

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 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790749

研究課題名（和文）喫煙者肺癌における発癌関連マイクロ RNA の探求

研究課題名（英文）Investigation of aberrant microRNA expression for smoking-induced lung carcinogenesis.

研究代表者

濱野 栄美 (HAMANO EMI)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：80466763

研究成果の概要（和文）：喫煙による肺癌発症の機序を、マイクロ RNA(miRNA)による制御の点から分子生物学的に検証し、異常な DNA メチル化により発現制御を受けている miRNA の同定、機能解析を行った。候補 miRNA を、in silico によるゲノム機能の解析、肺癌細胞株の脱メチル化剤処理、非小細胞肺癌手術検体の解析を組み合わせることで検索し、発現抑制を受けている miRNA を同定した。特に mir-34b 発現低下は肺癌のリンパ管浸潤の予測因子であり、浸潤能のマーカーとなり得ることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of smoking-induced lung carcinogenesis was explored in terms of alteration of microRNA expression by epigenetic regulation. Genome structure based screening was used to identify epigenetically silenced tumor suppressive miRNAs. The DNA methylation of mir-34b can be used as a biomarker for an invasive phenotype of lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

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、喫煙、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

喫煙が肺癌の発症に大きく関連していることはこれまでの疫学研究などから明らかであり、その分子生物学的研究は喫煙者肺癌の発症機序を知る上で重要である。

一方、癌治療においては、近年分子標的薬などの開発による治療法の発展が著明であり、癌種の分子生物学的特徴などを踏まえた個別化医療への必要性が高まってきている。

本研究では喫煙による肺癌発症の機序を、マイクロ RNA(miRNA)による制御に着目して分子生物学的に検証し、個別化医療の治療戦略や予後予測などのマーカー確立を目指した。MiRNAはゲノムにコードされる約22塩基長のsmall non-coding RNAであり、標的遺伝子の発現制御を介して発生や発癌を始めとする多様な生物現象に関与している。

ヒトの造血器腫瘍や固形癌で過剰発現ある

いは発現低下する miRNA が複数同定され、標的遺伝子の翻訳制御を介して miRNA が細胞増殖あるいは癌抑制に働くことが報告されている。

肺癌においても、miRNA マイクロアレイの解析で癌組織と非癌組織では miRNA 発現パターンが異なっていることが報告され、予後との相関の解析から let-7 や miR-155 などいくつかの miRNA の発現異常が肺腺癌の術後患者の予後不良因子として報告された。

これらの miRNA の発現抑制のメカニズムの一つとして DNA メチル化やヒストン N 末の化学修飾の変化などのエピジェネティクス異常が関係することが報告されている。

喫煙による肺癌発症において、異常な DNA メチル化により発現制御を受けている miRNA の同定、機能解析を行うことで、発癌との関連を検討し臨床的に有用なバイオマーカーを特定できると考えられた。

2. 研究の目的

喫煙者肺癌において、異常な DNA メチル化に伴い発現制御を受ける miRNA を網羅的に探索し、同定された miRNA について肺癌細胞株を用いて機能解析を行った。

また、肺癌手術検体を用いて、miRNA 発現異常と予後の関連を解析することにより、miRNA のメチル化のバイオマーカーとしての意義を検討した。

3. 研究の方法

(1) *In silico*による候補 miRNA の同定

DNA メチル化による発現制を受ける miRNA の候補を絞るために、*in silico* で候補を選択した。

選択の基準としては、① CpG アイランド内の miRNA、② CpG アイランドの下流 1k bp 以内にある miRNA、③ 5' に CpG アイランドを持つ host gene の intron 内に位置する miRNA のいずれかとした。

研究当初に定量が可能であった 687 の miRNA の配列を英国 Sanger 研究所の miRNA database (miRBase) より得て、UCSC Genome Bioinformatics Site を用いて CpG アイランドの有無を確認した。

(2) 肺癌由来細胞株および肺癌手術検体での miRNA 発現の評価

喫煙者肺癌由来細胞株 (H1650, H1755, LC1sq)、非喫煙者肺癌由来細胞株 (H1975, H2347)、および Calu-1 を 5-aza-CdR による脱メチル化剤処理を行い、RNA 抽出とクロマチン免疫沈降を行った。

miRNA の発現量は Taqman microRNA assay を用いてリアルタイム PCR により定量した。また、遺伝子の intron 内に位置する miRNA に

ついては、肺癌細胞株並びに正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) による host gene の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。

