

令和元年5月14日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08679

研究課題名(和文) 診断治療戦略に向けた遺伝子型別肺腺癌のmicroRNA・mRNA統合発現解析

研究課題名(英文) Integrative analysis to identify the unique microRNA-mRNA regulatory network in EGFR-mutated lung adenocarcinoma: toward precision medicine

研究代表者

稲村 健太郎 (KENTARO, INAMURA)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・主任研究員

研究者番号：40442545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異肺腺がん52例とEGFR非変異肺腺がん103例のマイクロRNA発現およびメッセンジャーRNA発現を網羅的に調べた。統合解析により、MUC4と3つのマイクロRNA(miR-500a-3p, miR-502-3p, miR-652-3p)の相互作用を含む、EGFR変異肺がんの特徴的なマイクロRNA-メッセンジャーRNA相互作用を同定した。本研究で同定されたEGFR変異肺がんの特徴的なマイクロRNA・メッセンジャーRNA間の相互作用は、EGFR変異肺がんの発がん・がん進展のメカニズムを理解する上で有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR変異は日本人の肺がんにおいて最も頻度の高いドライバー遺伝子異常である。一方、マイクロRNAはメッセンジャーRNAとの相互作用を介して発がん・がん進展において重要な働きをすることが知られている。本研究では、網羅的統合発現解析により、EGFR変異肺がんの特徴的なマイクロRNA-メッセンジャーRNA相互作用をネットワーク化した。本研究で同定されたEGFR変異肺がんの特徴的なマイクロRNA・メッセンジャーRNA間の相互作用は、EGFR変異肺がんの発がん・がん進展のメカニズムを理解する上で有用であると考えられる。将来的にはマイクロRNAをターゲットとする診断治療戦略に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In lung adenocarcinoma, various mutations that drive cancer progression have emerged as druggable molecular targets. Among them, EGFR mutation is the most prevalent genetic alterations. EGFR-mutated lung adenocarcinoma is characterized by a distinct oncogenic pathway with unique microRNA-mRNA interactions. We investigated both microRNA and mRNA expression profiles using microarrays in 155 cases of lung adenocarcinoma. An integrative analysis of microRNA and mRNA expression revealed a list of microRNA-mRNA interactions in EGFR-mutated tumors. A network structural analysis provided a comprehensive view of the complex microRNA-mRNA interactions, including interactions of miR-500a-3p, miR-502-3p, and miR-652-3p with MUC4. Overall, this observational study provides insight into the unique microRNA-mRNA regulatory network in EGFR-mutated tumors. Our findings, if validated, would inform future research examining the interplay between microRNAs and mRNAs in EGFR-mutated lung adenocarcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：マイクロRNA メッセンジャーRNA ドライバー遺伝子 マイクロアレイ 網羅的遺伝子発現解析 統合解析 肺がん 腺がん

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんは、日米ともに、がん死因の中で一番多い。肺がんのうち半数以上が腺がんであり日本人の肺腺がんの約70%は相互排他的なドライバー遺伝子異常（EGFR 変異：50%，KRAS 変異：10%，ALK 融合：3-5%，RET 融合：約1%，ROS1 融合：約1%）によって分類できる（図1）。肺腺がんではEGFR 変異がんに対するEGFR 阻害薬など早くから分子標的治療薬の導入が進んでいる（Paez et al. Science 2004）。

