

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659267

研究課題名(和文) 肺がんにおける染色体不安定化と臨床・病理学的特徴，抗がん剤感受性の関連の検討

研究課題名(英文) Chromosomal instability and Clinico-pathological feature in Lung Cancer

研究代表者

高井 大哉 (Takai, Daiya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：当初予定した遺伝子について肺がん細胞株18株で突然変異が見られなかったため，研究対象を変更した．mRNAの3'非翻訳領域(3'UTR)はマイクロRNAが結合することにより翻訳の調節を行う転写後発現調節に関与していることが近年明らかにされている．また，様々ながんでマイクロRNAの発現異常と，がん化やがんの性質が変わることも報告されている．最近がんにおいてmRNAの短縮が起きることが報告され，またmRNAの3'UTRを安定させる分子も報告された．そこでわれわれは肺がんにおいて短縮する遺伝子を検索し，10個の遺伝子を用いて，3'UTRの短縮が起ると，肺がんの術後再発の頻度が増えることを明らかにした．

研究成果の概要(英文)：We changed study design because several genes showed no mutation included in original study design. Thus we analyzed 3' untranslated region (3'UTR) of mRNA that was revealed to be shortened in cancers. 3'UTR is important in post transcriptional regulation of genes and it is known as a target of microRNAs. We firstly analyzed lung cancer specifically shorten mRNA using computational analyses of opened microarray data. We choose ten genes which are shortened in lung cancer and evaluated their status in clinical specimens using with quantitative RT-PCR. We revealed that increase of gene number of 3'UTR shortening is strongly associated post surgical recurrence in lung cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：肺がん

1. 研究開始当初の背景

原発性肺がんでは、以前からがん抑制遺伝子の p53 の変異や p16 の変異・欠失・プロモーターのメチル化などが報告されていたが、がん化に直接つながる変化としては、KRAS の突然変異程度しか知られていなかった。ところが 2004 年に、上皮成長因子受容体(EGFR)阻害薬(EGFR-TKI)の奏功例で、EGFR-TKI の標的因子である EGFR それ自体に突然変異が 3 つの研究グループから報告され[Lynch TJ NEJM 2004; Paez JG Science 2004; Pao W PNAS2004]、変異型の EGFR に細胞をがん化する活性があることが明らかにされた。これ以降、様々なチロシンキナーゼについて精力的な研究が行われた結果、2007 年本邦の曾田・間野らにより EML4-ALK の融合遺伝子が染色体転座によって生じることが報告され[Soda M Nature 2007]、造血系腫瘍や肉腫でしか知られていなかった染色体転座が固形がんでは認められることと併せて、大きな衝撃を与えた。2011 年に、染色体異常に関わる遺伝子としてコヒーシンのサブユニットである STAG2 の突然変異が、神経膠芽腫、ユーイング肉腫、悪性黒色腫で報告され[Solomon DA Science 2011]、肺がんにおける染色体転座などの原因として、これらの分子の寄与が疑われたため、本研究を立案した。

2. 研究の目的

肺がんでも、次第に知見が蓄積されつつある染色体転座の原因遺伝子として、コヒーシンを構成する STAG2, SMC1A, SMC3, RAD21 などについて突然変異を検索するとともに、これらのコヒーシン構成因子の変異と抗がん剤感受性の関係についても検討を加えることとした。

3. 研究の方法

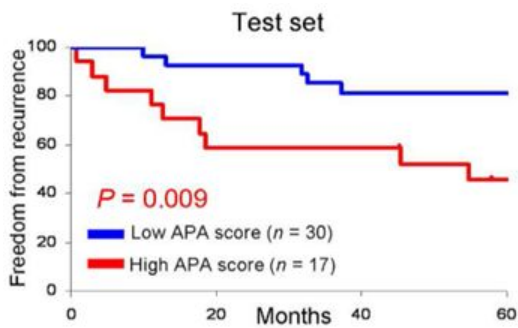
はじめに、肺がん細胞株で NCI-H661 など、アメリカ培養株コレクション(ATCC)ですでに染色体数の異常(aneuploidy)のある 18 株での検索を行ったところ、突然変異が見られな

かったため、研究の方針を転換した。2009 年にがんにおける mRNA の 3'非翻訳領域(3'UTR)の短縮が報告され[Mayr C Cell 2009]、2012 年に PABPN1 遺伝子に mRNA の 3'UTR を安定させる働きが明らかにされ[Jenal M Cell 2012]、肺がんにおける mRNA の 3'UTR の状況と、PABPN1 など 3'UTR 維持に関わる遺伝子の発現状況を検討することとした。なお 3'UTR はマイクロ RNA の結合部位として、遺伝子の転写後の制御に関わっており、申請者らは以前より、肺がんにおけるマイクロ RNA の異常と術後再発頻度の関係について報告をしている[Kitano K Cancer Sci 2011; Watanabe K Int J Cancer 2012]。

