

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K16440  
研究課題名（和文）新規マスター転写因子ELF3による肺小細胞癌のサブタイプ化とその臨床的意義の解明  
研究課題名（英文）An integrative epigenomic approach identifies ELF3 as an oncogenic regulator in ASCL1-positive neuroendocrine carcinoma  
研究代表者  
堀江 真史（Horie, Masafumi）  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：60732659  
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）：ELF3を高発現するSCLC等の3細胞株を用いて、ATAC-seqによるオープンクロマチン解析、及びCUT&Tagによる網羅的ヒストン修飾解析を行い、ELF3がASCL1型のSCLCにおいてスーパーエンハンサー関連転写因子として機能していることを明らかにした。また抗ELF3特異的抗体を用いたCUT&Tag、及びsiRNAを用いたknockdown RNA-seqを行い、ELF3により制御される234遺伝子を同定した。さらにpathway解析やin vitro実験による検証を行い、ELF3ががん細胞の生存や細胞周期を制御し、悪性化に寄与していることを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

ELF3はASCL1型のSCLCではスーパーエンハンサー関連転写因子として腫瘍促進的な役割を果たすことが示された。ELF3は膀胱癌や十二指腸癌ではがん抑制遺伝子として働いており、がん抑制促進の2面性を持つcontext-dependentな転写因子であることが本研究により明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Using 3 ELF3 high-expression cell lines, we conducted open chromatin analysis by ATAC-seq and comprehensive histone modification analysis by CUT&Tag. We discovered that ELF3 functions as a super-enhancer-associated transcription factor in ASCL1-type small cell lung cancer (SCLC). Furthermore, we performed CUT&Tag using anti-ELF3 antibody and KD-RNA-seq using siRNA to list the target genes of ELF3. Pathway analysis of the ELF3-target genes suggested their involvement in cell survival and the cell cycle, which was confirmed by cell proliferation assays and cell cycle analysis using siRNA.

研究分野：肺小細胞癌

キーワード：ELF3 ATAC-seq CUT&Tag スーパーエンハンサー ASCL1

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌死亡のうち部位別では最多で、全世界で年間 100 万人以上の死因となっている。WHO の組織分類では、肺癌は腺癌・扁平上皮癌・神経内分泌腫瘍・大細胞癌に分類され、神経内分泌腫瘍には肺小細胞癌 (SCLC: small cell lung cancer)・大細胞神経内分泌癌が含まれている。SCLC は肺癌の 10~20%を占め、転移しやすく悪性度の高い予後不良の疾患である。肺腺癌では *EGFR* や *ALK* 遺伝子に対する分子標的治療が臨床応用され、一部の患者では目覚ましい効果を上げている。しかし SCLC の個別化治療は大きく遅れており、約 30 年間にわたって治療法が殆ど進歩していない。

これまでの SCLC 組織のゲノム・トランスクリプトーム解析によって、癌抑制遺伝子である *TP53* と *RB1* の変異が高頻度に見られることに加え、*NOTCH* 関連遺伝子の変異 (約 25%)、*MYC* ファミリーの増幅 (10~20%)、転写コアクチベーター *EP300*・*CREBBP* の変異 (5~15%)、ポリコム抑制複合体 PRC2 の構成因子 (*EZH2*・*SUZ12*) の高発現、などの特徴が明らかになってきた (George et al. *Nature*. 2015.; Umemura et al. *J Thorac Oncol* 2014.; Peifer et al. *Nat Genet*. 2012.; Sato et al. *Sci Rep*. 2013.; Rudin et al. *Nat Genet*. 2012.)。このような知見から、SCLC の病態では転写制御の異常が深く関与していることが示唆されている。

近年になり細胞分化誘導法が著しく進歩し、マスター転写因子の発現誘導によって細胞の分化状態を改変 (リプログラミング) することが実証されている。癌細胞におけるゲノム異常は、転写産物の量的・質的な異常や、遺伝子発現パターンの変化につながり、これが細胞の悪性化へと結びつく。一方で癌細胞においても遺伝子発現はマスター転写因子群によって強く制御されている。肺癌細胞においてもマスター転写因子が lineage addiction oncogene として機能し、driver oncogene とともに、癌細胞の生存に関与しており、腺癌での TTF-1 や扁平上皮癌での SOX2 などが知られている。

SCLC においてもマスター転写因子の発現に基づくサブタイピングが広く受け入れられつつある (Rudin et al. *Nat Rev Cancer*. 2019.)。具体的には

- 1) 古典的なタイプである ASCL1 陽性群
- 2) かつてバリエーションと呼ばれていた NEUROD1 陽性群
- 3) 申請者が発見した YAP1 陽性群 (Horie et al. *Cancer Sci*. 2016)
- 4) 最近報告された Tuft 細胞 (気道上皮細胞のサブタイプ) 由来と想定される POU2F3 陽性群 (Pozo et al. *Genes Dev*. 2018.)

の 4 群である。ASCL1 陽性群が約 7 割程度を占め、他が各々 1 割程度と考えられている。各群が特徴的な遺伝子発現パターンを呈し、薬剤感受性プロファイルも異なることが知られている。近年では ASCL1 陽性群に高発現している DLL3 分子を標的とした治療薬 Rova-T などが開発されている。NEUROD1 陽性群では Aurora kinase 阻害剤の有効性が細胞レベルやマウスモデルで示されている (Mollaoglu et al. *Cancer Cell*. 2017.)。申請者は薬剤感受性スクリーニングデータを活用し、YAP1 陽性群では mTOR 阻害剤や PLK 阻害剤に対して感受性が良好であることを報告した (Horie et al. *Cancer Sci*. 2016.)。

ELF3 は ETS family の一つであり、消化管や肺の上皮組織に発現している。Elf3 ノックアウトマウスは一部胎生致死であり、生存した個体も小腸の構造異常を来し、下痢や栄養不良を呈することが知られている (Ng et al. *Gastroenterology*. 2002.)。気道上皮細胞特異的に Elf3 を欠損させると、気道傷害からの再生遅延が生じることから、Elf3 は気道上皮細胞の分化・増殖に関与していることも示唆されている (Oliver et al. *Lab Invest*. 2011.)。

様々な癌において ELF3 の発現異常や遺伝子変異が知られており、癌の進展との深い関連も示唆されている。食道癌においてはマスター転写因子として oncogenic な役割を果たすとの報告がある (Chen et al. *Gut*. 2019)。十二指腸乳頭癌のゲノム解析では、ELF3 の不活化変異が見い出され、癌抑制遺伝子としての機能も示唆されている (Yachida et al. *Cancer Cell*. 2016)。食道癌・十二指腸乳頭癌・大腸癌・乳癌など報告から、ELF3 は lineage addiction oncogene として癌の生存に関わる一方で、浸潤や転移の抑制に寄与するという二面性を有しており、細胞内シグナルや癌微小環境などのコンテキスト依存性に、癌の分子病態に関与していると想定されている。一方で ELF3 の SCLC における発現や意義については全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では SCLC におけるマスター転写因子 ELF3 に注目し、その機能および転写制御メカニズムの全貌を明らかにし、さらに ELF3 の病的意義やバイオマーカーとしての有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

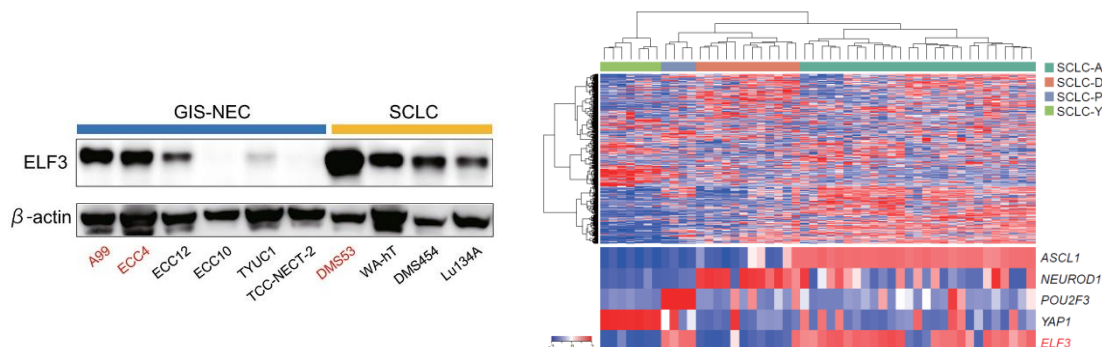
肺小細胞癌細胞 4 株、及び他臓器由来の神経内分泌癌細胞 6 株を用いて ELF3 の発現をウエスタンブロットにより確認した。また Cancer Cell Encyclopedia (CCLE) に登録されている 50 細胞株の RNA-seq データを用いて SCLC の各サブタイプにおける ELF3 の発現を検討した。遺伝子のノックダウン、及びノックアウトは siRNA、及び CRISPR-Cas9 システムを用いて行った。細胞生存は MTT アッセイにより、足場非依存性増殖性は soft agar アッセイにより評価した。オーブ

ンクロマチン解析は ATAC-seq により行い、網羅的ヒストン修飾解析、及びゲノムワイドな ELF3 結合領域同定は特異的抗体を用いた CUT&Tag により行った。

#### 4. 研究成果

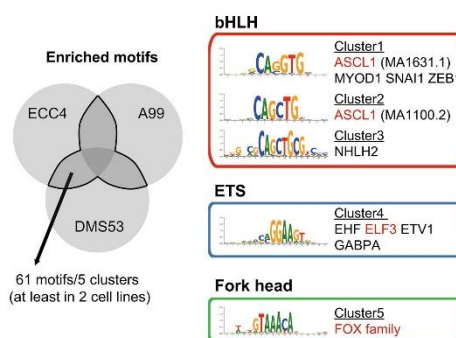
##### (1) SCLC における ELF3 の発現解析

肺小細胞癌細胞株 (DMS53、DMS454、WA-hT、及び Lu134A)、他臓器由来の神経内分泌癌細胞株 (A99、TYUC-1、TCC-NECT-2、ECC4、ECC10、及び ECC12) を用いて ELF3 の発現をウェスタンブロットにより確認したところ、すべての SCLC 細胞株において ELF3 の発現が確認された (下図左)。また Cancer Cell Encyclopedia に登録されている 50 細胞株の RNA-seq を用いてサブグループ毎の ELF3 の発現を検討したところ、ASCL1 型、および POU2F3 型において ELF3 が特異的に発現していることが確認できた (下図右)。



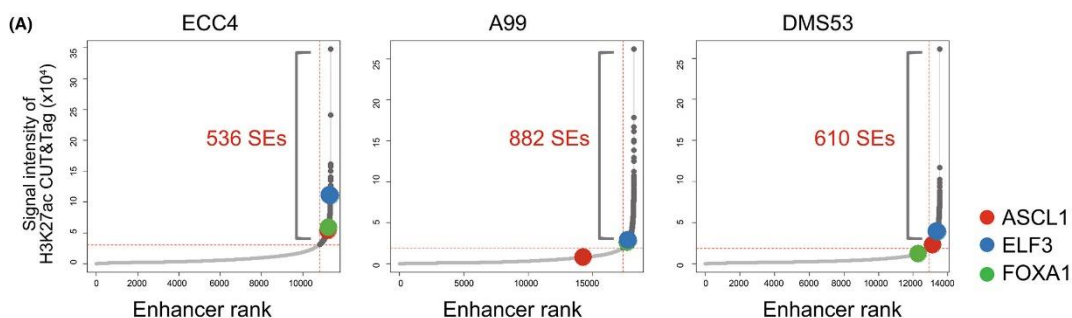
##### (2) ELF3 高発現株におけるオープンクロマチン解析

次に ASCL1 を高発現する DMS53、ECC4、及び A99 の 3 細胞株を用いて ATAC-seq を行い、オープンクロマチン解析を行ったところ、共通する 61 個のモチーフが検出された。さらにモチーフ配列に基づきクラスタリングを行ったところ、5 つのクラスターに分類され、中でも bHLH (ASCL1)、ETS (ELF3)、Fork head (FOXA1) の 3 つのモチーフエンリッチメントが認められ、これらの転写因子が SCLC を含めた神経内分泌癌の転写ネットワーク形成に重要な役割を果たすことが示唆された (右図)。



##### (3) ELF3 高発現株における網羅的ヒストン修飾解析

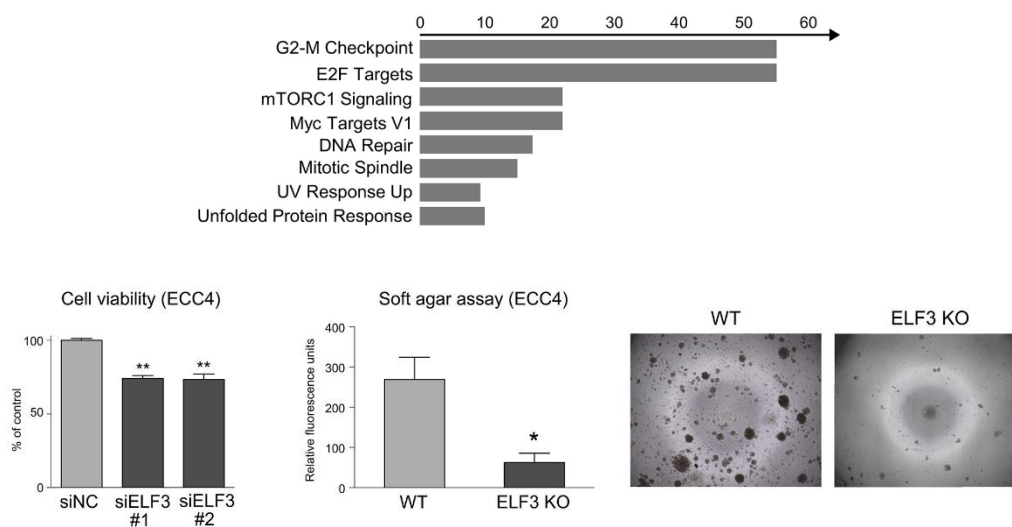
さらに前述の 3 細胞株を用いてエンハンサープロファイルを行った。CUT&Tag とは Cleavage Under Targets and Tagmentation の略で、これまで行われてきた ChIP-seq より、簡便、高感度でシーケンスコストを抑えられる近年注目されている解析手法である。ECC4、A99、および DMS53 に対して H3K27ac 特異的抗体を用いて CUT&Tag を行ったところ、それぞれ 11,776、20,693、及び 14,863 個のエンハンサーを同定した。さらに ROSE を用いて 536、882、及び 610 個のスーパーエンハンサーと呼ばれるエンハンサーの中でも転写因子や転写コアクティベーターが特に密に結合するゲノム領域を同定した (下図)。3 細胞の共通する領域を抽出し、ASCL1、ELF3、及び FOXA1 が SCLC におけるスーパーエンハンサー関連転写因子として同定された。



##### (4) ELF3-regulated genes の同定と機能解析

次に、3 細胞株に対して ELF3 特異的抗体を用いた CUT&Tag、及び ELF3 を標的とした siRNA による knockdown RNA-seq を行った。それぞれのデータを統合し 232 遺伝子から成る ELF3-regulated gene signature を同定することができた。Pathway 解析を行ったところ、細胞周期に関連

する pathway が同定された (下図)。さらに siRNA を用いた細胞生存解析、及び CRISPR-Cas9 による *ELF3* knockout 細胞を用いて soft agar assay を行い、*ELF3* が SCLC において tumor promoting な機能を果たしていることが明らかになった (下図)



<引用文献>

- Horie et al. *Cancer Sci.* 2016;107:1755-1766.  
Horie et al. *J Pathol.* 2018;246:154-165.  
Suzuki et al. *Cancer Res.* 2021;81:489-500.  
Yachida et al. *Cancer Discov.* 2022;12:692-711.  
Horie et al. *Cancer Sci.* 2023;114:2596-2608.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Horie M, Tanaka H, Suzuki M, Sato Y, Takata S, Takai E, Miyashita N, Saito A, Nakatani Y, Yachida S.	4. 巻 114
2. 論文標題 An integrative epigenomic approach identifies ELF3 as an oncogenic regulator in ASCL1-positive neuroendocrine carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2596-2608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15764.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyakawa K, Miyashita N, Horie M, Terasaki Y, Tanaka H, Urushiyama H, Fukuda K, Okabe Y, Ishii T, Kuwahara N, Suzuki HI, Nagase T, Saito A.	4. 巻 113
2. 論文標題 ASCL1 regulates super-enhancer-associated miRNAs to define molecular subtypes of small cell lung cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3932-3946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15481.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yachida S, Totoki Y, Noe M, Nakatani Y, Horie M, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive Genomic Profiling of Neuroendocrine Carcinomas of the Gastrointestinal System.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discov.	6. 最初と最後の頁 692-711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki M, Saito-Adachi M, Arai Y, Fujiwara Y, Takai E, Shibata S, Seki M, Rokutan H, Maeda D, Horie M, Suzuki Y, Shibata T, Kiyono T, Yachida S.	4. 巻 81
2. 論文標題 E74-Like Factor 3 Is a Key Regulator of Epithelial Integrity and Immune Response Genes in Biliary Tract Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 489-500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita N, Horie M, Mikami Y, Urushiyama H, Fukuda K, Miyakawa K, Matsuzaki H, Makita K, Morishita Y, Harada H, Backman M, Lindskog C, Brunnstrom H, Micke P, Nagase T, Saito A.	4. 巻 489
2. 論文標題 ASCL1 promotes tumor progression through cell-autonomous signaling and immune modulation in a subset of lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Lett .	6. 最初と最後の頁 121-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 堀江真史 他	4. 巻 40
2. 論文標題 全ゲノム解析等の網羅的ゲノム解析による膵・消化管神経内分泌腫瘍の病態解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 1237-1246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀江真史 伊藤行信 宮下直也 齋藤朗 前田大地
2. 発表標題 ASCL1型肺小細胞癌におけるエピゲノムの全貌解明
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

〔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
研究協力者	齋藤 朗  (Saito Akira)  (90591412)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	鈴木 雅美  (Suzuki Masami)  (80434182)		
研究協力者	田中 秀憲  (Tanaka Hidenori)  (00804379)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関