

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700909

研究課題名（和文） 遺伝子型の異なる肺腺癌および肺神経内分泌癌の microRNA 発現レベルでの解析

研究課題名（英文） The analysis of microRNA expression in lung adenocarcinomas with characteristic driver mutations and lung neuroendocrine carcinomas

研究代表者

稲村 健太郎（INAMURA KENTARO）

公益財団法人がん研究会・がん研究所病理部・研究員

研究者番号：40442545

研究成果の概要（和文）：

microRNA マイクロアレイを施行し、EGFR 変異肺腺癌、KRAS 変異肺腺癌、ALK 転座肺腺癌に特徴的な発現をしめす microRNA をそれぞれ抽出した。パスウェイ解析をした所、EGFR 変異肺腺癌では p70S6K Signaling などが、KRAS 変異肺腺癌では Clathrin-mediated Endocytosis Signaling などが、ALK 転座肺腺癌では RANK Signaling in Osteoclasts などが、抽出された microRNA に特徴的なパスウェイであることがわかった。一方、肺小細胞癌は、肺腺癌とともに階層クラスタリングすると、小細胞癌だけで独立した群を形成する SCLC1 群と肺腺癌とともに群を形成する SCLC2 群の 2 群にクラスターされた。Kaplan-Meier 生存曲線では、SCLC1 群は SCLC2 群より有意に予後が悪かった ( $P = 0.039$ )。遺伝子型の異なる肺腺癌に特徴的だった microRNA および、小細胞癌を予後に差のある 2 群に分けた microRNA について、公開マイクロアレイデータを使った validation や細胞株レベルの実験により、診断治療への応用へ向けてさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Using microarrays, we identified the microRNAs characteristically expressed in EGFR mutated, KRAS mutated, and ALK translocated lung adenocarcinomas, respectively. Furthermore, we identified characteristic pathways for the microRNAs of EGFR mutated, KRAS mutated, and ALK translocated lung adenocarcinomas, respectively. On the other hand, small cell lung carcinomas (SCLCs) were classified into two groups (SCLC1 and SCLC2) by hierarchical clustering using microRNA microarray. SCLC1, which formed an independent cluster comprising only SCLCs, has a significant poorer prognosis than SCLC2, which clustered with lung adenocarcinomas ( $P = 0.039$ ). Further investigations, in silico and in vitro, are required to validate these results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：肺癌、microRNA、遺伝子変異、腺癌、小細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) cDNA プロジェクトにより、ゲノム中に膨大な数の non-coding RNA が存在することが明らかになった。いままでは蛋白質をコードしない non-coding RNA は「ジャンク」領域と考えられていたが、最近、機能性 RNA が含まれることがわかってきた。18~25 塩基程度からなる microRNA は non-coding RNA の中でも癌との関係が最も研究されており、最近では microRNA を標的とする癌治療も試みられている。さらに microRNA は mRNA と異なり血中で安定して存在するため、血中の microRNA を測定することで、癌スクリーニングおよび癌悪性度診断に使える可能性も示唆されている。
- (2) 癌は日本人の死亡原因の第 1 位を占め、国民の 3 人に 1 人は癌で死亡している。癌の中でも、肺癌は増加傾向にあり、胃癌を抜いて死因 1 位である。肺癌は腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の 4 種類の組織型に大別されるが、同じ組織型のものでも、治療感受性や予後に差がみられるため、適切な亜型に個別化して理解したり治療したりする必要がある。
- (3) 日本人の肺腺癌の約 70%、欧米人の肺腺癌の約 60% が相互排他的遺伝子変異 (EGFR, KRAS, MET, EML4-ALK, HER2) によって分類できる。現在、癌の薬物療法は分子標的治療薬へ移行しつつある。最近の肺癌研究においては、EGFR 変異肺癌に対する EGFR 阻害薬の有効性の発見と ALK 転座肺癌に対する ALK 阻害薬の有効性の発見は大きかった。しかしながら、EGFR 阻害薬により EGFR 阻害薬耐性肺癌が誘導されることも稀でないため、チロシンキナーゼ阻害薬だけでなく、microRNA レベルでの治療を追加することが将来の治療戦略として期待されている。
- (4) 肺癌の中で最も悪性度が高く予後が悪い組織型は小細胞癌である。大細胞癌の中にも小細胞癌と同様に神経内分泌的性格を有する大細胞神経内分泌癌があり、小細胞癌とともに高悪性度神経内分泌癌と称されている。一般にそれらは予後が極めて不良であるが、少数ではあるが手術的切除により長期生存する患者も知られている。近年、肺における神経内分泌分化の分子メカニズムが明らかにされつつあるが、臨床応用には大きな隔たりがあり、高悪性度神経内分泌癌に対する治療は手術、抗癌剤、放射線療法のままである。

## 2. 研究の目的

- (1) 肺腺癌では相互排他的な遺伝子変異が明らかになってきているが、microRNA レベルでは未だほとんど解明されていない。本研究

究では遺伝子変異型の異なる肺腺癌に特徴的な microRNA を抽出できるか調べ、抽出可能であれば、パスウェイ解析などによりその働きを探りたい。

- (2) 肺神経内分泌癌の予後を決定する因子は病理形態学的レベル、免疫組織化学的レベル、mRNA レベルでも確立されたものはない。また有効な分子標的治療薬もなく、microRNA レベルでの分類および治療戦略づくりが特に期待されている。本研究においては、肺腺癌を対照とし microRNA レベルで肺神経内分泌癌を解析していきたい。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

がん研究所に保存されている手術凍結検体を用いる。インフォームド・コンセントは既に得られている。肺腺癌 81 例、肺神経内分泌癌 45 例 (小細胞癌 35 例、大細胞神経内分泌癌 10 例)、15 例の他臓器癌肺転移の正常肺成分を検索対象とする。また肺腺癌 81 例は既に EGFR 変異、KRAS 変異、ALK 転座の有無が調べられており、内訳は EGFR(+)39 例、KRAS(+)6 例、ALK(+)9 例、EGFR(-)KRAS(-)ALK(-)27 例である。肺腺癌 81 例のうち 46 例を test 症例・・・EGFR(+)23 例、KRAS(+)3 例、ALK(+)5 例、EGFR(-)KRAS(-)ALK(-)15 例、35 例を validation 症例・・・EGFR(+)16 例、KRAS(+)3 例、ALK(+)4 例、EGFR(-)KRAS(-)ALK(-)12 例とする。

### (2) 方法

- ① microRNA マイクロアレイによって網羅的に microRNA 発現を調べる。マイクロアレイにはアジレント・テクノロジー株式会社の Human miRNA マイクロアレイ 8×15K miRBase 12.0 対応版を用いる。このマイクロアレイによって 866 種類のヒト microRNA および 89 種類のヒトウイルス microRNA の発現を網羅的に調べることができる。
- ② 発現解析にはアジレント・テクノロジー株式会社の GeneSpring GX、パスウェイ解析には Ingenuity System 社の Ingenuity Pathways Analysis を使用する
- ③ 得られた microRNA マイクロアレイデータが信頼できるものか検証するために、注目する microRNA についてリアルタイム PCR により validation をする。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

- ① EGFR 変異に特徴的な microRNA、KRAS 変異に特徴的な microRNA、ALK 転座に特徴的な microRNA を正常肺との比較により、抽出した。(test 症例で有意差があり、かつ

validation 症例でも有意差があったものを選んだ)

EGFR 変異に特徴的なもの: 17 microRNA (トップ 5 は miR-330-3p, miR-196b, miR-151-3p, miR-744, miR-628-5p)

KRAS 変異に特徴的なもの: 2 microRNA (miR-492, miR-191)

ALK 転座に特徴的なもの: 13 microRNA (トップ 5 は miR-100\*, miR-376a\*, miR-154\*, miR-323-3p, miR-656)

それぞれの変異に特徴的な microRNA をそれぞれの変異を持たない肺癌との比較によって抽出しようとしたところ、EGFR 変異と KRAS 変異に特徴的な microRNA は抽出されず、ALK 転座に特徴的な 3 個の microRNA が抽出された(miR-100\*, miR-100, miR-485-5p)。

この 3 個の microRNA についてリアルタイム PCR を施行した所、いずれも有意差を持って、リアルタイム PCR の結果とマイクロアレイの結果が関連していた。

② 正常肺との比較でそれぞれの変異に特徴的だった microRNA を使用し、それらに特徴的なパスウェイを解析した。

EGFR 変異に特徴的であった 17 個の microRNA からは p70S6K Signaling、EGF Signaling などのパスウェイが、KRAS 変異に特徴的であった 2 個の microRNA からは Clathrin-mediated Endocytosis Signaling、EGF Signaling などのパスウェイが、ALK 転座に特徴的であった 13 個の microRNA からは RANK Signaling in Osteoclasts、CD27 Signaling in Lymphocytes などのパスウェイが特徴的なパスウェイとして抽出された。

③ 肺腺癌 81 例と正常肺 15 例に肺小細胞癌 35 例を加えて階層クラスタリングを施行した。小細胞癌は小細胞癌だけで独立した群を形成する SCLC1 群(21 例)と肺腺癌とともに群を形成する SCLC2 群(14 例)の 2 群にクラスタされた。Kaplan-Meier 生存曲線では、小細胞癌だけで独立したクラスタを形成した SCLC1 群は腺癌とともにクラスタされた SCLC2 群よりも有意に予後が悪かった (P = 0.039)。

## (2) 考察

① microRNA マイクロアレイにより、EGFR 変異、KRAS 変異、ALK 転座に特徴的な microRNA を抽出した。さらにパスウェイ解析を追加することで、抽出された microRNA の働きを探った。抽出された microRNA は microRNA を標的とする治療に応用できる可能性があるため、公開マイクロアレイデータを使った validation や細胞株レベルの実験

などによって、さらなる検討が必要である。

② microRNA 発現レベルの解析で、肺小細胞癌が予後に有意に差のある 2 群に分類されたのは、非常に興味深い。2 群で特徴的に発現差のある microRNA は診断・治療に応用できる可能性があるため、同様に公開マイクロアレイデータを使った validation や細胞株レベルの実験による、さらなる検討を要する。

## 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 8 件)

- ① Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the Epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? Arch Pathol Lab Med. 134(1):66-72, 2010  
<http://www.archivesofpathology.org/doi/full/10.1043/2008-0586-RAR1.1>
- ② Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T, Ishikawa Y. Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. Lung Cancer. 70(1):94-102, 2010  
DOI: 10.1016/j.lungcan.2010.01.001
- ③ Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. Clin Exp Metastasis. 27(6):389-97, 2010  
DOI: 10.1007/s10585-010-9313-4
- ④ Yuasa T, Urakami S, Yamamoto S, Yonese J, Nakano K, Kodaira M, Takahashi S, Hatake K, Inamura K, Ishikawa Y, Fukui I. Tumor Size is a Potential Predictor of the Response to Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Cancer. Urology. 77(4): 831-5, 2011  
DOI: 10.1016/j.urology.2010.12.008
- ⑤ Inamura K, Kumasaka T, Furuta R, Shimada K, Hiyama N, Furuhashi Y, Tanaka I, Takemura T. Mixed squamous cell and glandular papilloma of the lung: A case study and literature review. Pathol Int. 61(4):252-8, 2011  
DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02659.x
- ⑥ 稲村健太郎, 元井紀子, 石川雄一. トランスクリプトームによる病態解析. 病理と臨床, 29(臨時増刊号): 522-8, 2011
- ⑦ Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T,

Ninomiya H, Inamura K, Ishikawa S, Ushijima M, Matsuura M, Jones MH, Shimane M, Nomura H, Ishikawa Y, Aburatani H. ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis. *Lung Cancer* 75(1):119-25, 2012

DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.05.028

- ⑧ Inamura K, Fujiwara M, Togashi Y, Nomura K, Mukai H, Fujii Y, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I, Ishikawa Y. Diverse fusion patterns and heterogeneous clinicopathological features of renal cell carcinoma with t(6;11) translocation. *Am J Surg Pathol*: 36(1):35-42, 2012  
DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182293ec3