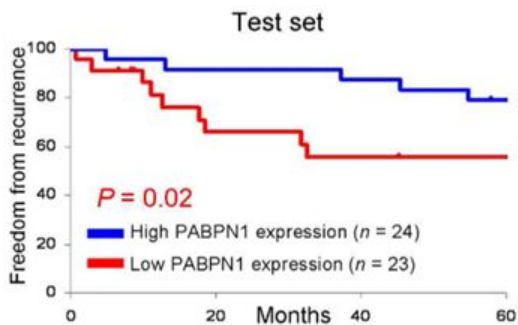
まず、原発性肺がん 3'UTR の短縮が見られる遺伝子を網羅的に検討するために、計算生物学的手法として、統計パッケージ R 上の Bioconductor の module である Rmodel [Salisbury J Plos One 2009]を用いて、アメリカ生物情報センター(NCBI)の遺伝子発現プロフィール(肺腺がん 40 例、肺扁平上皮がん 18 例、正常肺 3 例)を比較して、3'UTR の短縮している遺伝子を同定した。頻度が上位 10 位以内の遺伝子について、遺伝子のコーディング領域と 3'UTR について RT-PCR を行い、発現状態を検討することとした。Test set として、原発性肺がん 47 例と正常肺 4 例を用いて、3'UTR の短縮遺伝子数 (alternative polyadenylation score, APA score)を検討した。また、PABPN1 についても RT-PCR によって発現量を検討した。これらの情報と、臨床病理データについて検討を加えた。

4. 研究成果

Test set の 47 例において、10 遺伝子の 3'UTR の短縮(APA score)について検討をしたところ、APA score のカットオフ値を 4.5 とすると、術後再発の感受性が 69%、特異度が 76%となり、有効なマーカーとなることが示された。また、PABPN1 の発現低下も APA score の高いものでみとめられた。

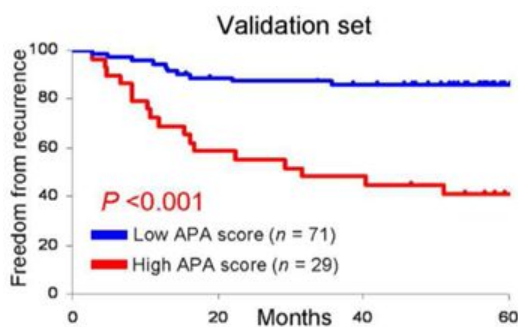


Test set 47 例の APA score と無再発期間の関係

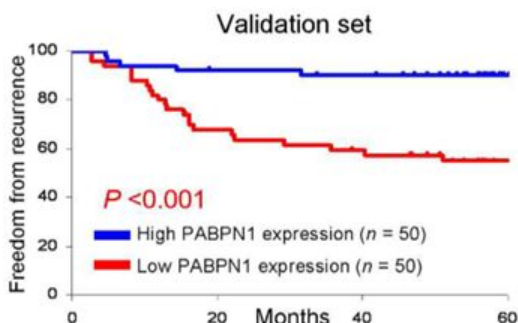


Test set 47 例の PABPN1 の発現と無再発期間

さらに Validation set として原発性肺がん 100 例と正常肺 6 例について検討を加えたところ、同様に APA score 5 以上と PABPN1 の発現低下で有意に術後再発が高頻度に認められた。



Validation set 100 例の APA score と無再発期間



Validation set 100 例の PABPN1 の発現と無再発期間短縮

また、多変量解析では APA score の高い症例では FDG-PET での原発巣のシグナルが強かった。

これらのことから、mRNA の 3'UTR の短縮と術後再発との間に強い関係が認められた。また、3'UTR の維持に関わる PABPN1 の発現低下も、術後再発と強く相関していた。これらの結果を発表するとともに、肺がん細胞における PABPN1 の機能解析や転写制御機構を現在解析しており、PABPN1 の発現誘導による肺がんの治療効果のさらなる改善へとつながることが期待できる。

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 12 件)

1. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. 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. **Int J Cancer** 130(11):2580-2590, 2012

2. Pulmonary Venous Invasion, Determined by Chest Computed Tomographic Scan, as a Potential Early Indicator of Zygomycosis Infection: A Case Series. Kitagawa H, Watanabe K, Kage H, Inoh S, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D. **J Thorac Imaging** 27(4):W97-99, 2012

3. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1 and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, Sasaki H, Uozaki H, Fukayama M, Seto Y, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. **Jpn J**

