

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20917

研究課題名(和文) 肺がんにおけるRNA編集の異常に着目した個別化医療の確立

研究課題名(英文) RNA editing in non-small cell lung cancer

## 研究代表者

渡邊 広祐 (Watanabe, Kousuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50644291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの変異はがんの発生・進展に重要な役割を果たすが、RNA編集もがんに寄与する可能性がある。ヒトで最も一般的なRNA編集はアデノシンからイノシンへの編集で、がんにおけるmRNAのRNA編集については報告があるが、miRNAについては十分な検討がなく、非小細胞肺がんにおいてRNA編集を受けるmiRNAを探索することとした。肺腺がんのNGSデータ解析によりmiR-200b, 381におけるRNA編集の増加と、miR-99a, 379, 411, 497におけるRNA編集の減少を同定した。肺がん手術検体の解析ではmiR-99aのRNA編集低下は術後再発のバイオマーカーとなることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Genetic mutations play important roles in cancer development and progression, but RNA editing also alters RNA sequence and may contribute to cancer biology. The most prevalent form of RNA editing in human is Adenosine to Inosine editing (A to I editing) mediated by ADAR1 and ADAR2. Recent study has shown altered editing levels of protein coding genes in cancer, but RNA editing of miRNAs have not been studied in detail. The purpose of the study is to identify miRNAs that undergo A to I editing in non-small cell lung cancer (NSCLC). Using the publicly available small RNA sequencing data of lung adenocarcinoma, we identified gain of editing in miR-200b and miR-381 and loss of editing in miR-99a, miR-379, miR-411, and miR-497. We analyzed the editing levels of miR-99a in 50 cases of surgically resected NSCLC, and loss of editing was observed in 19 cases. The loss of miR-99a editing was associated with relapse after surgery. The RNA editing of miR-99a can be used as a biomarker of NSCLC.

研究分野：呼吸器内科学、腫瘍学

キーワード：肺がん miRNA RNA編集

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) miRNA とがん

マイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) への結合により標的遺伝子の発現を抑制し、発生・細胞増殖・発がんなど多くの生命現象に関与している。がんにおいて miRNA の発現は変化しており、がん遺伝子もしくはがん抑制遺伝子として機能する miRNA が数多く報告されている。

### (2) 申請者のこれまでの研究

申請者は肺がんにおける miRNA の発現低下機序としてエピジェネティクス異常に注目し研究を進めてきた。例えば miR-34b と miR-126 は DNA メチル化による発現制御を受けており miR-34b の DNA メチル化はリンパ管浸潤と相関すること (Watanabe *et al.* Int J Cancer 2012)、miRNA の DNA メチル化が術後再発に関連すること (Kitano, Watanabe *et al.* Cancer Sci 2011)、miR-139 が肺がんにおいて転移抑制的に機能し、DNA メチル化とは独立したヒストン修飾 (Histone H3 Lysine 27 のトリメチル化) により発現抑制されることを明らかにした (Watanabe *et al.* Cancer Medicine 2015)。

また miRNA の結合部位となる 3' UTR に着目し、肺がんにおける 3' UTR の短縮化の網羅的解析を行い、3' UTR が短縮している遺伝子群を同定した。この研究では 3' UTR 短縮化が予後不良因子となっていること、肺がんにおける PABPN1 遺伝子の発現低下と細胞増殖マーカーの発現増加が 3' UTR 短縮化と相関していることを報告し (Ichinose, Watanabe *et al.* Cancer Sci 2014)、miRNA の発現量の変化のみならず標的遺伝子側の変化が、がんにおける miRNA の機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。以上の研究により申請者は肺がんにおける miRNA 研究の基盤を構築した。

### (3) RNA 編集とがん

RNA 編集とは転写後に RNA の塩基配列が変化することで、ヒトではアデノシン (A) が脱アミノ化酵素 (ADAR1, ADAR2) によりイノシン (I) に変換される A-to-I editing が最も知られている。

がんでは RNA 編集の状態が変化しており、例えばグルタミン酸受容体遺伝子は正常神経細胞で完全に RNA 編集を受けているが、神経膠芽腫では RNA 編集の割合が低下することが報告されている (Mass *et al.* PNAS 2001)。

最近、肝細胞がんにおいて、ADAR1 の発現亢進と ADAR2 の発現低下に伴い RNA 編集が変化していること、ADAR1 はがん遺伝子として ADAR2 はがん抑制遺伝子として機能することが報告された (Tim *et al.* Gut 2014)。すなわち RNA 編集の変化は RNA の塩基配列の変化を介して、がん化やがんの形質に直接寄与している可能性がある。

### (4) miRNA の RNA 編集

RNA 編集を受ける遺伝子としてグルタミン酸受容体遺伝子など少数の protein coding gene が報告されてきたが、最近 miRNA の一次転写産物である pri-miRNA が RNA 編集を受け、miRNA のプロセシング効率や miRNA の機能が変化することが報告された (Kawahara *et al.* Science 2007, Kawahara *et al.* NAR 2008)。従って、がんにおいて miRNA の RNA 編集が変化し miRNA の機能が変化することが、がん化やがんの形質に寄与している可能性がある。実際、神経膠芽腫において miR-376a\* の RNA 編集が低下することで転移が促進されることが報告された (Yukti *et al.* JCI 2012)。

### (5) 予備解析

肺がん組織のマイクロアレイデータを用いた予備解析で、ADAR2 が非小細胞肺がん、特に扁平上皮癌において発現低下し、ADAR2 発現低下はリンパ節転移や予後不良と相関しており、肺がんにおいて RNA 編集の変化が生じている可能性が示唆された。以上を踏まえて、本研究課題では肺がんにおける miRNA の RNA 編集の変化と ADAR1, ADAR2 の機能について解析することとした。

## 2. 研究の目的

肺がん手術検体や肺がん細胞株を用いて RNA 編集が変化している miRNA を同定する。これにより RNA 編集に関連した新たなバイオマーカーを確立し、肺がんの臨床的悪性度 (術後再発、化学療法反応性、予後など) との関連を明らかにする。また ADAR1, ADAR2 遺伝子の機能解析、RNA 編集を受ける遺伝子の機能解析、を行うことで、肺がんにおける RNA 編集の変化が、がん化やがんの形質にどのように寄与しているかを明らかにする。

### (1) RNA 編集をうける miRNA の同定

正常肺組織と肺がん手術検体、もしくは正常気道上皮細胞と肺がん細胞株の比較を行い、肺がんにおいて RNA 編集が変化している (亢進もしくは低下) 遺伝子を同定する。miRNA のスクリーニングのために公開されている small RNA の NGS データを用いることとする。

### (2) 臨床検体での RNA 編集の解析

当院での肺がん手術検体を用いて RNA 編集の変化を定量的に解析し、病理学的所見 (病期や脈管浸潤) や臨床所見 (術後再発や予後) との関連を検討する。

### (3) ADAR1, ADAR2 の機能解析

肺がん手術検体や肺がん細胞株を用いて ADAR1, ADAR2 の発現量を検討し、RNA

編集と ADAR1, ADAR2 の発現量との関連を明らかにする。ADAR1, ADAR2 が低発現の肺がん細胞株にこれらの遺伝子を導入し、RNA 編集の変化を検討する。またこれらの遺伝子の導入によりがん細胞の形質（増殖能、遊走能、浸潤能、*in vivo* での腫瘍形成能）がどのように変化するかを検討する。

#### (4) miRNA の機能解析

肺がんにおいて RNA 編集が変化し病理学的所見や臨床所見との関連が見いだされた miRNA については、肺がん細胞株を用いて機能を解析する。特に RNA 編集が miRNA の seed 配列内に位置するものについては RNA 編集に伴い miRNA の標的遺伝子が変化している可能性があり、miRNA の機能の変化を説明できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) RNA 編集をうける miRNA の同定

NGS のデータを用いて miRNA の RNA 編集を網羅的に同定する方法が Alon らによって報告された (Alon *et al.* Genome Res 2012)。そこで公開されている肺腺がんの small RNA の NGS のデータベース (Vucic *et al.* BMC Cancer 2014) を用いて、正常肺組織と肺がん組織において最も高率に RNA 編集を受けている miRNA を検索した。同定された miRNA のうち、がんと正常肺組織との比較で RNA 編集の割合が変化している miRNA を同定した。

#### (2) 臨床検体での RNA 編集の解析

肺がん手術検体において RNA 編集を定量するために Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成し、RT-PCR にて目的の mature miRNA を増幅した。PCR 産物を tandem に ligation した後に TA cloning し、複数のプラスミドの sequence を行うことによって RNA 編集の割合を定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) RNA 編集をうける miRNA の同定

公開されている NGS のデータベースを解析し肺腺がんにおいて RNA 編集の割合が変化している miRNA を同定した。肺がんにおいて RNA 編集の割合が増加している miRNA として miR-200b, miR-381 が同定され、一方肺がんにおいて RNA 編集の割合が減少している miRNA として miR-99a, miR-379, miR-411, miR-497 が同定された。

#### (2) 臨床検体での RNA 編集の解析

同定された miRNA のうち RNA 編集の比率が高い miR-99a に着目して、肺腺がんの手術検体 50 例の腫瘍部位と各々の対応する正常肺組織部位との RNA 編集の割合を定量した。50 例中 19 例において正常肺組織部位と比較して RNA 編集の低下があり、1 例で上

昇があり、30 例では変化が認められなかった。また miR-99a の RNA 編集が低下している症例では術後再発の割合が高い傾向が見いだされた。

#### (3) 今後の検討課題

miRNA の RNA 編集は miRNA の標的遺伝子を変化させたり、プロセシング効率や発現量に変化をもたらしたりする可能性がある。今回同定された miRNA の機能解析を行うことで、miRNA の RNA 編集ががん化やがんの形質に直接寄与するかどうかを検討する予定である。また ADAR1, ADAR2 の機能解析を進めることで RNA 編集の肺がんにおける役割を検討する予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Sakatani T, Maemura K, Hiyama N, Amano Y, Watanabe K, Kage H, Fukayama M, Nakajima J, Yatomi Y, Nagase T, Takai D. High expression of IRE1 in lung adenocarcinoma is associated with a lower rate of recurrence. Jpn J Clin Oncol. 2017 (Epub ahead of print) doi: 10.1093/jjco/hyx031.

2. Ishikawa R, Amano Y, Kawakami M, Sunohara M, Watanabe K, Kage H, Ohishi N, Yatomi Y, Nakajima J, Fukayama M, Nagase T, Takai D. The chimeric transcript RUNX1-GLRX5: a biomarker for good postoperative prognosis in Stage IA non-small-cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol. 2016 Feb;46(2):185-9. doi: 10.1093/jjco/hyv187

3. Watanabe K, Amano Y, Ishikawa R, Sunohara M, Kage H, Ichinose J, Sano A, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Histone methylation-mediated silencing of miR-139 enhances invasion of non-small-cell lung cancer. Cancer Med. 2015 Oct;4(10):1573-82. doi: 10.1002/cam4.505.

[学会発表](計1件)

Toshio Sakatani, Keita Maemura, Noriko Hiyama, Yousuke Amano, Kousuke Watanabe, Hidenori Kage, Masashi Fukayama, Jun Nakajima, Yutaka Yatomi, Takahide Nagase, Daiya Takai. High expression of endoplasmic reticulum oxidoreductin (ERO) 1L is associated with resistance to cisplatin. AACR-IASLC Joint Conference on the

Molecular Origins of Lung Cancer. Jan 6th  
2016, SanDiego, CA, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊 広祐 (Kousuke Watanabe)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50644291

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )