

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460469

研究課題名(和文) 肺癌におけるlong noncoding RNAの発現解析

研究課題名(英文) Expression of long noncoding RNA in lung adenocarcinoma

研究代表者

飯塚 利彦 (IIZUKA, Toshihiko)

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：80323707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Long noncoding RNA (lncRNA)であるHOTAIRはポリcomb蛋白質EZH2と核内で結合し、遺伝子発現をエピジェネティックに調整して発癌に関与していると考えられている。我々は、肺腺癌手術83例におけるHOTAIRの発現をqRT-PCR法で、EZH2の発現をqRT-PCRおよび免疫染色で検討し、種々の臨床病理学的因子との関連を検討した。HOTAIRおよびEZH2の発現は肺腺癌の組織学的分化度と関連しており、更に両者を合わせて測定することで非常に正確な予後マーカーとなることがわかった。

以上の結果はlncRNAが肺腺癌の診断、予後予測マーカーとしての有用性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR epigenetically regulates the expression of various genes through recruiting the polycomb protein EZH2 to the target genome locus. We examined the expression of HOTAIR and EZH2 in 83 resected cases of lung adenocarcinoma by qRT-PCR and immunohistochemistry. We found that the expression of both genes were associated with the histological grade of adenocarcinoma and were associated with prognosis. Furthermore, we found that more accurate prediction of prognosis is possible by measuring the expression of both genes.

研究分野：病理診断

キーワード：肺癌 long noncoding RNA

1. 研究開始当初の背景

noncoding RNA のうち、200 塩基以上の長さのものは、Long noncoding RNA(lncRNA)と呼ばれている。現在、ゲノム上に 15000 個程度の lncRNA が存在すると推測されている。その多くについては機能が不明であるものの、いくつかの lncRNA については、近年発癌への関与を示唆する報告がなされている。

lncRNA HOTAIR はポリコム蛋白質 EZH2 と結合し、EZH2 をゲノム上の種々のターゲット遺伝子にリクルートし、ターゲット遺伝子をエピジェネティックに制御することにより発癌に関与することが知られている。

また lncRNA MALAT-1 は核内構造物である speckle に局在し、種々の遺伝子転写産物のスプライシングに関与することが知られている。更に I 期の非小細胞肺癌において、その高発現が予後不良因子であることが知られている。

肺腺癌の発癌におけるこれら lncRNA の役割についての詳細は不明である。またこれらの発現と遺伝子変異や予後、組織像等、種々の臨床病理学的因子との関連は不明である。

2. 研究の目的

(1) lncRNA HOTAIR や MALAT-1 の肺癌病理診断マーカー、予後予測マーカーとしての有用性について検討する。

(2) 遺伝子変異と lncRNA 変化の関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 83 例の肺腺癌手術症例の凍結材料を用いて、HOTAIR および MALAT-1 の発現量を qRT-PCR で測定した。またポリコム遺伝子 EZH2 の発現を qRT-PCR および病理標本の免疫染色で測定した。これらの発現データと、腺癌の組織像、予後等の臨床病理学的因子との関連を検討した。

(2) in situ mRNA hybridization により MALAT-1 の発現を肺腺癌の FFPE 標本において検討した。

(3) KRAS 遺伝子変異を有する肺腺癌細胞株である A549 において、siRNA により KRAS 発現を抑制し、それにより MALAT-1 の発現が変化するかについて検討した。

4. 研究成果

(1) 83 例の肺腺癌手術例の検討で、qRT-PCR では、HOTAIR および EZH2 の発現は、いずれも肺癌組織において、正常肺組織に比べ高発現であった(図 1)。また免疫染色で EZH2 の発現が癌細胞に確認され、背

景組織での発現は僅かであった(図 2)。HOTAIR および EZH2 の発現は high grade な組織像と有意な関連を示した。

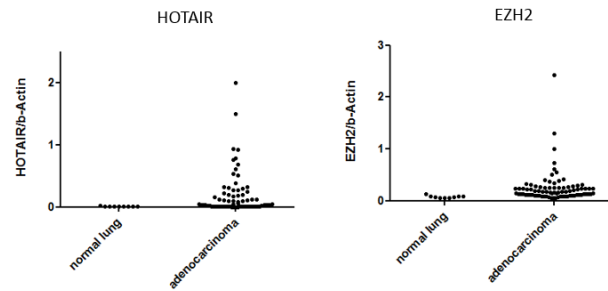


図 1 肺腺癌および正常肺における HOTAIR、EZH2 の発現(qRT-PCR)

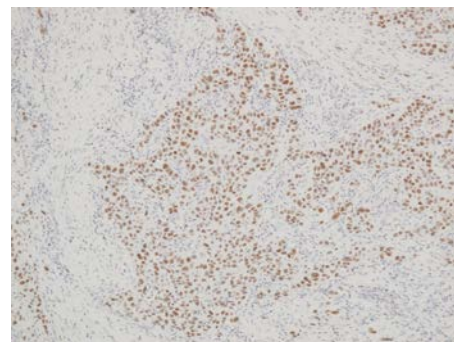


図 2 肺腺癌における EZH2 の発現(免疫染色)

(2) 54 例の I 期肺腺癌での検討で、HOTAIR および EZH2 の高発現はいずれも予後不良因子であり、また両者を組み合わせることで、より正確な予後予測が可能となることがわかった(図 3)。

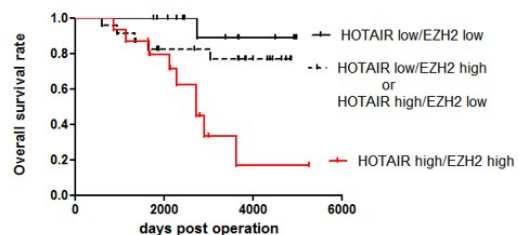


図 3 HOTAIR および EZH2 の発現と、I 期肺腺癌症例の予後の関連

(3) 83 例の肺腺癌手術例の検討で、qRT-PCR で測定した MALAT-1 の発現は、正常肺組織に比べ高発現であった(図 4)。組織標本を用いた MALAT-1 の in situ mRNA hybridization では、癌細胞の核内に dot 状に染色され(図 5)、一方背景の非腫瘍性上皮細胞での染色は僅かであった。

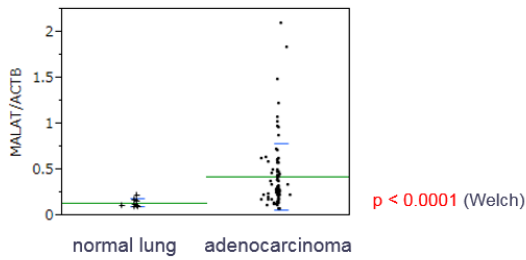


図4 肺腺癌および正常肺におけるMALAT-1の発現(qRT-PCR)

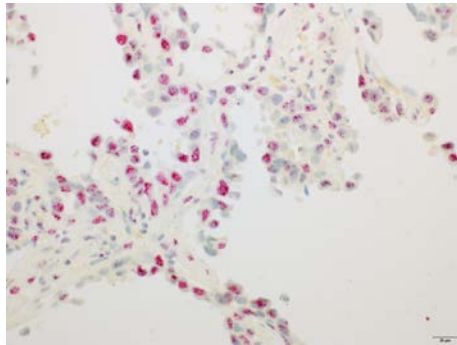


図5 in situ mRNA hybridizationによる肺腺癌細胞におけるlncRNA MALAT-1の発現の検出

- (4) 54例の肺腺癌手術例の検討で、MALAT-1の発現は、予後との有意な関連は見られなかった。しかし、KRAS変異陽性例に限局すると、MALAT-1の高発現は有意な予後不良因子であった(図6)。

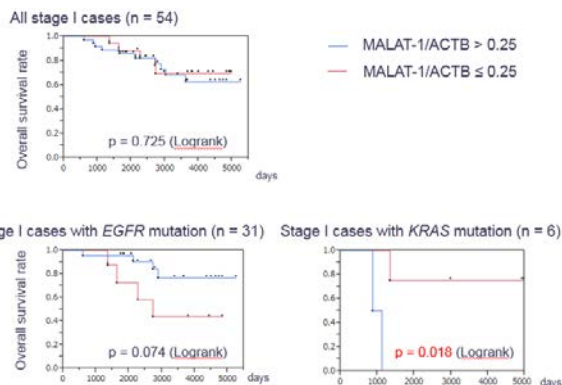


図6 I期肺腺癌におけるMALAT-1の発現と予後の関連

- (5) KRAS遺伝子変異陽性例では、陽性例に比べMALAT-1の発現が有意に低値であった。KRAS変異を有する肺腺癌細胞株A549において、siRNAによりKRAS発現を抑制すると、MALAT-1の発現が有意に上昇した。

(6) 以上から、以下の結論を得た。

- ① lncRNA HOTAIRはI期肺腺癌において、有意な予後予測因子であると考えられる。またポリコーム遺伝子EZH2の発現と組み合わせて測定することにより、より正確な予後予測が可能となる。
- ② lncRNA MALAT-1はKRAS変異と協調して発癌に関与している可能性がある。
- ③ MALAT-1のin situ mRNA hybridizationの肺腺癌の病理診断での有用性が示唆される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

飯塚利彦、長野裕子、野村紀美恵、石川雄一、肺腺癌および周囲肺組織における長鎖非コードRNA MALAT-1の発現、第105回日本病理学会総会、仙台、2016年5月

飯塚利彦、長野裕子、野村紀美恵、元井紀子、石川雄一、肺腺癌での長鎖非コードRNA HOTAIRおよびポリコーム遺伝子EZH2の発現-組織像、予後との関連、第104回日本病理学会総会、名古屋、2015年4月

飯塚利彦、石川雄一、肺腺癌での長鎖非コードRNA HOTAIRおよびポリコーム蛋白質EZH2の発現-組織像、予後との関連、第17回日本RNA学会、札幌、2015年5月

飯塚利彦、長野裕子、野村紀美恵、元井紀子、奥村栄、石川雄一、肺腺癌におけるlncRNA MALAT-1の発現とKRAS変異の関連、第73回日本癌学会総会、横浜、2014年9月

飯塚利彦、長野裕子、野村紀美恵、元井紀子、石川雄一、肺腺癌における長鎖noncoding RNA MALAT-1の発現とKRAS遺伝子変異の

関連、第 103 回日本病理学会総会、広島、2014
年 4 月

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 利彦 (IIZUKA, Toshihiko)
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：80323707

(2) 研究分担者

石川 雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)
公益財団法人がん研究会がん研究所・
病理部・部長

研究者番号：80222975