[学会発表] (計 28 件)

- ① 大場岳彦, 他. miRNA 発現プロファイリングによる予後良好な肺小細胞癌の同定. 第 99 日本病理学会総会, 東京, 2010 年 4 月 27-29 日
- ② 稲村健太郎, 他. 肺腺癌の相互排他的遺伝子異常と臨床病理組織像. 第 99 日本病理学会総会, 東京, 2010 年 4 月 27-29 日
- ③ 元井紀子, 他. 若年者多発肺癌で、両肺腫瘍に異なる EML4-ALK 変異 variant を証明できた一例. 第 158 回日本肺癌学会関東部会, 東京, 2010 年 6 月 26 日
- ④ 元井紀子, 他. 神経内分泌腫瘍の幹細胞性と細胞分化マーカーの発現. 第 51 回日本肺癌学会総会, 広島, 2010 年 11 月 3-4 日
- ⑤ 荻田真, 他. 肺神経内分泌癌に対する高解像度 SNP アレイを用いたアレール解析. 第 51 回日本肺癌学会総会, 広島, 2010 年 11 月 3-4 日
- ⑥ 二宮浩範, 他. 肺腺癌における喫煙と遺伝子変異・ゲノムコピー数の関連について. 第 51 回日本肺癌学会総会, 広島, 2010 年 11 月 3-4 日
- ⑦ 佐藤征二郎, 他. EML4-ALK 陽性肺多形癌の 1 例. 第 160 回日本肺癌学会関東部会, 東京, 2011 年 3 月 12 日
- ⑧ 稲村健太郎, 他. TFEB 転座腎癌: 特徴的な臨床病理学的特徴を有する新規 variant(2 例) の発見. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 2011 年 4 月 28-30 日
- ⑨ 飯塚利彦, 他. 肺腺癌における長鎖 non-coding RNA MALAT-1 の発現解析. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 2011 年 4 月 28-30 日
- ⑩ 荻田真, 他. 肺神経内分泌癌に対する高解像度 SNP アレイを用いたゲノムインバランス解析. 第 100 回日本病理学会総会, 横

浜, 2011 年 4 月 28-30 日

- ⑪ Inamura K, et al. TFEB translocation renal carcinoma: Two cases of novel isoforms with unique clinicopathological feature. The AACR 102nd Annual Meeting 2011, Orlando, FL, April 2-6, 2011
- ⑫ Motoi N, et al. Evaluation of histologic accuracy on diagnosis and invasion of small-sized lung cancer using intra-operative frozen section. 14th World conference on lung cancer. Amsterdam, Netherlands, July 3-7, 2011
- ⑬ Motoi N, et al. Morphologic diversity of ALK-related lung adenocarcinoma; no correlation with chimeric variants. 14th World conference on lung cancer. Amsterdam, Netherlands, July 3-7, 2011
- ⑭ Hiramatsu M, et al. Assessment for underlying etiology of bronchioloalveolar carcinoma (BAC). Impacts of smoking habit and EGFR mutation. 14th World conference on lung cancer. Amsterdam, Netherlands, July 3-7, 2011
- ⑮ Saito Y, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of small cell lung cancer. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Nagoya, October 3-5, 2011
- ⑯ Motoi N, et al. Histology of ALK lung adenocarcinoma; assessment of correlation between pathologic subtype and genotype. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Nagoya, October 3-5, 2011
- ⑰ 元井紀子, 他. 肺病変における術中迅速組織診断の有用性と限界. 第 52 回日本肺癌学会総会, 大阪, 2011 年 11 月 3-4 日
- ⑱ Motoi N, et al. Assessment of Invasion Degree of Small Sized Lung Cancer Using Intra-Operative Frozen Section. USCAP Annual meeting 2012, Vancouver, Canada, March 17-23, 2012

[図書] (計 1 件)

- ① Inamura K, Ishikawa Y. *Lung Cancer. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention Cancer Report 2010*, Tuncer MA (ed), New Hope in Health Foundation, Turkey, 202-4, 2010

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/pathology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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・研究員

研究者番号：40442545

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし