

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830098

研究課題名(和文) 肺がんにおける3'非翻訳領域短縮による転写後制御の破綻と臨床的悪性度の相関の解明

研究課題名(英文) Alternative polyadenylation in lung cancer

研究代表者

渡邊 広祐 (Watanabe, Kousuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50644291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年がんにおいて3'UTRが短縮し(Alternative polyadenylation, APA)、miRNA結合部位が失われることで、miRNAを介した転写後制御が破たんするとの報告がなされた。肺がんにおけるAPAの全貌を明らかにするために、公開されているマイクロアレイデータベースを利用し、肺がんにおいて最もAPAを生じている遺伝子を同定した。肺がん手術検体を用いて解析すると、APAは肺がんの独立した予後不良因子となっており、さらにはPABPN1低発現と増殖マーカー高発現がAPAと相関していた。本研究により肺がんにおけるAPAの全体像が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Alternative polyadenylation (APA), which induces shortening of the 3'UTR, is emerging as an important phenomenon in gene regulation. We identified 10 genes showing significant 3'UTR shortening in lung cancer, using the package of the Bioconductor for probe-level analyses of expression microarrays. We established and evaluated the APA score by quantitative RT-PCR in clinical specimens of non-small cell lung cancer, and found that high APA score was an independent prognostic factor. In addition, both lower expression of PABPN1 and higher expression of the proliferation markers were correlated with high APA scores and a poor prognosis. These results suggest that the loss of PABPN1, a suppressor of APA, might promote tumor aggressiveness by releasing the cancer cells from microRNA-mediated gene regulation.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺がん マイクロRNA 選択的ポリアダニル化 転写後制御

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) への結合を介して標的遺伝子の発現を抑制し、発生や細胞増殖、発がんなど多くの生命現象に関与している。多くのがんにおいて miRNA の発現が変化しており、がん遺伝子もしくはがん抑制遺伝子として機能する miRNA が数多く報告されている。がんにおいては発現が増加する miRNA も報告されているものの、概して発現が低下する miRNA が多いことが知られており、様々な miRNA の発現低下ががんの悪性度と相関することが報告されている。

我々はこれまでに肺がんにおいて miRNA の発現量が低下する機構としてエピジェネティクス異常に着目し、DNA メチル化や miRNA の発現について解析を行ってきた。例えば肺がんにおいて mir-34b と mir-126 が DNA メチル化による発現抑制を受け、特に mir-34b のメチル化はがんの浸潤能のバイオマーカーとなること (Watanabe *et al.* Int J Cancer 2012)、肺がん手術検体における miRNA のメチル化が術後再発のマーカーとなること (Kitano K *et al.* Cancer Science 2011) などを報告してきた。これらの研究により申請者は肺がんにおける miRNA 研究の基盤を構築した。

がんにおいては miRNA の標的遺伝子の 3' UTR がしばしば短縮しており、短い 3' UTR をもつ遺伝子は miRNA による発現抑制を受けなくなる結果、遺伝子産物が増加することが報告された (Mayr C *et al.* Cell 2012)。これはがん細胞において、3' UTR 内のより 5' 側に位置するポリ A 付加シグナルが利用されるようになるためであり、alternative cleavage and polyadenylation (APA) を呼ばれている。

がんにおける APA を検討した研究は少なく、肺がんにおける APA の全貌や意義については報告がなかった。APA による 3' UTR の短縮は遺伝子産物の増加をもたらすため、がん遺伝子の新たな活性化機構ともなりうる。また APA は、がんの新たなバイオマーカーとなる可能性も考えられた。

一方で、近年 APA を制御する遺伝子についても報告が散見されるようになった。例えば PABPN1 は 3' UTR の短縮を抑制しており、3' UTR を長くする方向に機能している (Jenal M *et al.* Cell 2012)。また細胞増殖そのものが 3' UTR を短縮させる方向に働くことも報告されており (Ran Elkou et al. Genome Biol 2012)、がん細胞における細胞増殖の促進が APA をもたらしめている可能性も示唆されている。

これらの報告をふまえて、肺がん手術検

体での PABPN1 の発現量を定量 PCR で検討したところ、肺がんにおいて高頻度に PABPN1 の発現量が低下している事が明らかとなった。これは PABPN1 の発現低下が肺がんにおける 3' UTR 短縮の分子機構の一つとなりうることを示唆していると考えられた。

以上の背景と予備実験を踏まえ、本研究課題では、肺がんにおいてどのような遺伝子が 3' UTR 短縮をおこしているのかを網羅的に探索するとともに、3' UTR 短縮における PABPN1 発現低下の意義、術後再発の頻度や病理組織像における局所での浸潤性などの悪性度への寄与を検討することとした。

2. 研究の目的

非小細胞肺がんにおいて APA を生じている遺伝子を網羅的に同定し、肺がん手術検体で APA の定量を行い、臨床経過、病理所見との関連を検討することで APA のバイオマーカーとしての意義を検討する。

近年 APA に関連する遺伝子が複数報告されており、肺がんにおける APA がこうした関連遺伝子の発現量の変化で説明ができるかどうかについても検討する。

3. 研究の方法

最近マイクロアレイデータを用いて APA を生じている遺伝子を網羅的に同定する方法 (rmodel) が Salisbury らによって報告された。(Salisbury J *et al.* Plos one 2009) 本研究ではまず公開されている肺がんのマイクロアレイデータベースを利用し、*in silico* の解析により肺がんにおいて最も APA を生じている遺伝子を同定した。

