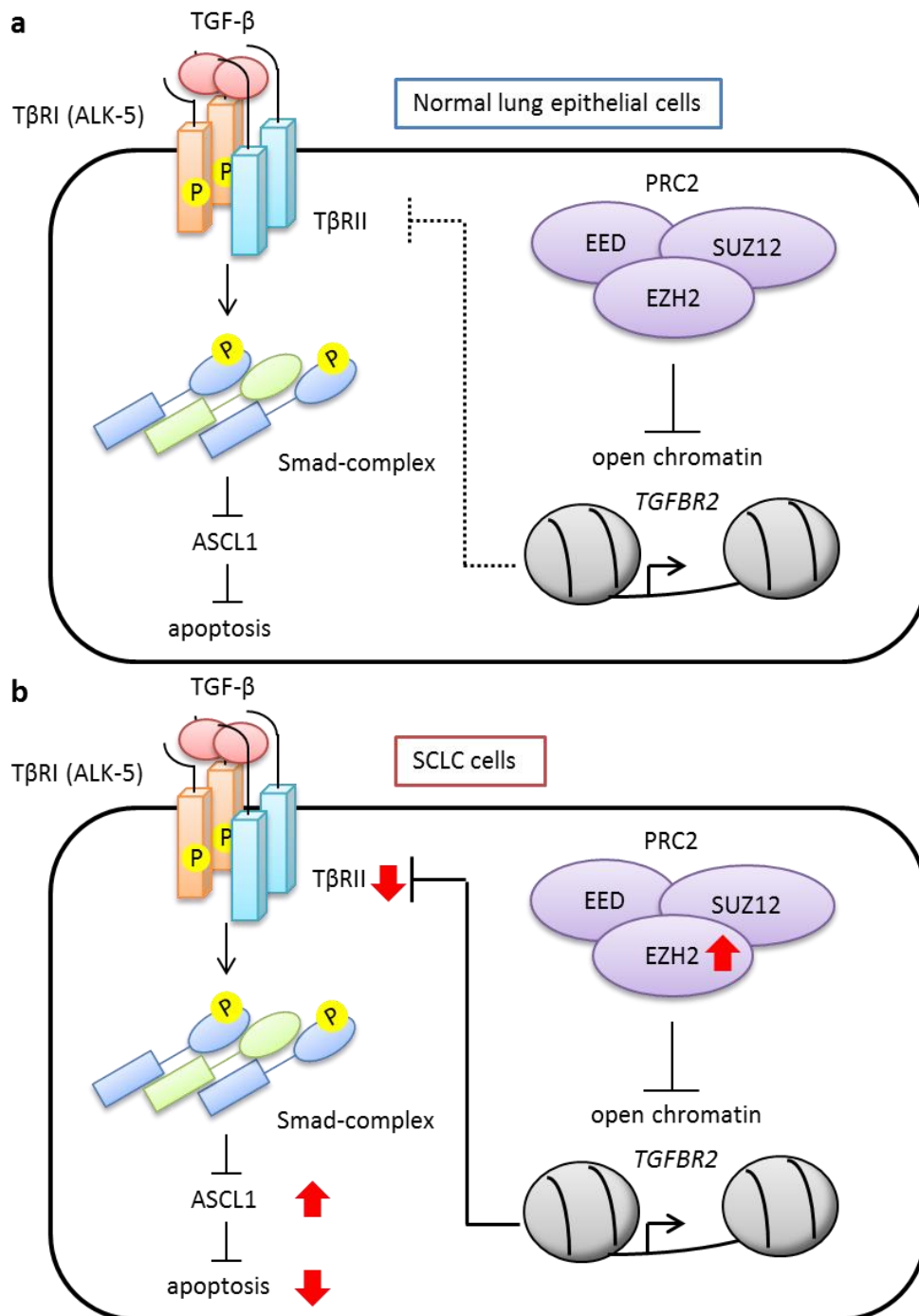


図 16 小細胞肺癌における TGF-βによる腫瘍抑制メカニズムの破綻

(a) 正常肺上皮細胞では、TGF-βは直接的に Smad 依存的な経路を介して、ASCL1 の発現を抑制させ apoptosis を誘導する。(b) 小細胞肺癌細胞では、EZH2 が高発現し TβRII の発現が抑制される。これにより TGF-βシグナルが遮断され、ASCL1 の発現量が高く維持されるため、小細胞肺癌細胞では apoptosis が阻害され小細胞肺癌の進展に寄与している。