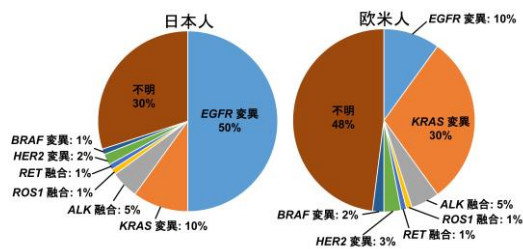


図1. 肺腺がんのドライバー遺伝子異常

マイクロ RNA は 18~25 塩基程度からなる蛋白質を翻訳しない非コード RNA である。マイクロ RNA は翻訳の阻害やメッセンジャー RNA の分解を引き起こすことによって、メッセンジャー RNA を抑制的に制御する（Winter et al. Nat Cell Biol 2009）。ひとつのマイクロ RNA が複数のメッセンジャー RNA をターゲットとし、ひとつのメッセンジャー RNA が複数のマイクロ RNA によってターゲットされるため、マイクロ RNA とメッセンジャー RNA との間には複雑な相互作用が存在する。マイクロ RNA はメッセンジャー RNA を介して、細胞分裂、細胞分化、細胞代謝、発がん、がん進展などの種々の細胞プロセスを制御している。多くのがんで、マイクロ RNA の発現異常が認められ、マイクロ RNA は組織依存的またはターゲットするメッセンジャー RNA 依存的に、がん促進性マイクロ RNA として働いたり、がん抑制性マイクロ RNA として働いたりする。各種ドライバー遺伝子異常をもつ肺腺がんに特徴的に発現するマイクロ RNA やメッセンジャー RNA の報告は多く、個々のマイクロ RNA とメッセンジャー RNA との相互作用による発がんメカニズムも発表されている。しかしながら、特定のドライバー遺伝子異常をもつ肺腺がんにおけるマイクロ RNA とメッセンジャー RNA の相互作用について網羅的に解析した研究はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究は、ドライバー遺伝子異常（特に EGFR 変異）特異的に認められるマイクロ RNA とメッセンジャー RNA の相互作用を網羅的に調べることで、メッセンジャー RNA を介したマイクロ RNA の発がん・がん促進メカニズムを解明することを目的とする。現在、マイクロ RNA はがんの治療標的および診断マーカーとして期待されている。特定のドライバー遺伝子異常をもつ肺腺がんに特徴的なマイクロ RNA を介した発がん・がん促進性メカニズムを理解することで、マイクロ RNA レベルでの診断治療の開発に繋げることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

公益財団法人がん研究会がん研究所に保存されている肺腺がん 155 症例の手術凍結検体を対象とした。EGFR 変異の有無は既に調べられており、内訳は EGFR 変異症例が 52 例で EGFR 非変異症例が 103 例である。

### (2) 方法

- ① マイクロアレイを用いてマイクロ RNA およびメッセンジャー RNA の発現を網羅的に調べた。
- ② R software (version 3.5) を用いて、マイクロ RNA およびメッセンジャー RNA の網羅的発現解析を行った。
- ③ miRComb パッケージを用いて、マイクロ RNA とメッセンジャー RNA の統合解析を行った。
- ④ TargetScan, microCosm, miRDB の 3 つのデータベースを用いて、マイクロ RNA とメッセンジャー RNA の相互作用ペアを同定した。
- ⑤ Cytoscape (version 3.6.1) を用いて、マイクロ RNA-メッセンジャー RNA 相互作用の全体像を図示した。
- ⑥ マイクロ RNA とメッセンジャー RNA のオントロジー解析には、それぞれ DIANA-miRPath (version 3.0) と DAVID (version 6.8) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

- ① 臨床病理学的には、EGFR 変異がんは非～軽度喫煙者が多く (P=0.02)、分化度が高かった (P<0.0001)。
- ② EGFR 変異がん と EGFR 非変異がんのマイクロ RNA 発現の比較をおこなった。EGFR 変異がん で有意に発現が高かった 16 個のマイクロ RNA と発現が低かった 3 個のマイクロ RNA を同定した。同定された 19 個のマイクロ RNA のうち 5 個 (miR-500a-3p, miR-532-3p, miR-532-5p, miR-224-5p, miR-502-3p) は、既報告の EGFR 変異に特徴的に発現するマイクロ RNA (Bjaanæs et al. *Int J Cancer* 2014) の中に含まれていた。
- ③ 同定された EGFR 変異がん に特徴的に発現する 19 個のマイクロ RNA のオントロジー解析を行った。最もエンリッチされたオントロジーは Hippo パスウェイであった (P=2.38E-08)。
- ④ EGFR 変異がん と EGFR 非変異がんのメッセンジャー RNA 発現の比較をおこなった。EGFR 変異がん で有意に発現が高かった 270 個のメッセンジャー RNA と発現が低かった 161 個のメッセンジャー RNA を同定した。EGFR 変異がん に特徴的に発現するメッセンジャー RNA として同定されたものの中には、EGFR 変異肺がん に特徴的に発現するメッセンジャー RNA として既に報告されている (Chitale et al. *Oncogene* 2009) DUSP4, EGFR, TNFRSF10B, LRRC31 が含まれていた。
- ⑤ 同定された EGFR 変異がん に特徴的に発現する 431 個のメッセンジャー RNA のオントロジー解析を行った。エンリッチされた “non-small cell lung cancer” オントロジーの中にはがん遺伝子の EGFR やがん抑制遺伝子の RB1, CDK6 が含まれていた。
- ⑥ EGFR 変異肺がん に特徴的に発現していたマイクロ RNA とメッセンジャー RNA を用いて、統合解析を行った。EGFR 変異がん に特徴的な 146 個のマイクロ RNA-メッセンジャー RNA 相互作用ペアを同定した。図 2A は同定されたペアのネットワーク図である。統計学的に有意であったマイクロ RNA-メッセンジャー RNA のペアは 63 個あり、そのネットワークを図 2B に示した。EGFR 変異肺がん のがん進展に関係することが知られている MUC4 は 3 つのマイクロ RNA (miR-500a-3p, miR-502-3p, miR-652-3p) によってターゲットされていた。EGFR 変異がん で高発現だった miR-30c-5p と低発現だった miR-223-3p は、いくつかの共通のメッセンジャー RNA をターゲットしていた。

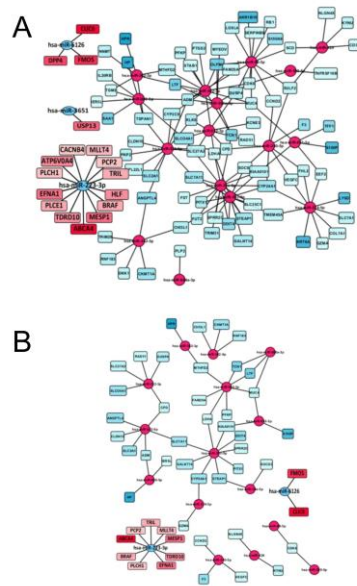


図2. EGFR変異肺がんのマイクロRNA-メッセンジャーRNAネットワーク。  
(A) 149ペア (B) 63ペア

### (2) 考察

- ① 本研究で同定した EGFR 変異肺がん に特徴的に発現するマイクロ RNA、メッセンジャー RNA はそれぞれ既報告の EGFR 変異肺がんシグナチャーとオーバーラップしていた。オーバーラップしていたマイクロ RNA の中には、非小細胞肺がんにおいてがん促進性に働くことが知られている miR-224 の高発現が含まれていた。
- ② EGFR 変異肺がん に特徴的に発現するマイクロ RNA のオントロジー解析をおこなったところ、Hippo パスウェイがエンリッチされていることがわかった。EGFR 変異肺がんでは Hippo パスウェイがマイクロ RNA を介する機序で活性化されていることが示唆され、Hippo パスウェイは EGFR 変異肺がんの治療ターゲットとなる可能性がある。メッセンジャー RNA のオントロジー解析では “pathway in cancer” と “non-small cell lung cancer” がエンリッチされており、どちらのオントロジーの中にも高発現の EGFR が含まれていた。EGFR 変異肺がんの浸潤能獲得に EGFR 変異遺伝子の増幅が関係していることを反映していると考えられる。
- ③ EGFR 変異肺がんにおいて認められたマイクロ RNA とメッセンジャー RNA の相互作用ペアの中に、miR-532-3p/RAD51 と miR-532-3p/DUSP4 が含まれていた。RAD51 と DUSP4 はいずれも EGFR 変異肺がんにおいてがん抑制遺伝子として働くことが知られている。EGFR

変異肺がんでは、がん抑制遺伝子である RAD51 と DUSP4 の発現を低下させることによって、miR-532-3p ががん促進性マイクロ RNA として働いている可能性が示唆された。

- ④ マイクロ RNA-メッセンジャーRNA ネットワークの中に MUC4 と 3 つのマイクロ RNA (miR-500a-3p, miR-502-3p, miR-652-3p) の相互作用を認めた。EGFR 変異肺がんにおいて MUC4 はがん抑制性に作用することから、これらのマイクロ RNA は MUC4 の発現を低下させることでがん促進性に働く可能性がある。

### (3) 結語

EGFR 変異肺がんにおけるマイクロ RNA-メッセンジャーRNA 相互作用を網羅的に調べた。本研究で同定された EGFR 変異肺がんに特徴的なマイクロ RNA・メッセンジャーRNA 間の相互作用は、EGFR 変異肺がんの発がん・がん進展のメカニズムを理解する上で有用であると考えられる。将来的には、マイクロ RNA をターゲットする診断治療戦略に応用されることが期待される。引き続き、ALK 融合遺伝子肺がん、KRAS 変異肺がんのマイクロ RNA・メッセンジャーRNA 統合発現解析を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