次に肺がん手術検体において APA を定量するための RT-PCR 法を用いた方法を確立した。この方法を用いて、肺がん手術検体の APA を解析し、臨床経過や病理所見との関連性を解析した。さらには PABPN1 を初めとする APA 関連遺伝子と増殖マーカーを定量し、APA の状態との関連を検討した。

4. 研究成果

研究成果の概要

マイクロアレイのデータベースを用いた解析により肺がんにおいて最も APA を起こす 10 遺伝子 (C1orf52, DIEXF, ESYT2, HN1L, MUC20, NDFIP2, RBM33, SCAMP1, SMC1A and SSR1) を同定した。

これらの遺伝子が実際の肺がん手術検体でも APA を起こしていることが確認された。

この 10 遺伝子の APA の状態を 147 例の非小細胞肺がんの手術検体を用いて評価した。APA の状態をスコア化するために APA スコアを計算した。APA スコアは 10 遺伝子のうちで APA が生じている遺伝子数で定義され、スコアが高いほど 3' UTR 短縮が生じている

ことになる。

APA スコアが高いほど Stage が進行し予後不良である傾向があった。多変量解析を行うと APA スコアは独立した予後不良因子となっていた。

さらに APA 関連遺伝子 (PABPN1, CPEB1, E2F1) と増殖マーカー (MKI67, TOP2A and MCM2) についても臨床検体で検討したところ、PABPN1 低発現と増殖マーカー高発現とは共に APA スコア高値と関連していた。すなわち、肺がんにおける、PABPN1 低発現や細胞増殖の促進が APA と関連している可能性が示唆された。また PABPN1 低発現も APA と同様に独立した予後不良因子となっていた。

さらに APA スコアは FDG-PET における SUV max の数値と関連していた。

以上の結果から、肺がんにおける PABPN1 発現低下は、3'UTR の短縮化をもたらすことで miRNA による転写後制御を破たんさせ、がんの悪性度に寄与している可能性が示唆された。

今後の検討課題

本研究により肺がんにおける APA の全体像が明らかとなった。本研究では現在のところ、PABPN1 と APA の関連性については相関しか示せていない状態であり、今後肺がん細胞株などを用いた検討により、PABPN1 の発現低下が肺がんにおける APA の原因となっているのかどうかを明らかにする必要があると考えられる。また APA により miRNA の機能が実際に失われているのかどうかも今後検討していく必要がある。

これまでにがんにおける APA の検討は次世代シーケンスを用いた解析がいくつか報告されてきたが、今回用いた rmodel ではマイクロアレイデータベースを用いることでよりコストをかけずに APA の全体像を明らかにすることが出来る方法である。また RT-PCR 法を用いることで、多くの臨床検体での解析が可能になった。今後は肺がんに限らず rmodel を用いることで、様々な疾患と APA との関連性についての検討が進むことも期待される。

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5件)

1: Amano Y, Ishikawa R, Sakatani T, Ichinose J, Sunohara M, Watanabe K, Kage H, Nakajima J, Nagase T, Ohishi N, Takai D
Oncogenic TPM3-ALK activation requires dimerization through the coiled-coil structure of TPM3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 13;457(3):457-60.

2: Ichinose J, Watanabe K, Sano A, Nagase

T, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D.

Alternative polyadenylation is associated with lower expression of PABPN1 and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1135-41.

3: Watanabe K, Takai D

Disruption of the expression and function of microRNAs in lung cancer as a result of epigenetic changes.

Front Genet. 2013 Dec 3;4:275.

4: Kawakami M, Ishikawa R, Amano Y, Sunohara M, Watanabe K, Ohishi N, Yatomi Y, Nakajima J, Fukayama M, Nagase T, Takai D.

Detection of novel paraja ring finger 2-fer tyrosine kinase mRNA chimeras is associated with poor postoperative prognosis in non-small cell lung cancer.

Cancer Sci. 2013 Nov;104(11):1447-54.

5: 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

FER overexpression is associated with poor postoperative prognosis and cancer-cell survival in non-small cell lung cancer.

Int J Clin Exp Pathol. 2013;6(4):598-612.

[学会発表](計3件)

1: Ichinose J, Watanabe K, Sano A, Nagase T, Nakajima J, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D.

Loss of PABPN1 and alternative polyadenylation yield poor prognosis in non-small cell lung cancer.

AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer. Jan 7th 2014, San Diego, CA, USA

2: Kousuke Watanabe, Mitsuhiro Sunohara, Yosuke Amano, Rie Ishikawa, Junji Ichinose, Jun Nakajima, Masashi Fukayama, Yutaka Yatomi, Takahide Nagase, Nobuya Ohishi, and Daiya Takai

Histone methylation-mediated silencing of mir-139 enhances an aggressive phenotype of non-small cell lung cancer.

AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer. Jan 7th 2014, San Diego, CA, USA

3: 一瀬 淳二, 渡辺 広祐, 佐野 厚, 村川知弘, 高井 大哉, 中島 淳.

非小細胞肺癌における mRNA 3'非翻訳領域の短縮と腫瘍の悪性度の関係.

第55回日本肺癌学会学術集会

2014 年 11 月 14 日 . 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 広祐 (Kousuke Watanabe)

東京大学医学部附属病院 助教

研究者番号：50644291

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：