原発性肺癌手術検体は、東京大学医学部付属病院呼吸器外科で手術を行い、原発性非小細胞肺癌の診断がついた 97 症例、99 サンプル (2 症例は重複癌で病的に異なる 2 病変あり) を用いた。正常肺組織の解析は、硬化性血管腫の手術症例の正常肺組織部位を用いた。研究計画を東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会に申請、承認を受けたのち全患者より書面でのインフォームドコンセントを得て検体の採取を行った。肺癌手術検体より DNA、RNA 抽出を行い、リアルタイム PCR にて miRNA の発現量を定量した。

(3) DNA メチル化解析およびヒストン修飾解析

肺癌細胞株および NHBE の miRNA メチル化解析はメチル化感受性制限酵素法と bisulfite 処理法を用いて行った。mir-34b メチル化解析は HpaII 処理を行い、非処理 DNA 希釈系列とともにリアルタイム PCR で評価した。また、mir-34b、mir-126、mir-203、mir-139、mir-449a のメチル化解析は combined bisulfite restriction analysis (COBRA) および bisulfite sequence を用いて行った。肺癌手術検体でのメチル化解析には methylation specific PCR および combined bisulfite restriction analysis を行なった。肺癌細胞株および NHBE のヒストン修飾解析はクロマチン免疫沈降を行った。

(4) 標的遺伝子解析

細胞株への miRNA の強制発現を行うため、pol III promoter を用いた shRNA 発現プラスミドベクターの系を用いた。プラスミド U6pro/tet0/DNMT1 をテンプレートとし、U6pro/mir-34b/hygro、U6pro/mir-126*3/hygro を作成した。

miRNA 発現ベクターとコントロールベクターを A549 細胞と HEK293t 細胞にリポフェクションし、hygromycin による薬剤選択を行った。薬剤選択後、RNA 抽出、タンパク抽出を行った。c-MET と CrkII の発現をウエスタンブロットおよび RT-PCR で確認した。

(5) c-MET 遺伝子免疫染色

肺癌手術検体のパラフィン標本から tissue microarray を作成し、c-MET 抗体による免疫染色を行った。免疫染色の結果は 4 段階にスコア化して評価を行った。

4. 研究成果

In silico にて 55 種の候補 miRNA を選定し、NHBE を対照とし肺癌細胞株で発現が抑制され脱メチル化剤処理で誘導が認められる 14 種の miRNA を同定した。喫煙者肺癌由来細胞株と非喫煙者肺癌由来細胞株の間で発現パ

ターンに大きな違いは認められなかった。このうち 7 種の miRNA (mir-34b、mir-126、mir-203、mir-30e、mir-449、mir-486、mir-139) が肺癌臨床組織検体で高頻度に発現抑制を伴っていた。mir-34b、mir-126、mir-203 は CpG アイランド内に位置しており、特に mir-34b は大腸癌において高頻度にメチル化を受けることが報告されていた。HpaII PCR によるメチル化の定量を行ったところ肺癌細胞株ではしばしば mir-34b のメチル化が認められ、特にもっとも発現が低下していた H2347 と LC1sq では完全にメチル化していた。また、H2347 と LC1sq に脱メチル化処理を行ったところ mir-34b の発現が誘導された。このため肺癌においても mir-34b は DNA メチル化により発現制御を受けていると考えられた。一方、Mir-203 では CpG アイランドはわずかなメチル化しか認められなかった。

Mir-126 は CpG アイランド内に位置すると共に EGFL7 遺伝子のイントロン内に位置している。EGFL7 には複数の transcript variant が存在するが、1 つの variant が NHBE と 6 種の肺癌細胞株すべてで発現が認められ、mir-126 とのこの transcript の発現量に強い相関が認められた。mir-126 との EGFL7 transcript の発現が特に低かった H1597 と Calu-1 において、EGFL7 の 5' 側にある CpG アイランドの一部が DNA メチル化を受けていた。COBRA 法による解析から、mir-126 は近傍の CpG アイランドではなく host gene である EGFL7 の DNA メチル化による発現制御を受けていると考えられた。

また、イントロン内に位置する mir-30e、mir-449、mir-486、mir-139 についても、host gene との発現量の関連を調べた。Mir-139、mir-449 については host gene と発現量の相関を認めたものの、host gene の 5' 側の CpG アイランドのメチル化は低レベルであった。このことから、今回の臨床肺癌組織検体における検討では mir-34b、126 が DNA メチル化による発現抑制を受けていることが示された。

更に mir-34b と mir-126 の発現制御にかかわるヒストン修飾解析としてクロマチン免疫沈降を行った。NHBE では mir-34b の 5' 側に H3K4me3 のピークが認められたが、DNA が完全にメチル化されている LC1sq ではピークが認められず、LC1sq の脱メチル化処理でこのピークが出現した。Mir-126 では H3K4me3 のピークが DNA メチル化のない NHBE と LC1sq で認められ、DNA メチル化の強い H1975 と Calu-1 では非常に小さなピークとなっていた。このピークのゲノム上の位置は H1975 と Calu-1 で DNA メチル化が認められた部位と一致しており、EGFL7 の転写開始点近傍の DNA メチル化が mir-126 と EGFL7 の発現を制御し

ていると考えられた。

次に miRNA の標的遺伝子解析を行った。Mir-34b の標的遺伝子候補の一つに c-MET があり、肺癌を含む多くの癌でがん遺伝子として機能していることに注目した。U6 プロモーターを用いた miRNA 発現系を用いて、A549 に mir-34b を導入したところ c-MET の mRNA およびタンパクの発現低下が認められた。また、H2347 では mir-34b は完全にメチル化されていたが、H2347 を脱メチル化処理すると c-MET タンパクの低下が認められた。Mir-126 の標的遺伝子としては、Crk 遺伝子の高発現と肺腺癌の浸潤性との関連が報告されていることから、評価を行った。HEK293t 細胞に mir-126 を導入すると、Crk の mRNA 量に変化はなくタンパクの低下を認めた。

続いて肺癌手術検体で mir-34b と mir-126 の DNA メチル化の解析を行った。99 例中、腺癌が 80 例、扁平上皮癌が 18 例、腺扁平上皮癌が 1 例だった。リンパ節転移を伴わない T1 が 41 例、リンパ節転移を伴う T1 が 14 例、リンパ節転移を伴わない T2 が 27 例、リンパ節転移を伴う T1 が 17 例であった。メチル化の評価が可能であった 96 例中、mir-34b のメチル化は 40 例、mir-126 のメチル化は 7 例で認められた。Mir-34b のメチル化が c-MET の発現量にもたらす影響を検討するために 89 例で c-MET の免疫染色を行った。Mir-34b のメチル化と c-MET の発現間に相関は認められず、これは遺伝子増幅などの他の要因が c-MET の発現量により強く関わっていることなどが推測された。一方、mir-34b のメチル化は c-MET 陽性ととも、リンパ管浸潤と関連しており、多変量解析の結果、mir-34b メチル化と c-MET 陽性はいずれも独立したリンパ管浸潤の危険因子と考えられた。喫煙歴による発現の違いに関してはこれらの miRNA では明らかな差が認められなかった。

更に臨床検体を用いて、これまでに肺癌との関連が報告されたものを含む別の 5 種の miRNA (mir-152、mir-9-3、mir-124-1、mir-124-2、mir-124-3) のメチル化と発現量の関連を検討したところ、複数の領域でのメチル化は、進んだ T 因子の危険因子となり、無再発生存期間の短縮と関連が認められた。個別の miRNA との関連は認められなかったことから、特定の miRNA の機能異常によるものより、異常な DNA メチル化の蓄積が癌の進行を反映したものと考えられた。

喫煙歴による発現の違いに関してはこれらの miRNA では明らかな差が認められず引き続き解析を行っている。本研究では喫煙による肺癌発症機序を miRNA 制御の観点から検索を開始したが、より広範な臨床肺癌組織検体で認められるエピジェネティクス異常が示された。特に mir-34b はリンパ管浸潤のバイオマーカーとして肺癌術後化学療法の必要性

を判断する際の一助となる可能性があり、術後経過の追跡で確認してゆきたい。このように肺癌の様々な形質を規定する新たな miRNA の解析を進めることで、より精度の高い肺癌の分類が可能となり個別化医療への一助となることが期待される。

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 2 件)

- ① Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2012 Jun 1;130(11):2580-90. doi: 10.1002/ijc.26254. 査読あり
- ② Kitano K, Watanabe K, Emoto N, Kage H, Hamano E, Nagase T, Sano A, Murakawa T, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2011 Dec;102(12):2126-31. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02101.x. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kitano K, Hamano E *et al.* CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and the recurrence of non-small cell lung cancer. AACR-IASLC Joint Conference on THE MOLECULAR ORIGINS OF LUNG CANCER. 2012 年 1 月 9 日 San Diego Marriot Hotel & Marina(アメリカ)
- ② Watanabe K, Hamano E *et al.* Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small cell lung cancer. AACR-IASLC Joint Conference on THE MOLECULAR ORIGINS OF LUNG CANCER. 2012 年 1 月 10 日 San Diego Marriot Hotel & Marina(アメリカ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱野 栄美 (HAMANO EMI)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：80466763