

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890099

研究課題名（和文）

網羅的発現データを用いた肺癌機能機序の解明

研究課題名（英文）

Revealing the lung cancer mechanism using expression profile

研究代表者

有馬 千夏 (CHINATSU ARIMA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：00534843

研究成果の概要（和文）：

肺癌の発生・進展において特徴的な発現制御異常を示す mRNA とマイクロ RNA のネットワークを同定するため、マイクロ RNA とそのマイクロ RNA が直接制御する可能性の高い遺伝子を抽出した。さらに、マイクロ RNA とそのマイクロ RNA を転写制御する可能性の高い遺伝子を抽出した。マイクロ RNA とそれによって制御を受ける遺伝子候補として 10 組が、また、転写因子とその標的となっているマイクロ RNA の候補として 12 組が推定されたが、それらには miR-29c と DNMT3A および DNMT3B の制御関係や、E2F8 と miR-18a などの既報の制御関係が含まれていた。現在、抽出したマイクロ RNA と遺伝子の制御関係について、実験的な検証を進めつつある。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to identify networks composed of mRNAs and miRNAs that show distinctive abnormality in the control of expression in the development of lung cancer. Thus, we extracted genes and miRNAs that are likely to directly regulate each other. As a result, we have found 10 pairs of miRNAs and their potential direct downstreams as well as 12 pairs of transcription factors and miRNAs of their potential targets. They included previously reported pairs including miR-29c and DNMT3A/DNMT3B as well as E2F8 and miR-18a. The regulatory interactions between the miRNAs and the coding genes are being experimentally validated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：バイオインフォマティクス

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、マイクロ RNA、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

ゲフィチニブ[®]等の分子標的薬が、EGFR 変異を有する腺癌に対して有効性を持つことが示されているが、さらに、十分な抗腫瘍効果を持つ新規分子標的薬や治療法

が明らかに必要とされている。近年、個別の遺伝子に注目した研究手法ではなく、主要な発癌関連パスウェイの活性化とその相互関係を基にした発癌関連遺伝子群の発現制御メカニズム異常の解明に端緒が

開かれつつある。最近、Bildらは細胞株を用いて肺癌における活性化パスウェイと、肺癌症例のサブクラス分類や予後との相関、或いは薬剤感受性との相関について報告している (Bild, A. H., et al., Nature, 2006)。一方、我々は肺癌腫瘍組織を直接用いた解析によって得たデータに GSEA 法及びC-MAP法というバイオインフォマティクス手法を適用することによって、予後と相関するパスウェイを明らかとし、さらに、そのパスウェイの抑制に有効な薬剤として、これまで抗腫瘍効果を持つことが知られていなかったFDA認可の薬剤を見出している (Ebi, H., et al., Cancer Res., in press) (図1)。

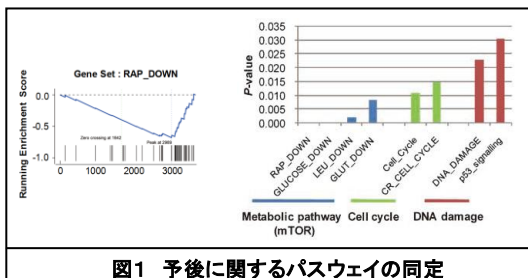


図1 予後に関するパスウェイの同定

一方、近年、標的遺伝子の mRNA の分解或いはタンパクへの翻訳を抑制する、約 20 塩基からなるマイクロ RNA が、癌の発生・進展に密接に関わっていることが示唆されている。(図2)。特に肺癌研究において、我々は肺腺癌における let-7 の発現異常とその機能について (Takamizawa, J., et al., Cancer Res., 2004; Tokumaru, S., et al., Carcinogenesis, 2008) 及び、小細胞肺癌における miR-17-92 の発現異常とその阻害による細胞死誘導 (Hayashita, Y., et al., Cancer Res., 2005; Matsubara, H., et al., Oncogene, 2007) 並びに標的遺伝子 (HIF-1 α) の同定 (Taguchi, A., et al., Cancer Res., 2008) などの成果を上げてきた。その過程において、今後のマイクロ RNA 研究における遺伝子発現制御ネットワークの解明の重要性に注目するに至った。

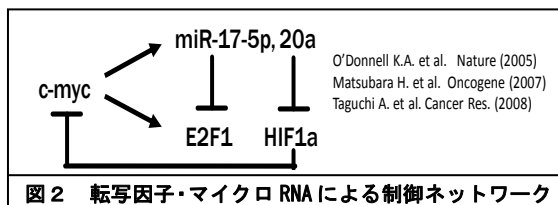


図2 転写因子・マイクロ RNA による制御ネットワーク

2. 研究の目的

マイクロ RNA の発現異常が、肺癌の発生・進展において極めて重要な働きを持つことが次第に明らかとなってきた。しかしながら、その発現制御異常のメカニズムは未だ殆ど分かっていない。マイクロ RNA の発現異常の分子機構を解明する

ためには、従来のように特定のマイクロ RNA とその標的遺伝子間の発現制御を対象とした微視的なアプローチではなく、ゲノムワイドに mRNA を規定する遺伝子とマイクロ RNA の相互制御関連性を検討していくことが重要と考えられる。そのためには、膨大なパラメータを対象とした極めて複雑な解析が必要となると予想される。

そこで、本研究においては、申請者の得意とするバイオインフォマティクス解析手法を基盤に取り組みことによって、肺癌の発生と進展に重要なパスウェイ群の発現制御異常メカニズムの全貌に迫ることを目指す。そのために、100 例を超える肺癌腫瘍検体から取得した mRNA とマイクロ RNA 双方のマイクロアレイ解析データと臨床データを基盤情報として、肺癌の病態に関連する mRNA とマイクロ RNA を規定する双方の遺伝子セットを探索・同定し、それらの構成要素間に存在する制御ネットワークの同定をマイクロ RNA に重点を置きつつ進める。さらに、in silico の解析を通じて存在を推定したネットワーク群について、in vitro の実験系による検証を行うことによって、今後の革新的な新規分子標的薬・治療法の確立を目指した研究にとって、極めて重要な基盤情報を確立する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌検体に基づく類似発現パターンを示す mRNA およびマイクロ RNA の抽出

肺腺癌検体 76 症例の mRNA (23000 個) およびマイクロ RNA (470 個) の既取得マイクロアレイデータを用いたバイオインフォマティクス解析に基づいて進めた。mRNA マイクロアレイデータについては、肺癌検体において、3 fold change 以上の発現変動を示す mRNA を解析に用いた。また、マイクロ RNA マイクロアレイデータについては、発現が確認できた 257 個のマイクロ RNA を解析に用いた。まず、mRNA マイクロアレイデータおよびマイクロ RNA マイクロアレイデータを基に、mRNA と負の相関を示すマイクロ RNA を抽出した。なお、相関の検定においては膨大な数のパラメータを繰り返し扱う多重検定に起因して誤って有意と判定する危険性を回避するため、解析データ全体の検定の有意水準を予め決め ($\alpha=0.05$)、これを検定数で割った値を有意水準として用いる Bonferroni 法による多重検定の補正を行った。また、mRNA マイクロアレイのうち、GO term に基づいた転写因子関連の mRNA データを抽出し、転写因子関連 mRNA と正の相関を示すマイクロ RNA を抽出した。相関の検定について

は、上記と同様 Bonferroni 法による補正を行った。

(2) マイクロ RNA と直接制御関係のある遺伝子の抽出

マイクロ RNA との負の制御関係を示す遺伝子には、直接の標的遺伝子が含まれる可能性が高いため、標的遺伝子予測プログラムである TargetScan を用いて、マイクロ RNA のターゲット予測を行い、その関係性を推定した。この解析によって、マイクロ RNA とそのターゲットである mRNA である可能性が極めて高い発現相関性を示すマイクロ RNA を抽出する。また、マイクロ RNA とその転写制御遺伝子を抽出するため、有意な正相関を示すマイクロ RNA と遺伝子においては、TFBIND(Tsunoda T et al., Bioinformatics, 15, 622-630, 1999)を用いて、マイクロ RNA の 5' UTR の 5kb 上流配列における転写因子結合部位の検索を行った。

4. 研究成果

(1) 肺癌検体の遺伝子発現プロファイルに基づくマイクロ RNA とその予測ターゲット遺伝子の抽出

肺癌の発生・進展において発現制御異常を示す mRNA とマイクロ RNA を規定する遺伝子群を同定するため、肺腺癌検体 76 症例の mRNA およびマイクロ RNA のマイクロアレイデータを用いて、遺伝子とマイクロ RNA の発現パターンの相関を調べた結果、有意な負相関を示す、152 個の遺伝子とマイクロ RNA との組合せを得た (Bonferroni 補正 p -value < 0.05)。

このうち、遺伝子とマイクロ RNA との間に負の相関のあるものについては、マイクロ RNA がターゲット遺伝子を抑制する関係、あるいは、遺伝子がマイクロ RNA を抑制する関係が考えられる。ここでは、マイクロ RNA がターゲット遺伝子を抑制する関係に注目することとし、その関係を示す遺伝子とマイクロ RNA を抽出するため、TargetScan を用いて、マイクロ RNA の predicted target である遺伝子のみを抽出した。その結果、マイクロ RNA とその予測ターゲット遺伝子の 10 個の組合せを抽出した。このうち、マイクロ RNA と遺伝子に負の相関がある 2 個の組合せ、miR-29c と DNMT3A および DNMT3B については (図 3)、肺癌で高発現する miR-29 family が各遺伝子をターゲットとすることが報告されている (Fabbri M et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 104(40), 15805-15810, 2007)。このことから、抽出したその他のマイクロ RNA と予測ターゲット遺伝子についても、実際に制御関係があることが期待される。現在、抽出したマイクロ RNA とターゲット

遺伝子の制御関係の実験的な確認を進めつつある。

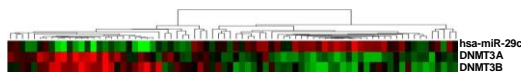


図 3 miR-29c と DNMT3A, DNMT3B の発現パターン

(2) 肺癌検体の遺伝子発現プロファイルに基づくマイクロ RNA とその転写制御遺伝子の抽出

肺腺癌検体 76 症例の転写因子関連遺伝子およびマイクロ RNA のマイクロアレイデータを用いて、遺伝子とマイクロ RNA の発現パターンの相関を調べた結果、有意な正相関を示す、65 個のマイクロ RNA とその予測転写制御遺伝子の組合せを得た (Bonferroni 補正 p -value < 0.05)。

このうち、マイクロ RNA の 5' UTR 上流 5 kb の配列に結合部位のある転写因子に絞った結果、マイクロ RNA とその転写因子である可能性の高いマイクロ RNA と転写因子の組合せ 12 個が得られた。得られた転写因子として、細胞周期進行に関わる MYB ファミリーのメンバーである MYBL2 や、細胞周期の進行に必要な一連の遺伝子群の発現を制御し、細胞増殖に必須の役割を果たす E2F ファミリーのメンバーである E2F8 などがあった。今回予測された E2F8 と miR-18a については (図 4)、E2F ファミリーが miR-17-92 クラスターのメンバーの転写を制御することが知られており、この制御関係を捉えたと考えられる。このことから、抽出したその他の転写因子とマイクロ RNA についても、実際に制御関係があることが期待される。現在、抽出したマイクロ RNA とターゲット遺伝子の制御関係の実験的な確認を進めつつある。

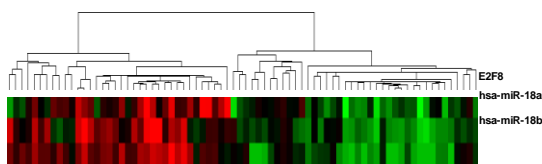


図 4 E2F8 と miR18a, miR-18b の発現パターン

(3) 予測した肺癌関連ネットワークの検討

可視化が可能なソフトウェアである IPA を用いて、既知の制御関係の確認を行ったが、上記以外での抽出したマイクロ RNA と遺伝子との制御関係は得られなかった。今後、今回抽出した制御関係を実験的に確認し、未知の制御関係の有無を同定する予定である

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 4 件)

- ① Matsuyama Y, Suzuki M, Arima C, Huang Q M, Tomida S, Takeuchi T, Sugiyama R, Itoh Y, Yatabe Y, Goto H, and Takahashi T. Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas. Mol Carcinogenesis. (in press).
- ② Yanagisawa K, Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, and Takahashi T. Identification of cancer metastasis-related gene that regulates multiple cellular stress response pathways thorough combined omics-approaches. Cancer Res. 査読有, 70(23), 2010, 9949-9958.
- ③ Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara TA, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, and Suzuki M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. Cancer Res. 査読有 70(21), 2010, 8407-8416.
- ④ Bryant CM, Albertus DL, Kim S, Chen G, Brambilla C, Guedj M, Arima C, Travis WD, Yatabe Y, Takahashi T, Brambilla E, and Beer DG. Clinically relevant characterization of lung adenocarcinoma subtypes based on cellular pathways: an international validation study. PLoS One. 査読有 5(7), 2010, e11712.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 有馬千夏, 松山恭士, 鈴木元, Miao Huang Qin, 谷田部恭, 後藤秀実, 高橋隆. 肺腺癌における潜在的治療標的としてのプロテアソーム非触媒サブユニット PSMD2. 日本癌学会学術総会, Sep. 2010, 大坂・大坂国際会議場

[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

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1710/1733/bunshisyuyougaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 千夏 (CHINATSU ARIMA)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：00534843

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし