

学位論文抄録

Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology

(Ascl1によって発現が誘導された Wnt11 は、小細胞肺癌において神経内分泌分化や腫瘍細胞の増殖、E-カドヘリンの発現制御を行う)

天神 佑紀

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻呼吸器内科学

指導教員

坂上 拓郎 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻呼吸器内科学

伊藤 隆明 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻機能病理学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: The involvement of WNT signaling in human lung cancer remains unclear. This study investigated the role of Achaete-Scute Complex Homolog 1 (ASCL1) and WNT11 in neuroendocrine (NE) differentiation, cell proliferation, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human small-cell lung cancer (SCLC).

Methods: ASCL1 is known as a lineage specific oncogene of human SCLC, which regulate NE differentiation, tumorigenesis and EMT. Based on the previous studies of SCLC, I focused on WNT11 as a putative target molecule of ASCL1 and a novel candidate for anticancer therapy. To examine the expression patterns of ASCL1 and WNT11, I performed immunohistochemical (IHC) staining of surgically resected lung cancer tissues and western blotting analysis for lung cancer cell lines. To clarify the mechanisms of WNT11 expression, I conducted chromatin immunoprecipitation assays. Furthermore, to investigate the biological effects of ASCL1 and WNT11 in lung cancer cell lines, I performed gene-transfection or knockdown experiments using plasmid vector or RNAi interference.

Results: IHC staining of resected specimens showed that WNT11 was expressed at higher levels in SCLCs than in non-SCLCs; 58.8% of SCLC, 5.2% of adenocarcinoma (ADC), and 23.5% of squamous cell carcinoma tissues stained positive for WNT11. A positive relationship was observed between ASCL1 and WNT11 expression in SCLC cell lines, and this was supported by transcriptome data from SCLC tissue. The expression of WNT11 and some NE markers increased after the transfection of *ASCL1* into the A549 ADC cell line. Knockdown of ASCL1 downregulated WNT11 expression in SCLC cell lines. ASCL1 regulated WNT11 expression via lysine H3K27 acetylation at the enhancer region of the *WNT11* gene. WNT11 controlled NE differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression under the regulation of ASCL1 in SCLC cell lines. The phosphorylation of AKT and p38 mitogen-activated protein kinase markedly increased after transfection of *WNT11* into the SBC3 SCLC cell line, which suggests that WNT11 promotes cell proliferation in SCLC cell lines.

Conclusions: ASCL1 plays an important role in regulating the WNT signaling pathway and is one of the driver molecules of WNT11 in human SCLC. ASCL1 and WNT11 may employ a cooperative mechanism to control the biology of SCLC. The present results indicate the therapeutic potential of targeting the ASCL1-WNT11 signaling axis and support the clinical utility of WNT11 as a biological marker in SCLC.

学位論文抄録

[目的] WNT シグナルのヒト肺癌への影響は未だ不明な点が多い。今回の研究では、小細胞肺癌において Achaete-Scute Complex Homolog 1(ASCL1)と WNT11 が神経内分泌分化や腫瘍細胞増殖、上皮間葉転換に果たす役割を検証した。

[方法] ASCL1 はヒト小細胞肺癌の系統特異的な発癌遺伝子であり、神経内分泌分化や腫瘍形成、上皮間葉転換を制御することが知られている。小細胞肺癌に関連した過去の研究結果に基づいて、私は ASCL1 の標的として推定され、抗癌治療の新たな有望な分子と考えられた WNT11 に注目した。ASCL1 と WNT11 の発現パターンを検証する為に、外科切除肺癌組織を用いて免疫組織化学染色で解析を行い、肺癌細胞株を用いてウエスタンブロッティングで解析を行った。WNT11 の発現制御機構を明らかにする為に、クロマチン免疫沈降アッセイを行った。更に、ASCL1 や WNT11 の小細胞肺癌における生物学的役割を検証する為に、肺癌細胞株を用いてプラスミドベクターによる遺伝子導入実験や、RNA 干渉 (si RNA) によるノックダウン実験を行った。

[結果] 外科切除肺癌組織を用いた免疫組織化学染色の結果、WNT11 の発現レベルは小細胞肺癌の方が非小細胞肺癌よりも高かった。小細胞癌 58.8%、腺癌 5.2%、扁平上皮癌 23.5%が WNT11 陽性であった。小細胞肺癌株では ASCL1 と WNT11 の発現には正の相関関係が認められ、小細胞肺癌組織を用いたトランスクリプトーム解析の結果も同様であった。ASCL1 遺伝子を A549 肺腺癌株に導入した結果、WNT11 やいくつかの神経内分泌分化マーカーの発現増加を認めた。小細胞肺癌株で ASCL1 の発現を抑制した結果、WNT11 の発現が低下した。ASCL1 は WNT11 遺伝子のエンハンサー領域でヒストン H3K27 のアセチル化を介して WNT11 の発現を制御していることが分かった。WNT11 は小細胞肺癌株では ASCL1 の制御下において神経内分泌分化や腫瘍細胞増殖、E-カドヘリンの発現を制御していることが分かった。SBC3 小細胞肺癌株に WNT11 遺伝子を導入した結果、AKT や P38 のリン酸化が強く亢進し、WNT11 は小細胞肺癌株では腫瘍細胞の増殖を促進することが示唆された。

[考察] 小細胞肺癌において、WNT11 からのシグナルを介した神経内分泌分化や E-カドヘリンの発現制御機構の詳細は未だ不明な点もあるが、特異的な機能を有するレセプターの存在や non-canonical カスケードなどが関与している可能性が考えられる。

[結論] ヒト小細胞肺癌において ASCL1 は WNT シグナル伝達経路を制御する重要な転写因子であり、WNT11 のドライバー分子の一つである。ASCL1 と WNT11 が協調した機構によって小細胞肺癌の生物学は制御されている可能性がある。今回の研究の結果により、小細胞肺癌において ASCL1-WNT11 シグナル軸は将来有望な治療標的となり、更に WNT11 は生物学的マーカーとして臨床的に意義がある可能性が示された。