

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17192

研究課題名（和文）エピゲノム解析を用いた各種肺癌の分化プログラムの探索

研究課題名（英文）Exploration of differentiation programs in lung cancers using epigenomic profiling

研究代表者

佐藤 崇（Sato, Takashi）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20464836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌の中でも高悪性度神経内分泌腫瘍はとりわけ予後不良である。本研究で我々はエピゲノムプロファイリングを用いて各種肺癌の多様性、特に神経内分泌要素を有する肺癌の神経内分泌分化の多様性を明らかにすることを目的とした。その結果、我々は神経内分泌要素を有する肺癌の異なる分化サブタイプを同定し、これらはこれまで報告された細胞系統転写因子の発現に基づいた分類と異なる可能性が考えられた。ASCL1とNKX2-1の高発現によって規定されるクラシカルな神経内分泌サブタイプは他のサブタイプと比較してより神経内分泌の特徴を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大規模な肺癌ゲノム研究によりシグナル伝達分子に数々の体性遺伝子異常が発見されてきたものの、主に肺腺癌に見つかる遺伝子変化を除けば標的治療の開発に結びついていない。一方、肺癌ゲノム研究を通じて癌細胞が細胞系統転写因子の規定する分化プログラムに依存していることも示されてきた。しかし、大多数の肺癌における分化プログラムを規定する分子機構は未だ見つかっておらず、特に肺癌の中でも予後不良である高悪性度神経内分泌腫瘍の分類と特徴付けは確立していなかった。本研究では肺癌における神経内分泌分化の多様性が既知の報告と異なるパターンであることが示唆され、今後肺癌細胞の可塑性と脆弱性の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：High-grade neuroendocrine tumors of the lung are especially aggressive with a dismal prognosis. In this study, we aimed to elucidate the heterogeneity of neuroendocrine differentiation in lung cancer with neuroendocrine components by using epigenomic profiling. In the result, our epigenomic profiling identified distinct differentiation subtypes of lung cancer with neuroendocrine components, which may be different from the previously reported classifications based on the expression of lineage transcription factors. Classical neuroendocrine subtype determined by high expression of ASCL1 and NKX2-1 is particularly distinct with more neuroendocrine features compared with the other subtypes.

研究分野：胸部腫瘍学

キーワード：エピゲノム 肺癌 super-enhancer 肺大細胞神経内分泌癌 細胞系統因子 転写プログラム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子標的療法、癌免疫療法の導入により肺癌診療は目覚ましい進歩を遂げているが、肺癌は依然本邦の癌死因第一位の予後不良な疾患である。特に進行期肺癌患者の長期予後は厳しく、IV期肺癌患者の5年生存率は4.9%程度である。TCGA等に代表される大規模な肺癌ゲノム研究により、分子標的治療の対象となるシグナル伝達分子に数々の体性遺伝子異常が発見されてきたものの、肺腺癌におけるEGFR遺伝子変異を筆頭とした複数の治療標的を除けば、特にその他の非小細胞肺癌、小細胞肺癌において、標的治療の開発に結びついていない。それ故、将来の治療戦略の向上に資する肺癌のより良い分類と特性評価が求められている。

肺癌ゲノム研究では、遺伝子異常のみならず、肺の発生・分化に重要な働きを持つ転写因子の遺伝子増幅が高頻度で見られることも示されてきた。肺腺癌においてはNKX2-1遺伝子、肺扁平上皮癌ではSOX2遺伝子の増幅がそれぞれ10-15%と高率に認められる。これらの癌の発生母地となる臓器の発生段階でその細胞系統を決定付ける転写因子の遺伝子増幅は、その細胞系統の癌に限定されることが特徴で、癌細胞はこれら細胞系統癌遺伝子(Lineage Oncogene)の規定する転写プログラムに依存していることが示されてきた。

近年、ヒストン修飾の全ゲノム解析が頻繁に行われ、遺伝子発現を制御するcis-制御領域またはエンハンサー領域の中に、それらが突出して密に集中した領域があることが明らかになり、Super-enhancer(SE)とも呼称され注目を浴びている。これらの領域は細胞系統に非常に特異的なパターンを持つため、研究代表者らはこの技術を利用して肺癌細胞における新たな分化プログラムを探索している。各種肺癌細胞株をプロファイルした結果、既知の組織型を分類できるだけでなく、さらなる亜群への分類が可能であることが示唆された。扁平上皮癌においては、扁平上皮細胞系統因子p63とSox2の協調により規定されるclassical subtypeに加え、神経系細胞系統因子Brn2とSox2に制御されるneural subtypeを同定し、異なったシグナリング・パスウェイへの依存性を示すことを明らかにした(図1, Sato et al. *Cancer Res*, 2019)。

しかしながら、一部肺癌における上記した分子機構を除けば、大多数の肺癌における分化プログラムを規定する分子機構は未だ見つかっていない。本研究では同様の手法を用い、解析検体を本来解析の困難であったホルマリン固定パラフィン包埋(formalin fixed paraffin embedded: FFPE)検体まで拡大することで、肺癌の分化プログラムをより明らかにすることを計画した。特に、肺癌のうち約15%を占める神経内分泌分化を示す小細胞肺癌(small cell lung cancer: SCLC)と同様に神経内分泌腫瘍である大細胞神経内分泌癌(large cell neuroendocrine carcinoma: LCNEC)

は、頻度が低いが予後不良であり、臨床検体を用いた分類と特徴付けが確立していないため、大細胞神経内分泌癌の成分を手がかりに肺癌の分化プログラムを探索することとした。

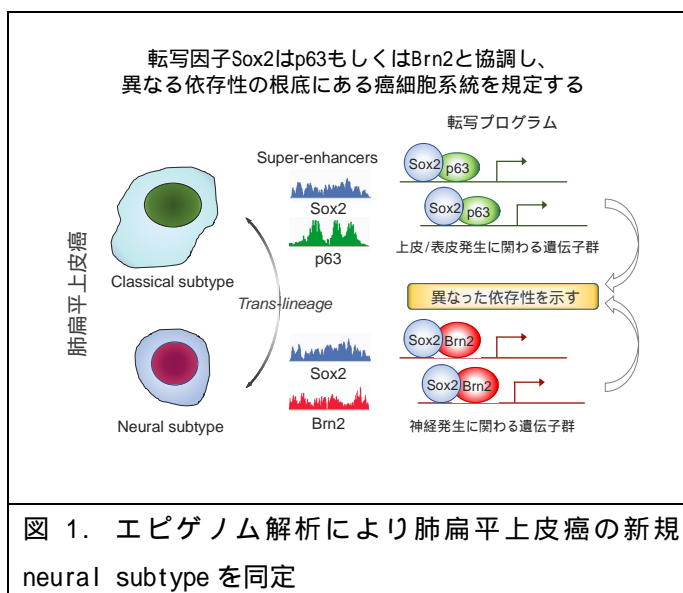


図1. エピゲノム解析により肺扁平上皮癌の新規neural subtypeを同定

2. 研究の目的

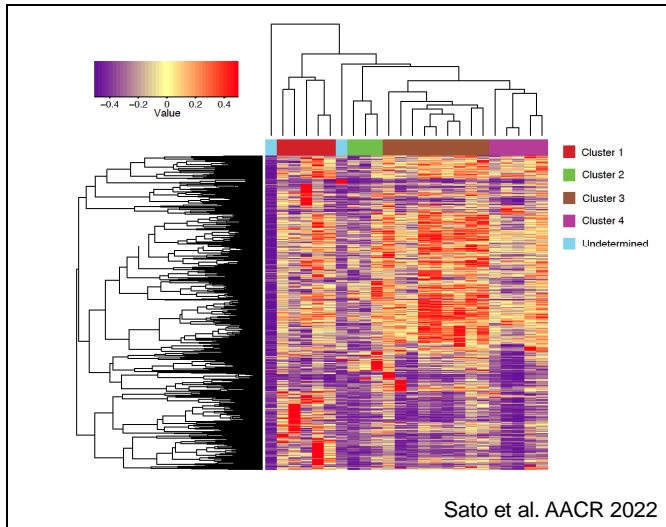
本研究の目的は、ヒト肺癌検体を用いたエピゲノム解析を通じて各種肺癌における分化プログラムを探索することとした。細胞系統あるいは癌細胞の分化状態に特異的な分化プログラムを同定し、その生物学的意義を検討し、その分化プログラムに存在する脆弱性を明らかにすることを目指した。第一に、LCNECの成分を含むヒト肺癌組織検体のエピゲノム解析を行うことにより、肺癌の不均一性をより明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

LCNEC成分を含むヒト肺がんのFFPE組織検体を用いてクロマチン免疫沈降シーケンシング(chromatin immunoprecipitation followed by sequencing: ChIP-seq)による活性型エンハンサーのヒストン修飾(histone 3 lysine 27 acetylation: H3K27ac)解析を行った。混合型の組織型である場合にはマクロダイセクションが可能な組織検体においてはマクロダイセクションを行った。H3K27acシグナルを用いてスーパーエンハンサー解析を行い、転写制御因子近傍のスーパーエンハンサー領域におけるH3K27acシグナルを用いて組織検体の教師なし階層的クラスタリング解析を行った。同じく転写制御因子近傍のスーパーエンハンサー領域におけるH3K27acシグナルを用いた主成分分析にてクラスタリング解析結果を検証した。

また、LCNECと同じく神経内分泌がんに分類される小細胞肺がんにおける神経内分泌細胞系統

因子として知られる ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 および、神経内分泌マーカーである synaptophysin、chromogranin A、CD56、主に肺腺がんにおける細胞系統因子として知られる NKX2-1 の免疫組織染色を行った。さらに、Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific) を用いてゲノムプロファイリングを行った。これらの因子と LCNEC のクラスターサブタイプ分類との関連を調べた。



Sato et al. AACR 2022

図 2. スーパーエンハンサープロファイリングによる LCNEC 成分を含む肺癌のクラスター分類

さらに、LCNEC 成分を含む肺がんにおけるエピゲノム解析によるサブタイプ分類を規定するスーパーエンハンサー領域とその近傍の転写制御因子を抽出した。肺癌細胞株における候補遺伝子についての clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9 (CRISPR-Cas9) システムおよび遺伝子過剰発現を用いて分化プログラムを規定する候補転写制御因子の機能解析を行った。

さらに、LCNEC 成分を含む肺がんにおけるエピゲノム解析によるサブタイプ分類を規定するスーパーエンハンサー領域とその近傍の転写制御因子を抽出した。肺癌細胞株における候補遺伝子についての clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9 (CRISPR-Cas9) システムおよび遺伝子過剰発現を用いて分化プログラムを規定する候補転写制御因子の機能解析を行った。

4. 研究成果

転写制御因子近傍のスーパーエンハンサー領域の H3K27ac シグナルを

用いて LCNEC 成分を含むヒト肺癌の FFPE 組織から得られた計 24 検体の教師なし階層的クラスタリング解析を行った。その結果、肺腫瘍組織は 4 つのクラスターに分類された(図 2)。同様にスーパーエンハンサー領域の H3K27ac シグナルを用いて主成分分析を行ったところ、このクラスター分類は支持され、特にクラスター 1 は dimension 2 によって明瞭に分離された(図 3)。クラスター 2,3,4 は dimension 1 と 2 によって分離されず、dimension 3 によって規定されると考えられた。

転写制御因子近傍のスーパーエンハンサー領域の H3K27ac シグナルを用いて主成分分析を行ったところ、このクラスター分類は支持され、特にクラスター 1 は dimension 2 によって明瞭に分離された(図 3)。クラスター 2,3,4 は dimension 1 と 2 によって分離されず、dimension 3 によって規定されると考えられた。