- ① Subat S, Inamura K, Ninomiya H, Nagano H, Okumura S, Ishikawa Y. Unique MicroRNA and mRNA Interactions in EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma. *J Clin Med*. 2018 Nov 6;7(11):E419. doi: 10.3390/jcm7110419. (査読あり)
- ② Inamura K, Shigematsu Y, Ninomiya H, Nakashima Y, Kobayashi M, Saito H, Takahashi K, Futaya E, Okumura S, Ishikawa Y, Kanda H. CSF1R-Expressing Tumor-Associated Macrophages, Smoking and Survival in Lung Adenocarcinoma: Analyses Using Quantitative Phosphor-Integrated Dot Staining. *Cancers (Basel)*. 2018 Jul 31;10(8):E252. doi: 10.3390/cancers10080252. (査読あり)
- ③ Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 23;19(4):E1259. doi: 10.3390/ijms19041259. (査読あり)
- ④ Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Mar 14;10(3):E72. doi: 10.3390/cancers10030072. (査読あり)
- ⑤ Noma D, Inamura K, Matsuura Y, Hirata Y, Nakajima T, Yamazaki H, Hirai Y, Ichinose J, Nakao M, Ninomiya H, Mun M, Nakagawa K, Masuda M, Ishikawa Y, Okumura S. Prognostic Effect of Lymphovascular Invasion on TNM Staging in Stage I Non-Small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2018 Jan;19(1):e109-e122. doi: 10.1016/j.clcc.2017.06.001. (査読あり)
- ⑥ Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Ninomiya H, Sakakibara R, Nishio M, Okumura S, Ishikawa Y. Relationship of tumor PD-L1 (CD274) expression with lower mortality in lung high-grade neuroendocrine tumor. *Cancer Med*. 2017 Oct;6(10):2347-2356. doi: 10.1002/cam4.1172. (査読あり)
- ⑦ Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol*. 2017 Aug 28;7:193. doi: 10.3389/fonc.2017.00193. (査読あり)
- ⑧ Inamura K. Major Tumor Suppressor and Oncogenic Non-Coding RNAs: Clinical Relevance in Lung Cancer. *Cells*. 2017 May 9;6(2):E12. doi: 10.3390/cells6020012. (査読あり)
- ⑨ Inamura K. Diagnostic and Therapeutic Potential of MicroRNAs in Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017 May 9;9(5):E49. doi: 10.3390/cancers9050049. (査読あり)
- ⑩ Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Ninomiya H, Sakakibara R, Subat S, Nagano H,

Nomura K, Okumura S, Shibutani T, Ishikawa Y. Association of tumor TROP2 expression with prognosis varies among lung cancer subtypes. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):28725-28735. doi: 10.18632/oncotarget.15647. (査読あり)

- ⑪ Sakakibara R, Inamura K, Tambo Y, Ninomiya H, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Ohyanagi F, Matsuura Y, Nakao M, Mun M, Okumura S, Inase N, Nishio M, Motoi N, Ishikawa Y. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2017 Sep;18(5):527-534.e1. doi: 10.1016/j.clcc.2016.12.002. (査読あり)
- ⑫ Inamura K, Yokouchi Y, Kobayashi M, Sakakibara R, Ninomiya H, Subat S, Nagano H, Nomura K, Okumura S, Shibutani T, Ishikawa Y. Tumor B7-H3 (CD276) expression and smoking history in relation to lung adenocarcinoma prognosis. *Lung Cancer*. 2017 Jan;103:44-51. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.11.013. (査読あり)
- ⑬ Inamura K, Yokouchi Y, Sakakibara R, Kobayashi M, Subat S, Ninomiya H, Nagano H, Nomura K, Okumura S, Ishikawa Y. Relationship of tumor PD-L1 expression with EGFR wild-type status and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Oct;46(10):935-941. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Subat S, Inamura K, Ninomiya H, Nagano H, Okumura S, Ishikawa Y. The microRNA-mRNA interactions in ALK-rearranged lung adenocarcinoma. The AACR 110th Annual Meeting 2019, Atlanta, GA, March 29-April 3, 2019
- ② 稲村健太郎, 二宮浩範, ソフィア ソバティ, 石川雄一. 肺癌のゲノムワイド解析. 第 107 回 日本病理学会総会, 札幌, 平成 2018 年 6 月 21-23 日

#### **【その他】**

公益財団法人がん研究会がん研究所病理部ホームページ  
<https://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/pathology/index.html>