表 1 qRT-PCR に用いた primer

Gene	Orientation	Sequences (5' to 3')
<i>ASCL1</i>	Forward	TCTTACGACCCGCTCAGCCCC
	Reverse	AGGTTGTGCGATCACCCCTGCTT
<i>CDC25A</i>	Forward	GCCTGTCACCAACCTGAC
	Reverse	CCAGGAGAATCTAGACAGAAACC
<i>CDKN1A</i>	Forward	AGTGGACAGCGAGCAGCTGA
	Reverse	CGAAGTTCCATCGCTCACGG
<i>CDKN2B</i>	Forward	CCGCCACAACGACTTTATT
	Reverse	CAGCCTTCATCGAATTAGGTG
<i>EZH2</i>	Forward	TCATGCAACACCCAACACTT
	Reverse	GCTCCCTCAAATGCTGGTA
<i>GAPDH</i>	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>MYC</i>	Forward	CCACACATCAGCACAACACTACGC
	Reverse	CGGTTGTTGCTGATCTGTCTCA
<i>MYCL</i>	Forward	GAGCGAGGGAGCGGACATGGA
	Reverse	GCGCCGTGGAGCGGTAGAAAT
<i>NCAM1</i>	Forward	GTGCGTAGCCATGCCCGTGT
	Reverse	GCCCTGTAGCTTTGGGGCATATTG
<i>SMAD4</i>	Forward	AAAACGGCCATCTTCAGCAC
	Reverse	AGGCCAGTAATGTCCGGGA
<i>SMAD7</i>	Forward	CTGCAGACTGTCCAGATGCTGTG
	Reverse	GGCTCCAGAAGAAGTTGGGAATCTGA
<i>SYP</i>	Forward	GCCGCCAGACAGGGAACACA
	Reverse	CAGGAAGCCGAACACCACCGA
<i>TGFBR2</i>	Forward	GCTGTATGGAGAAAGAATGACGA
	Reverse	CATGAAGAAAGTCTCACCAGGC

表 2 semi-qRT-PCR に用いた primer

Gene	Orientation	Sequences (5' to 3')
<i>ACVR2A</i>	Forward	GCAAAATGAATACGAAGTCTA
	Reverse	GCACCCTCTAATACCTCTGGA
<i>ACVR2B</i>	Forward	ACACGGGAGTGCATCTACTACAACG
	Reverse	TTCATGAGCTGGGCCTTCCAGA
<i>BMPR2</i>	Forward	CTGCACAGTGTGCTGAGGAAAG
	Reverse	TGAACTGCCCTGTTACTGCCA
<i>EED</i>	Forward	TGGAGACGAGAATGATGACGCT
	Reverse	TTGCCACCAGAGTGTCCGTC
<i>EZH2</i>	Forward	TCATGCAACACCCAACACTT
	Reverse	CCACAACCGGTGTTTCCTCT
<i>GAPDH</i>	Forward	GTCGGAGTCAACGGATTTGGT
	Reverse	TTCTCATGGTTCACACCCATG
<i>SMAD2</i>	Forward	CCCATCGAAAAGGATTGCCACA
	Reverse	TGCATGGAAGGTTTCTCCAACC
<i>SMAD3</i>	Forward	GGACGACTACAGCCATTCCA
	Reverse	TTCCGATGTGTCTCCGTGTCA
<i>SMAD4</i>	Forward	CTTTGAAATGGATGTTTCAG
	Reverse	CATCCTGATAAGGTTAAGGG
<i>SUZ12</i>	Forward	TCATAGCTTGTGAGCTCATTTCG
	Reverse	GCAGCCTCTTCCCATCAAGA
<i>TGFBR1</i>	Forward	TCGCCCTTTTATTTTCAGAGGGTACT
	Reverse	ACAGCAAGTTCATTCTTCTTACC
<i>TGFBR2</i>	Forward	TCACCTCCATCTGTGAGAAG
	Reverse	CTGAAGTGTCTGCTTCAGC

表 3 Western blot に用いた抗体

1 次抗体	2 次抗体
抗 Phospho-Smad2 抗体 (Ser465/467) #3108 (Cell Signaling, 1:500)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 Smad2/3 抗体 #610843 (BD pharmingen, 1:1000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 TβRII 抗体 #sc-17792 (Santa Cruz, 1:100)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 pRB 抗体 #554136 (BD Pharmingen, 1:1000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 PARP 抗体 #9542 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 EZH2 抗体 #5246 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 ASCL1 抗体 # ab74065 (Abcam, 1:900)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗α-tubulin 抗体 # T6199 (Sigma Aldrich, 1:10000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)

表 4 shRNA 作成に用いた oligonucleotide

shRNA	Orientation	Sequences (5' to 3')
shNTC	Sense	GATCCCCGCGCGCTTTGTAGGATTCGACGTGTGCTGTCCGT CGAATCCTACAAAGCGCGCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGCGCGCTTTGTAGGATTCGACGGACA GCACACGTCTGAATCCTACAAAGCGCGCGGG
shASCL1 #1	Sense	GATCCCCGAAAGCTCTGCCAAGATGACGTGTGCTGTCCGT CATCTTGGCAGAGCTTTCCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGGAAAGCTCTGCCAAGATGACGGAC AGCACACGTCTCTTGGCAGAGCTTTCGGG
shASCL1 #2	Sense	GATCCCCGCTATTACCTCTGCATATTACGTGTGCTGTCCGTA ATATGCAGAGGTAATAGCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGCTATTACCTCTGCATATTACGGACA GCACACGTAATATGCAGAGGTAATAGCGGG
shASCL1 #3	Sense	GATCCCCGAGAGACATGGCTTTCAGAACGTGTGCTGTCCGT TCTGAAAGCCATGTCTCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGAGAGACATGGCTTTCAGAACGGAC AGCACACGTTCTGAAAGCCATGTCTCTCGGG
shEZH2 #1	Sense	GATCCCCGGGAGAGAACAATGATAAAACGTGTGCTGTCCG TTTTATCATTGTTCTCTCCCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGGGAGAGAACAATGATAAAACGGAC AGCACACGTTTTATCATTGTTCTCTCCCGGG
shEZH2 #2	Sense	GATCCCCGCACTTACTATGACAATTTACGTGTGCTGTCCGT AAATTGTCATAGTAAGTGCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGCACTTACTATGACAATTTACGGACA GCACACGTAAATTGTCATAGTAAGTGCGGG
shSmad4	Sense	GATCCCCAAGCAATGGAACACCAATACTCAGGGTGTGCTG TCCCCTGAGTATTGGTGTTCATTGCTTTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAAAGCAATGGAACACCAATACTCAGG GGACAGCACACCCTGAGTATTGGTGTTCATTGCTTGGG

表 5 siRNA の配列

Gene	Sequences (5' to 3')
NTC	UGGUUUACAUGUCGACUAA
	UGGUUUACAUGUUUUCUGA
	UGGUUUACAUGUUUCCUA
	UGGUUUACAUGUUGUGUGA
<i>ASCL1</i>	CCAAUAAGCUGUAGACAUU
	CCUGCAUCUUUAGUGCUUU
	CCUACAACUGCAAUUUUC
	CUACCAUUUUCAUUAUAGA

表 6 ChIP-qRT-PCR に用いた primer

Gene	Orientation	Sequences (5' to 3')
<i>ASCL1</i> (site 1)	Forward	TTTAACTTCCGTCAGGGCTCC
	Reverse	AGAACTTGGGTGCAGGAACA
<i>ASCL1</i> (site 2)	Forward	TGTGGTCGCTTTGAGACACT
	Reverse	TTTACACGCAGCTCACGCTA
<i>HBB</i>	Forward	GGGCTGAGGGTTTGAAGTCC
	Reverse	CATGGTGTCTGTTTGAGGTTGC

表 7 免疫組織化学染色に用いた抗体

1 次抗体	2 次抗体
抗 EZH2 抗体 #5246 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, biotinanted 抗体
抗 TβRII 抗体 #ab78419 (Abcam, 1:100)	抗 mouse IgG, biotinanted 抗体
抗 ASCL1 抗体 #ab135273 (Abcam, 1:20)	抗 rabbit IgG, biotinanted 抗体

表 8 転写抑制に関わるヒトの HMT

Position	HMT
H3K9	SUV39H1; SUV39H2; SETDB1; G9a (EHMT2); EHMT1; PRDM2
H3K27	EZH2; EZH1
H4K20	SUV420H1; SUV420H2; SETD8