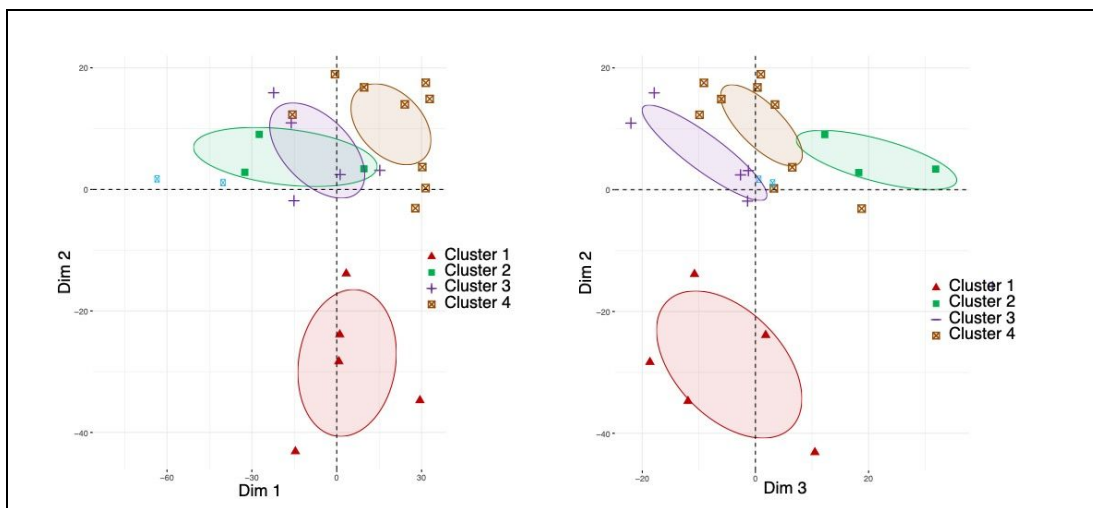


図 3. LCNEC 成分を含む肺がん組織におけるスーパーエンハンサー領域 H3K27ac プロファイルの主成分分析

同検体の包括的ゲノムプロファイリングでは TP53 や RB1 といった遺伝子の異常ステータスとこのクラスタリング分類との関連は検出できなかった(図 4)。一方、免疫組織染色では、クラスター 1 は ASCL1 と NKX2-1 の高発現によって特徴づけられ、synaptophysin、chromogranin A、CD56 がより高率に染色された。クラスター 1 は、より神経内分泌的特徴を有するとりわけ特徴的なクラシカル神経内分泌サブタイプと考えられた。SCLC においては肺癌細胞株のエピゲノム解析により ASCL1 と NKX2-1 によって規定される SCLC -A サブタイプが SCLC-A サブタイプ内に存在することを明らかにし、神経系転写因子である SOX1 が協調して神経細胞系統のアイデンティティを維持していることを見出しており(Kong, Sato, et al. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022)、LCNEC 成分を含む肺癌においても A サブタイプが存在することが示唆された。

その他のクラスターに関しては、SCLC における神経内分泌細胞系統因子として知られる ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 によるエピゲノムサブタイプ、免疫組織染色パターンとの関連は認めなかった。これらのクラスターが神経内分泌癌の分化状態あるいは細胞系統を規定している可能性を考え、特徴的な上位スーパーエンハンサー領域近傍の転写制御因子を抽出し、肺癌細胞株を

用いた CRISPR-Cas9 システムおよび遺伝子過剰発現を用いて候補遺伝子の機能解析を進めている。

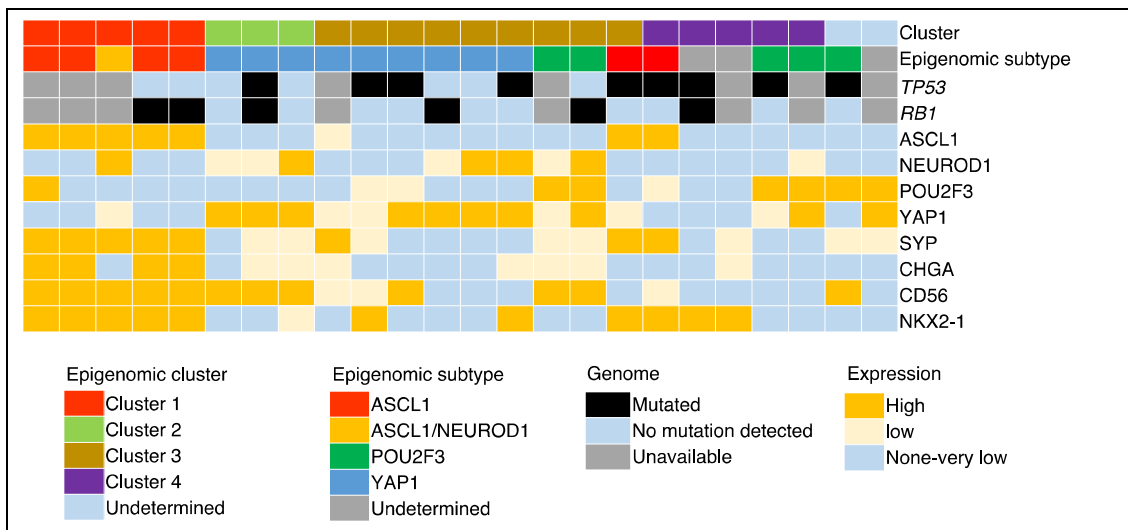


図 4. エピゲノム解析によるクラスター分類とエピゲノムサブタイプ、遺伝子変異ステータス、神経内分泌細胞系統因子・神経内分泌マーカー・NKX2-1 の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ayushi S. Patel, Seungyeul Yoo, Ranran Kong, Takashi Sato, Abhilasha Sinha, Sarah Karam, Li Bao, Maya Fridrikh, Katsura Emoto, German Nudelman, Charles A. Powell, Mary Beth Beasley, Jun Zhu, Hideo Watanabe	4. 巻 7
2. 論文標題 Prototypical oncogene family Myc defines unappreciated distinct lineage states of small cell lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabc2578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc2578	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 Fumimaro Ito, Takashi Sato, Katsura Emoto, Nobuki Kaizuka, Kazuma Yagi, Rinako Watanabe, Mizuha Haraguchi Hashiguchi, Hironori Ninomiya, Yuki Ikematsu, Kentaro Tanaka, Hideharu Domoto, Tetsuya Shiomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Standard therapy-resistant small cell lung cancer showing dynamic transition of neuroendocrine fate during the cancer trajectory: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2021.2423	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 Kong Ranran, Patel Ayushi S., Sato Takashi, Jiang Feng, Yoo Seungyeul, Bao Li, Sinha Abhilasha, Tian Yang, Fridrikh Maya, Liu Shuhui, Feng Jie, He Xijing, Jiang Jiantao, Ma Yuefeng, Grullon Karina, Yang Dawei, Powell Charles A., Beasley Mary Beth, Zhu Jun, Snyder Eric L., Li Shaomin, Watanabe Hideo	4. 巻 206
2. 論文標題 Transcriptional Circuitry of NKX2-1 and SOX1 Defines an Unrecognized Lineage Subtype of Small-Cell Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1164/rccm.202110-23580C	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sato T, Hamamoto J, Emoto K, Fukushima T, Sugihara K, Shirasawa M, Nakahara Y, Igawa S, Murakumo Y, Kohno T, Shiraishi K, Yasuda H, Soejima K, Watanabe H. and Naoki K
2. 発表標題 Epigenomic profiling identifies distinct neuroendocrine subtypes in lung cancer with neuroendocrine differentiation
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kong R, Patel AS, Sato T, Yoo S, Sinha A, Tian Y, Jiang Y, Powell CA, Snyder E, Jiang J, Li S. and Watanabe H
2. 発表標題 Transcriptional circuitry of NKX2-1 and SOX1 defines a previously unrecognized lineage subtype of small cell lung cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤崇
2. 発表標題 学会奨励賞受賞講演 肺癌細胞における分化系統プログラムの不均一性の解明
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤崇
2. 発表標題 肺がんのバイオマーカーとがん細胞の分化系統
3. 学会等名 日本電気泳動学会 第72回総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------