

肺腺がん選択的アイソフォーム発現と特異的
プロモーター活性制御機構の解明

国立研究開発法人 理化学研究所

浅田 健

【研究の背景と目的】

肺がんには人種差があることが知られており、日本人の肺がん研究には日本人データセットを活用した解析が望ましい。申請者が外来研究員として所属する国立がん研究センター（国がん）では世界最大規模の肺がんデータベースを構築している。申請者はこれまでに日本人肺がんデータセットを利用して、複数の重要な発見を報告している（【参考論文】を参照）。本研究ではこれまでに実施してきたマルチオミックス解析をさらに発展させて、特に疾患特異的プロモーターusage とエンハンサーusage に注目して解析をすすめ、新たな分子機構の解明を本研究課題とした。具体的にはトランスクリプトームデータを遺伝子レベル（gene-wise）からアイソフォームレベル（isoform-wise）に細分化することで、（1）肺腺がんの本態解明につながる分子メカニズムの解明、（2）精緻な患者層別化、（3）新規創薬標的探索の3つを研究目的として研究を行った。

【方法】

1. **本研究に利用した解析データ**：国がんに格納されているゲノム（WGS および WES）、エピゲノム（ChIP-seq および DNA メチル化）、トランスクリプトーム（RNA-seq）、および付随する臨床情報を本研究に利用した。
2. **肺腺がん特異的なプロモーター活性の同定**：2019年に報告された proActiv パッケージを本解析で利用した（Cell. 2019 Sep 5;178(6):1465-1477.e17）。
3. **肺腺がん特異的なアイソフォーム同定**：kallisto（Nature Biotechnology. 2016 May;34(5):525-7）を用いてショートリード RNA-seq からのアイソフォーム発現解析を行なった。
4. **アイソフォーム発現と患者予後の関係性解明**：肺腺がん患者の臨床情報から、生存時間分析（全生存期間）を行なった（Kaplan-Meier 法）。
5. **新規分子メカニズムの解明**：同定した肺腺がん特異的なアイソフォームを中心に、マルチオミックス解析を実施し、肺腺がんの詳細な分子メカニズム解明を目的に研究を行った。

【結果】

肺腺がん特異的プロモーター活性の同定：非腫瘍部と腫瘍部とのプロモーター解析からエピジェネティックな制御機構に関わるヒストン脱アセチル化酵素 9 (HDAC9) のプロモーター活性が異なることを見出した。具体的には非腫瘍部ではプロモーター4 (P4) の活性が高く、腫瘍部ではプロモーター8 (P8) の高活性が明らかとなった。ショートリード RNA-seq を用いたアイソフォーム発現解析からは、P8 由来の HDAC9 アイソフォーム 10 の発現が同定された。

プロモーター活性と患者予後：同定された HDAC9 のプロモーター活性に応じて高活性群と低活性群の 2 群間にわけ、生存時間分析を行なった。P4 高活性群は P4 低活性群に比べて、予後良好であった。一方で P8 高活性群では P8 低活性群と比べて、予後不良であった。

エピジェネティックな制御機構：HDAC9 のプロモーター領域で非腫瘍および腫瘍間で異なる DNA メチル化が見出された。特に P4 領域では非腫瘍サンプルにおいて低メチル化、P8 領域では腫瘍サンプルにて低メチル化であった。本研究にて DNA メチル化とアイソフォーム発現の関連が明らかとなった。また ChIP-seq 解析からは P8 高発現群、つまりアイソフォーム 10 高発現群において高 H3K27ac 化が同定された。

分子メカニズムの解明：パスウェイ解析からは Epidermal development, Epidermal cell differentiation, Keratinocyte differentiation, Keratinization, Wound healing などのパスウェイが関わっていることが明らかとなった。また GSEA 解析からは Cellular nitrogen compound biosynthetic process, Nucleobase-containing compound metabolic process, Cellular nitrogen compound metabolic process など、メタボリズムに関わるパスウェイが同定された。

がんフェノタイプ：HDAC9 アイソフォーム 10 が特異的に発現している肺腺がん細胞 H441 を用いて阻害実験を行なったところ、アイソフォーム 10 を特異的に阻害することで細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。

ゲノム変異とプロモーター活性：EGFR 変異あり、KRAS 変異あり、ドライバー変異なし、の 3 群間で HDAC9 アイソフォーム 10 の発現解析を行なったところ、P8 の活性およびアイソフォーム発現いずれも KRAS 変異症例で有意に上昇していることが明らかとなった。P8 領

域には多数の転写因子結合領域が存在し、その中でも GATA6 の結合が *KRAS* 変異症例で上昇している可能性が示唆された。

【考察】

アイソフォームレベルで遺伝子発現解析を行うことで、*HDAC9* P8 に起因するアイソフォーム 10 の発現に応じて患者生存予後が異なることを明らかにした。なお *HDAC9* 遺伝子の発現レベルは非腫瘍部と腫瘍部との間で差はないため、アイソフォームレベルで解析することにより初めて見出された成果である。つまりがん特異的プロモーター活性に基づくアイソフォーム発現を考慮することで、肺腺がん患者の層別化および予後予測が可能であることが明らかとなった。またアイソフォーム発現は DNA メチル化やヒストンアセチル化によるエピジェネティックな作用によって制御されていることが明らかとなった。なお紙面の都合上詳細は割愛するが、ゲノム変異に起因する *de novo* スプライシングバリエントは見出されなかったため、日本人肺腺がんにおける *HDAC9* アイソフォームの発現はプロモーター活性由来と考えられた。今後はなぜがん化に伴い P4 の低下と P8 の活性上昇が引き起こされるのかというプロモータスイッチングの詳細なメカニズム解明につなげていく予定である。

【今後の展望】

NGS 解析および AI 解析の進展から新規知見が数多く見出されている。統合マルチオミックス解析ではゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム情報や病理画像情報を用いた解析を行うことが主流であるが、本研究ではプロモーター活性とアイソフォーム活性に着目することで、新規バイオマーカーおよび創薬標的を見出すことができた。本解析パイプラインは他のがん種にも適用可能であるため、アイソフォーム発現解析と創薬標的探索は、今後のホットスポットになる可能性があると考えている。

末筆ではありますが、がん振興財団にご援助いただきまして、研究が大きく進展いたしました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

【参考論文】

*: co-first author (筆頭著者)、 #: co-correspondence author (責任著者)

1. **Asada K***[#], (24 more authors), Hamamoto R. **Mol Cancer**. 2024 Sep 2;23(1):182. **IF = 27.7**

2. Kaneko S*, Takasawa K*, **Asada K***, (27 more authors), Hamamoto R. **Mol Cancer**. 2024 Jun 11;23(1):126. **IF = 27.7**

3. Takasawa K*, **Asada K***, (18 more authors), Hamamoto R. **Exp Mol Med**. 2024 Mar;56(3):646-655. **IF = 9.5**