Clin Oncol. 42(2):148-152, 2012

4. Growth-associated hyperphosphatemia in young recipients accelerates aortic allograft calcification in a rat model. Yamauchi H, Motomura N, Chung UI, Sata M, Takai D, Saito A, Ono M, Takamoto S. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 145(2):522-530, 2013

5. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1 family polypeptide A1 gene (UGT1A1) polymorphisms are associated with toxicity and efficacy in irinotecan monotherapy for refractory pancreatic cancer. Takahara N, Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Satoh Y, Takai D, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Miyabayashi K, Mohri D, Kawakubo K, Kogure H, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Ijichi H, Tada M, Yatomi Y, Koike K. **Cancer Chemother Pharmacol.** 71(1): 85-92, 2013

6. High-grade lung adenocarcinoma with fetal-lung-like morphology – Clinicopathological, immunohistochemical, and molecular analyses of 17 cases. Morita S, Yoshida A, Goto A, Ota S, Tsuta K, Yokozawa K, Asamura H, Nakajima J, Takai D, Mori M, Oka T, Tamaru J, Itoyama S, Furuta K, Fukayama M, Tsuda H. **American J of Surg. Pathology.** 37(6):924-932, 2013

7. FER overexpression is associated with poor postoperative prognosis and cancer-cell survival in non-small cell lung cancer. Kawakami M, Morita S, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Watanabe K, Hamano E, Ohishi N, Nakajima J, Yatomi Y, Nagase T, Fukayama M, Takai D. **Int J Clin Exp Pathol.** 6(4):598-612, 2013

8. A pilot study of salvage irinotecan monotherapy for advanced biliary tract cancer. Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Takahara N, Satoh Y, Takai D, Kogure H, Yamamoto N, Hirano K, Tada M, Yatomi Y, Koike K. **Anticancer Res.** 33(6):2619-2622, 2013

9. Combined Large Cell Neuroendocrine

Carcinoma and Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in a Female Patient Who Never Smoked. Yoshida Y, Ota S, Murakawa T, Takai D, Nakajima J. **Ann Thorac Cardiovasc Surg.** 2013 Epub ahead

10. Detection of novel paraja ring finger 2-fer tyrosine kinase mRNA chimeras is associated with poor postoperative prognosis in non-small cell lung cancer. Kawakami M, Ishikawa R, Amano Y, Sunohara M, Watanabe K, Ohishi N, Yatomi Y, Nakajima J, Fukayama M, Nagase T, Takai D. **Cancer Sci.** 104(11): 1447-1454, 2013

11. Successful Treatment of Mediastinal Unicentric Castleman's Disease Using Video-Assisted Thoracoscopic Surgery with Preoperative Embolization. Amano Y, Takai D, Ohishi N, Shinozaki-Ushiku A, Fukayama M, Akahane M, Nakajima J, Nagase T. **Case Rep Med.** 2013: 354507, 2013

12. Disruption of the expression and function of microRNAs in lung cancer as a result of epigenetic changes. Watanabe K & Takai D. **Frontiers in Genetics** 4: 275, 2013

{学会発表}(計 5件)

1. Vandetanib Can Overcome the Acquired Resistance to Gefitinib Due to RET Overexpression in Lung Cancer. Sunohara M, Kawakami K, Watanabe K, Morita S, Kage H, Amano Y, Fukayama M, Nagase T, N. Ohishi N, Takai D. The 24th EORTC-NCI-AACR Symposium on 'Molecular Targets and Cancer Therapeutics' Nov 6th –Nov 9th, 2012, Dublin, Island

2. Identification of FER as a New Molecular Target in Non-small Cell Lung Cancer Kawakami M, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Watanabe K, Hamano E, Ohishi N, Nagase T, Yatomi Y, Takai D. The 24th EORTC-NCI-AACR Symposium on 'Molecular Targets and Cancer Therapeutics' Nov 6th –Nov 9th, 2012,

Dublin, Island

3. Loss of PABPN1 and alternative polyadenylation yield poor prognosis in non-small cell lung cancer. Ichinose J, Watanabe K, Sano A, Nagase T, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 6th – Jan 9th, 2014, San Diego, CA, USA

4. Can lung cancer with overexpression of RET-proto oncogene be a good candidate for vandetanib treatment? Sunohara M, Morita S, Kawakami M, Watanabe K, Kage H, Amano Y, Ishikawa R, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 6th – Jan 9th, 2014, San Diego, CA, USA

5. Histone methylation-mediated silencing of mir-139 enhances an aggressive phenotype of non-small cell lung cancer. Watanabe K, Sunohara M, Amano Y, Ishikawa R, Ichinose J, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Nagase T, Ohishi N, Takai D. AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer Jan 6th – Jan 9th, 2014, San Diego, CA, USA

〔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〕

ホームページ等

<http://kokyuki.umin.jp/305.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 大哉 (TAKAI, Daiya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90361493

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし