

博 士 論 文

ヒト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

一 瀬 淳 二

目次

略語表	4
要旨	6
目的	7
序文	8
1 肺癌治療の現状	8
2 polyA 付加	9
3 APA による 3'UTR 短縮	10
4 miRNA による遺伝子制御とその回避機序	14
5 癌における APA	18
方法	21
1 肺癌手術検体	21
2 マイクロアレイデータ解析	21
3 遺伝子発現の定量法	22
4 3'UTR 短縮の評価法	26
5 肺癌細胞株への PABPN1 強制発現	32
6 臨床データ収集および統計解析	37

結果	38
1 指標遺伝子の選択	38
2 APA スコアと腫瘍の悪性度の関係	43
3 PABPN1 発現量と APA スコア、腫瘍の悪性度の関係	57
4 肺癌細胞株への PABPN1 強制発現	63
考察	67
1 3'UTR 短縮の評価法	67
2 3'UTR 短縮の機序	71
3 PABPN1 遺伝子の役割	75
4 本研究の臨床的意義	78
結語	79
謝辞	80
参考文献	81

略語表

3'UTR	3' untranslated region
APA	alternative cleavage and polyadenylation
ATCC	American Type Culture Collection
CF	cleavage factor
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor
CstF	cleavage stimulation factor
DEPC	diethylpyrocarbonate
dNTP	deoxynucleotide
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water
FDG	fludeoxyglucose
miRISC	microRNA induced silencing complex
miRNA	microRNA
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PET	positron emission tomography
SNP	single nucleotide polymorphism
SUVmax	the maximum standardized uptake values
ALK	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
C1orf52	chromosome 1 open reading frame 52
CCND1, 2	cyclin D1, 2
CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1

DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DIEXF	digestive organ expansion factor homolog
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESYT2	extended synaptotagmin-like protein 2
FGF2	fibroblast growth factor 2
HMGA2	high mobility group AT-hook 2
HN1L	hematological and neurological expressed 1-like
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IMP-1	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2
MKI67	marker of proliferation Ki-67
MUC20	mucin 20, cell surface associated
MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog
NDFIP2	Nedd4 family interacting protein 2
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PABPN1	poly(A) binding protein, nuclear 1
PDRG1	p53 and DNA damage regulated 1
PDXK	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
RBM33	RNA binding motif protein 33
SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1
SMC1A	structural maintenance of chromosomes 1A
SSR1	signal sequence receptor, alpha
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha

要旨

mRNA においてポリアデニル鎖付加位置が 5'側へ移動することによる 3'非翻訳領域 (3'UTR) の短縮は増殖、発生、癌と関連し、microRNA による制御を回避する機序として重要である。我々は、発現マイクロアレイ解析によって非小細胞肺癌に特異的な 3'UTR 短縮指標遺伝子を同定し、非小細胞肺癌手術症例における腫瘍の 3'UTR 短縮程度を評価した。3'UTR 短縮は病期および血管浸潤と関連し、独立した肺癌再発予測因子であった。PABPN1 発現低下と 3'UTR 短縮は関連し PABPN1 低発現群は予後不良であった。また肺癌細胞株に PABPN1 を強制発現させることで 3'UTR 短縮が解除され遺伝子発現が抑制されることを示した。PABPN1 発現低下、3'UTR 短縮によって腫瘍の悪性度が増している可能性がある。

目的

癌細胞においては、DNA や染色体の異常に加え、転写後の mRNA に対する制御機構の異常が非常に重要な役割を果たしていることが最近明らかになってきた。特に注目されているのが microRNA (miRNA) による遺伝子発現制御の破綻である。たとえば様々な因子の異常による miRNA 生合成の抑制が癌において観察され、miRNA による制御が行われなくなっている。その一方、標的遺伝子に存在する miRNA の結合部位が失われることで miRNA による遺伝子制御が効かなくなる機序もあり、mRNA のポリアデニル鎖付加位置が 5'側へ移動することによって miRNA 結合部位の存在する 3'UTR が短縮する現象はこの代表である。

癌における 3'UTR 短縮は近年注目を集めているが、3'UTR 短縮の機序や、3'UTR 短縮と発癌および癌の悪性度との関係についてはいまだ不明な点が多い。本研究の目的は、ヒト非小細胞肺癌における mRNA 3'UTR の短縮と腫瘍の悪性度の関係、および PABPN1 遺伝子が 3'UTR 短縮の制御に対して果たしている役割について調べることである。

序文

1 肺癌治療の現状

肺癌は世界の癌死亡原因の第 1 位であり、毎年 150 万人以上が亡くなっている(1)。手術療法、放射線療法、化学療法などが行われるが、進行肺癌の治療成績は不良である(2)。近年、分子標的治療のめざましい発展により EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子を有する肺癌の治療成績は著しく向上した。このような治療標的となりうる新たなドライバー変異を同定する試みが全世界で精力的になされているが、大規模な全ゲノム解析が行われた結果、腺癌の 1/4、扁平上皮癌の 1/2 以上、小細胞癌ではほとんどの症例において標的となりうるドライバー変異を見いだせず(3-5)、いまだ多くの肺癌患者が分子標的治療の対象となっていないのが現状である。最近、このような DNA の変異・欠失や染色体の転座・逆位といったゲノムの異常に加え、転写後の mRNA に対する制御の異常が癌細胞においてさまざまな重要な役割を果たしていることが明らかとなった。転写後制御には、ポリアデニル (polyA) 付加、スプライシング、miRNA による調節などが含まれるが、癌細胞において miRNA の発現異常とならび特に注目されているのが、代替ポリアデニル付加 (APA: alternative cleavage and polyadenylation) によって polyA 付加位置が 5'側に移動し miRNA の結合部位である 3'非翻訳領域

(3'UTR) が短縮する現象である。

2 polyA 付加

真核生物の mRNA は原核生物と異なり、核内で mRNA 前駆体が転写された後、5'末端にキャップ構造が付加され、3'末端には polyA 鎖が付加される。3'末端の修飾は、一次転写産物の切断とそれに続く polyA 付加の二段階からなる。この過程は mRNA 前駆体が成熟 mRNA となって核から細胞質へ移動するのに必要であり、mRNA の安定性と翻訳効率を高めている(6)。polyA 鎖の長さは種によって決まっており、ヒトでは 250~300 塩基であるが、酵母では 70~80 塩基である。polyA 鎖の長さは重要であり、polyA 鎖の短い mRNA は酵素による分解を受けたり(7)、翻訳休止状態となったりすることが知られており(8)、polyA 鎖の長さで翻訳効率が相関することが示されている(9)。3'末端修飾には 4 つの切断因子 (CPSF: cleavage and polyadenylation specificity factor; CstF: cleavage stimulation factor; CF I and II: cleavage factors I and II) に加え RNA ポリメラーゼ II、polyA ポリメラーゼ、symplekin、PABPN1 といった補助タンパクが必要である。mRNA の切断部位は、その 15~30 塩基上流に位置し polyA シグナルと呼ばれる 6 塩基配列と、下流近くに位置する U/GU-rich 配列によって決定される。

CPSFが polyA シグナル、CstFが U/GU-rich 配列に結合し、この間で mRNA を切断する(10, 11)。このとき polyA ポリメラーゼによって polyA 鎖が付加されるが、PABPN1 が polyA 鎖に結合することにより polyA 付加が強力に促進される(12)。

3 APA による 3'UTR 短縮

APA とは、標準的な位置とは異なるところで mRNA の切断と polyA 付加が行われる現象であり、そのうちの多くにおいて polyA 付加位置が 5'側に移動するため 3'UTR が短縮する。トランスクリプトーム解析により、哺乳類の半分以上の遺伝子において 3'UTR の長さが異なる複数の mRNA アイソフォームが存在することが示され、APA が非常に広範囲に及ぶ現象であることがわかった(13-15)。ヒト遺伝子の 70~75%が APA を受けているとされている(16)。標準的な polyA シグナルは AAUAAA であり切断部位の約半数にみられるが、10 種以上の代替 polyA シグナルが報告されており、そのうち最もよくみられるものは AUUAAA である(15, 17)。多くの遺伝子の 3'UTR において、遠位にある標準的な polyA シグナルとは別に近位の代替 polyA シグナルが存在し、その代替 polyA シグナルを用いて mRNA の切断と polyA 付加が行われると 3'UTR の短い mRNA が作られることになる。

APA の機序については、現在研究がさかんに行われている。1 つの説明として、切断因子が多ければ代替 polyA シグナルが用いられるという機序が考えられる。1990 年代後半には既に、B 細胞成熟の初期段階における CstF の濃度によって IgM のアイソフォームが変化することが示されていた。この現象は、CstF の濃度が薄いと IgM の polyA 付加が標準的でより強力な polyA シグナルで行われ膜結合型 IgM を生成するのに対し、CstF の濃度が濃いと polyA 付加がより弱い代替 polyA シグナルにおいて行われ分泌型 IgM を生成すると説明された(18, 19)。同様の結果は、CstF 欠乏によって遠位の polyA シグナルの使用が増加することを示した最近のトランスクリプトーム解析によっても得られた(20)。細胞周期制御に関わる転写因子である E2F が、3'末端修飾に関わる遺伝子の発現を促進することで 3'UTR が短縮することを示し、細胞増殖と 3'UTR 短縮との相関を切断因子の増加によって説明した研究もある(21)。一方、CstF と同様に切断因子である CF I については、CF I 欠乏によって近位の polyA シグナルの使用が増加するという逆の結果が得られた(22)。

他の機序として、RNA 結合タンパクが代替 polyA シグナルに結合することで APA を抑制しているとする報告もなされている。Jenal ら(23)は polyA 結合タンパクである PABPN1 が、APA を抑制するというもう一つの機能を持つことを

発見した。PABPN1 をノックダウンすると 3'UTR の短縮がみられること、PABPN1 が近位の代替 polyA シグナルに結合することを示し、このことから、PABPN1 が CPSF と競合的に代替 polyA シグナルに結合することで APA を抑制しており、PABPN1 の減少もしくは切断因子の増加によって APA が生じると説明している(図 1)。さらに PABPN1 のトリプレットリピート過伸長は眼咽頭筋ジストロフィーを引き起こすことが知られているが、この異常 PABPN1 が正常 PABPN1 の機能を阻害して APA をきたすことも示されている。

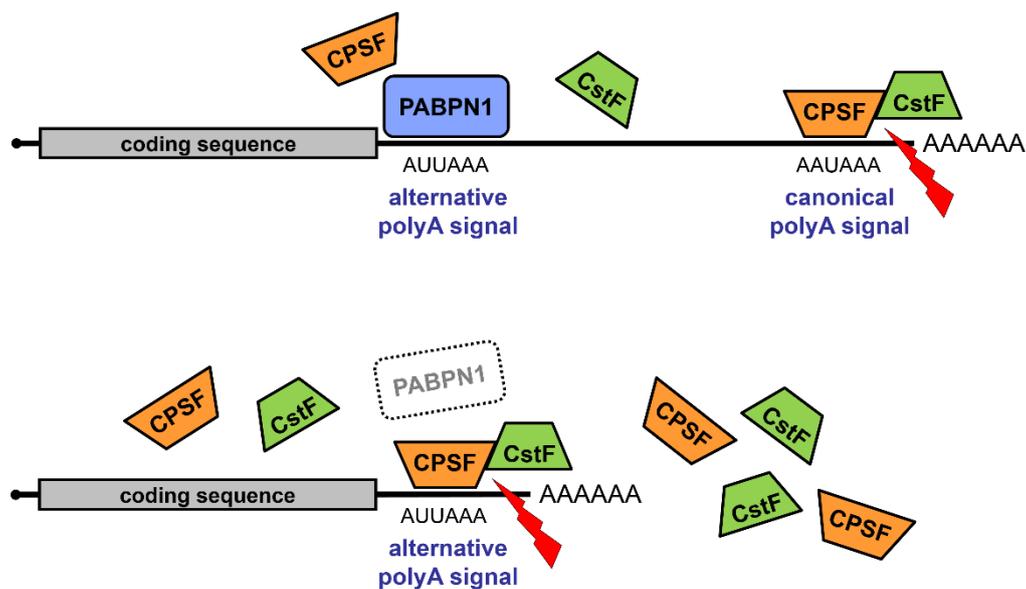


図 1 PABPN1 が APA を抑制する機序

多くの遺伝子の 3'UTR 上において、遠位にある標準的な polyA シグナルとは別に近位の代替 polyA シグナルが存在し、そこで切断されると 3'UTR の短い mRNA が作られることになる。PABPN1 は CPSF と競合的に代替 polyA シグナルに結合することで APA を抑制しており、PABPN1 の減少もしくは切断因子の増加によって APA が生じる。

また、CPEB1 も APA を促進することが示されている(24)。CPEB1 は細胞質内での polyA 付加を制御する機能がよく知られていたが、核内において近位の代替 polyA シグナルの近くに結合して 3'末端修飾タンパクを誘導することにより APA をもたらす機能が新たに発見された。

さらには、腫瘍で発現量が増加する miRNA によって 3'UTR 短縮がもたらされているとする報告もある(25)。乳癌細胞株 (MCF-7) では正常上皮細胞株 (MCF-10A) に比べ 88%の遺伝子で 3'UTR 短縮がみられたが、これらの遺伝子の発現量には差を認めなかった。mRNA を合成する段階で切断因子や RNA 結合タンパクの制御によって 3'UTR の短い mRNA が多く作られているのであれば、後述する miRNA による mRNA の分解促進作用が効かなくなり、遺伝子発現量は増えるはずである。それに対し、癌で発現量が増加する miRNA によって 3'UTR の長い mRNA のみが分解されると、3'UTR の短い mRNA の割合が相対的に増え、全体の発現量は減少する。この報告では、乳癌細胞株で 3'UTR が短縮した遺伝子の 3'UTR 上に、乳癌細胞株で発現量が増加している miRNA の標的配列が多く見られたことを示し、後者の機序の重要性を述べている。

4 miRNA による遺伝子制御とその回避機序

3'UTR は mRNA の安定性、局在、翻訳効率の制御に重要な役割を果たしている(26)。これは主に miRNA が 3'UTR に存在する標的配列に結合することによる。そのため、APA によって 3'UTR が短縮すると、miRNA による制御から解放されることになる。増殖細胞(27)や胎生期の細胞(28, 29)、iPS 細胞(30)や癌細胞(31, 32)において、広範に 3'UTR 短縮がみられることが報告されており、遺伝子制御の重要な要素の 1 つとして注目されるようになった。

miRNA は 22 塩基前後の small non-coding RNA で、標的遺伝子の 3'UTR に結合してその発現を抑制する(33)。miRNA は線虫からヒトまで広く保存されており、発生・分化、細胞増殖、発癌など様々な現象に関与している。最初に発見された miRNA は lin-4 であり、線虫の発生異常をもたらす原因遺伝子として 1993 年に単離された(34)。2000 年には、やはり線虫の発生異常の原因遺伝子として let-7 が報告された(35)。翌 2001 年、lin-4 や let-7 と同様の small RNA が多数存在し、線虫からヒトまで広く保存されている事が独立した 3 グループより報告され、miRNA という名称が提唱された(36-38)。以降 miRNA の数は増え続けており、miRBase (<http://www.mirbase.org>) (39)において現在 2588 個のヒト miRNA が登録されている。

miRNA による標的遺伝子抑制機構として mRNA の分解促進と翻訳抑制が考えられている(40)。最初に報告された miRNA である lin-4 は標的遺伝子の mRNA 量を変えずにタンパク量を抑制するとされ翻訳段階での抑制と考えられたが(34)、その後 mRNA の低下も高頻度に認められる事が明らかとなり(41)、哺乳類では翻訳抑制よりも mRNA の分解促進が主であるとの報告もある(42)。miRNA が結合することによって mRNA の脱アデニル化が加速され、分解促進と翻訳抑制がもたらされると考えられている(43)。

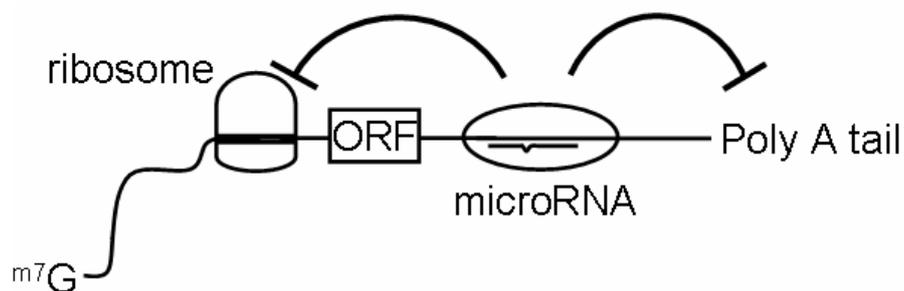


図 2 標的 mRNA と miRNA

標的 mRNA の 3'UTR に miRNA を含むタンパク複合体 (miRISC) が結合し、脱アデニル化などを介して mRNA の分解促進や翻訳抑制をもたらす。

miRNA の発現量は癌において変化しており、その多くが発現低下を示す一方で、一部の miRNA は発現増加を示す(44)。癌において増加する miRNA のうち癌抑制遺伝子を標的とするものは癌遺伝子として機能しうるし、逆に癌において発現低下する miRNA のうち癌遺伝子を標的とするものは癌抑制遺伝子として機能しうる。肺癌においては、let-7 が癌抑制遺伝子として働き、その発現低下が肺癌の予後不良因子となること(45)、癌遺伝子である KRAS(46)、HMGA2(47)を標的とすることが示されている。一方、miR-17-92 cluster は、小細胞肺癌において悪性リンパ腫と同様に発現が増加しており、増殖を促進することが明らかとなっている(48)。

miRNA の生合成経路を図 3 に示す。ホスト遺伝子から転写された primary miRNA が DGCR8 と Drosha のタンパク複合体により切断され約 60-80 塩基の pre-miRNA が作られる(49)。pre-miRNA は核膜上の Exportin-5 によって核内から細胞質へと輸送された後(50)、Dicer により切断され、片方の strand が分解され一本鎖となって mature miRNA となる(51)。これがタンパク質複合体に取り込まれ miRNA induced silencing complex (miRISC) を形成し、標的遺伝子の 3'UTR に結合する(33)。

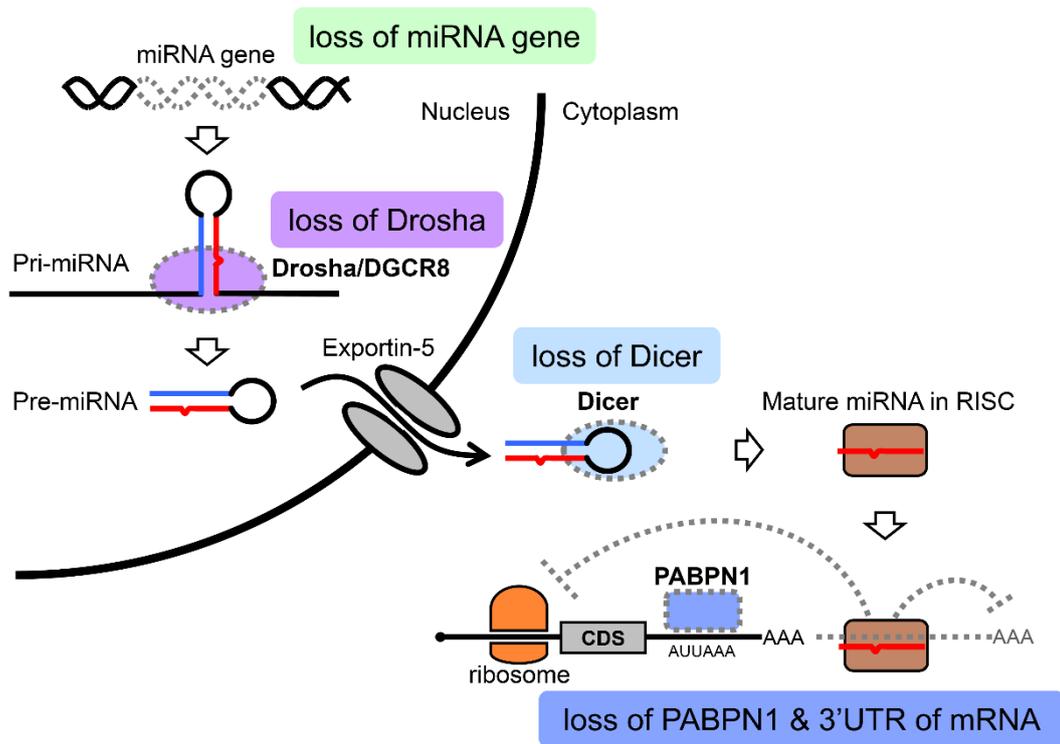


図3 miRNA 生合成経路と miRNA による制御の回避機構

miRNA の生合成経路を抑制する機序とは別に、PABPN1 欠乏および 3'UTR 短縮によって miRNA 結合部位が失われ miRNA による遺伝子制御を回避する機構が存在する。

細胞が miRNA による制御から逃れる方法の 1 つが、miRNA の生合成経路を抑制することである。癌においては、miRNA の欠失(52)やプロモーターの DNA メチル化(53-55)、Drosha の発現抑制(56)、Exportin-5 遺伝子の変異(57)、Dicer の発現抑制(58-62)といった機序が報告されている。

その一方、miRNA の結合部位が失われることで miRNA による遺伝子制御を回避する機序もある。APA とそれに伴う 3'UTR 短縮によって多くの遺伝子

の miRNA 結合部位が失われる現象はその代表である(図 3)。その他、let-7 は KRAS 遺伝子の 3'UTR に結合しその発現を抑制するが、KRAS 遺伝子の let-7 結合部位には single nucleotide polymorphism (SNP) が存在し、肺癌発症リスクとの相関が示されている(63)。また HMGA2 遺伝子や MYB 遺伝子では、染色体転座に伴い 3'UTR の配列が変化して miRNA の結合部位が失われ、miRNA による抑制が起こらなくなる結果、これらの遺伝子の発現量が増加することが示されている(47, 64)。

5 癌における APA

癌細胞における広範な APA とそれに伴う 3'UTR 短縮は、多くの遺伝子において miRNA の結合部位が失われることを示し、miRNA による遺伝子制御を回避する機序として重要である。Mayr ら(32)は、3'UTR に多くの miRNA 結合配列と代替 polyA シグナルを有する 6 遺伝子について検討し、癌細胞株において 3'UTR 短縮がみられることをノーザンブロットイングとリアルタイム PCR で示している。そのうえで、3'UTR の短い mRNA は 3'UTR の長い mRNA と比較して半減期が 2.6 倍とより安定であり、タンパク産生量も 1.6~42 倍多かったと報告している。また、3'UTR の短い IMP-1 を強制発現させた線維芽細胞が悪性化されたことから、3'UTR 短縮は細胞増殖を促進

するだけでなく、細胞の悪性化においても重要であることを示している。

癌における APA は注目を集めているが、3'UTR 短縮の程度やパターンと発癌および癌の悪性度の関係について調べた研究は現在のところ多くない。

Lembo ら(65)は乳癌と肺癌に対する発現マイクロアレイ結果を解析し、3'UTR が短縮している症例の方が予後不良であることを示している。また

Morris ら(66)は正常大腸粘膜 4 例、大腸腺腫 6 例、大腸癌 5 例について

次世代シーケンサーを用いて mRNA 3'末端のシーケンスを行い、正常大腸粘膜から大腸癌へ進行する過程と 3'UTR 短縮が相関しており、バイオマ

ーカーとして有用であると述べている。APA はゲノム全体にわたる変化であり、

これを評価するには発現マイクロアレイや次世代シーケンサーによる包括的な解析が必要である。しかしこれらの方法はいまだ費用が高く、バイオマ

ーカーとして臨床の場に適用するのは現時点では困難である。

そこで我々は、発現マイクロアレイの解析によって非小細胞肺癌に特異的な

3'UTR 短縮の指標となる遺伝子を同定し、それに対してリアルタイム PCR を

行うことで、非小細胞肺癌症例における mRNA 3'UTR 短縮と腫瘍の悪性

度の関係、および APA を抑制するとされる PABPN1 遺伝子発現との関係に

ついて検討した。また、肺癌細胞株に PABPN1 遺伝子を強制発現させ、

3'UTR の長さや増殖速度の変化をみることにより、癌において PABPN1 遺

伝子が APA および増殖速度の制御に対して果たしている機能について調べた。

方法

1 肺癌手術検体

2005年6月から2009年5月までに東京大学医学部附属病院呼吸器外科にて手術を行い、原発性非小細胞肺癌の診断がついた147症例の切除検体から採取したサンプルを解析した。術前治療施行例、非完全切除例は除外した。また比較対象として、東京大学医学部附属病院呼吸器外科にてI期非小細胞肺癌を切除した非喫煙者10症例の正常肺組織部位を利用した。研究計画については東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会に「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査」を申請し(受付番号:1069)承認を受けた後、インフォームドコンセントを全患者より書面で得たうえで、切除検体から肺癌組織と背景正常肺組織の一部をそれぞれ採取した。臨床検体からの total RNA は RNAiso Plus (TaKaRa) を用いて抽出した。

2 マイクロアレイデータ解析

mRNA 3'UTR 短縮を効率良く評価するために、非小細胞肺癌において3'UTR 短縮が特に起こりやすい遺伝子をマイクロアレイデータ解析によって抽出した。解析には Salisbury ら(67)が報告した rmodel という Bioconductor 用の発現マイクロアレイ解析プログラムを用いた。これは 2 つのサンプルグル

ープを比較し、プローブレベルのパターンが異なった場合に、プローブセットをその境界で区分けするプログラムである。mRNA 3'UTR の長さが 2 つのグループで異なっていれば、あるところを境にプローブレベルのパターンに差が生じるはずであり、rmodel によって抽出されることとなる。

マイクロアレイデータは Affymetrix HG-U133_Plus_2 を用いたものを Gene Expression Omnibus resistor よりダウンロードし、肺腺癌 40 例、肺扁平上皮癌 18 例の発現プロフィールを含む GSE10245(68)と正常肺組織 3 例の発現プロフィールを含む GSE16538 中の GSM415386-8(69)を比較した。

Rmodel による解析で抽出された遺伝子について、解析結果をあらためて調べ、プローブレベルの変化が顕著でないもの、区分けされたプローブセットの境界が 3'UTR 上に位置していないものは除外した。

3 遺伝子発現の定量法

これまでの報告で APA を制御することが示された PABPN1、CPEB1、E2F1 および、増殖マーカーとして知られる MKI67、TOP2A、MCM2(70-74)を APA に関連する遺伝子として選択し、リアルタイム逆転写 PCR 法によって定量した。DNase 処理を行った total RNA より random hexamer を用いて cDNA を合成した後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用い

て Applied Biosystems 7500リアルタイム PCR システムによりリアルタイム PCR を行った。内在性コントロールとして HPRT1 遺伝子を用い、ddCt 法により定量を行った。

DNase 処理

Total RNA	500 ng
DNase (Invitrogen)	1 μ l
10 \times DNase buffer	1 μ l
DEPC 処理水	Total to 10 μ l

室温 15 min

室温で 15 分間の DNase 処理後に 25 mM の EDTA を 1 μ l 加え、65 $^{\circ}$ C 15 分間の heat inactivation を行った。次に random hexamer (Promega) 0.5 μ l、20 mM dNTP 0.5 μ l、DEPC 処理水 1 μ l を加えて全量 13 μ l とし、65 $^{\circ}$ C で 5 分間、氷上で 1 分間 incubate した。これを以下の通り逆転写反応に使用した。

逆転写反応

DNase 処理後 RNA	13 μ l
5 \times FS buffer	4 μ l
0.1 M DTT	1 μ l
RNase OUT (Invitrogen)	1 μ l
Super Script III (Invitrogen)	1 μ l
Total	20 μ l

25 $^{\circ}$ C 5 min

50 $^{\circ}$ C 50 min

70 $^{\circ}$ C 15 min

逆転写反応によって合成された cDNA を用い、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いてリアルタイム PCR を triplicate で行った。PCR は全て 2-step の 40 サイクルとし、アニーリングおよび伸長は全て 60 °C で行った。増幅産物の GC 含有量が高いものは PCR 反応の際にベタインを添加した(75)。

リアルタイム PCR (ベタイン添加なし)

cDNA	1 μ l
Forward primer (10 μ M)	0.8 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0.8 μ l
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)	10 μ l
DW	7.4 μ l
Total	20 μ l

リアルタイム PCR (ベタイン添加あり)

cDNA	1 μ l
Forward primer (10 μ M)	0.8 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0.8 μ l
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)	10 μ l
Betaine (5 N)	4 μ l
DW	3.4 μ l
Total	20 μ l

95 °C 1 min
 95 °C 15 sec } 40 cycles
 60 °C 1 min }

プライマーの一覧とベタイン添加の有無を以下に示す。

Primer	
HPRT1	
Forward	TGCTGGATTACATCAAAGCACTG
Reverse	TTTATGTCCCCTGTTGACTGGTC
Product	112 bp
PABPN1 (+1N Betaine)	
Forward	GGGACTGGTCGAGGGTG
Reverse	TGCCTGGAGGTGGACTCATA
Product	158 bp
E2F1	
Forward	TCTCCGAGGACACTGACAGC
Reverse	TCTCAGGAGGGGCTTTGATC
Product	111 bp
CPEB1	
Forward	GCAGCCATCTTGAACGACC
Reverse	CGTTGGTTATTGAAAGTCACACG
Product	107 bp
MKI67	
Forward	GACCTAGCTGGCTTCAAAGACC
Reverse	TGTTGCGGTGTCTTCTAGTTCTG
Product	114 bp
TOP2A	
Forward	GTGACAGTGAAGAAGACAGCAGC
Reverse	GCAGGATCAGGCTTTTGAGAG
Product	134 bp
MCM2	
Forward	TCTGCGGGACTATGTGATCG
Reverse	ATGAAAGGTAGCGGGCAAAG
Product	128 bp

4 3'UTR 短縮の評価法

Rmodel により抽出された遺伝子について 3'UTR 短縮の程度を 2 種類のプライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法によって評価した。プライマーセット 1 を翻訳領域上に、プライマーセット 2 を 3'UTR 遠位端に設定した (図 4)。

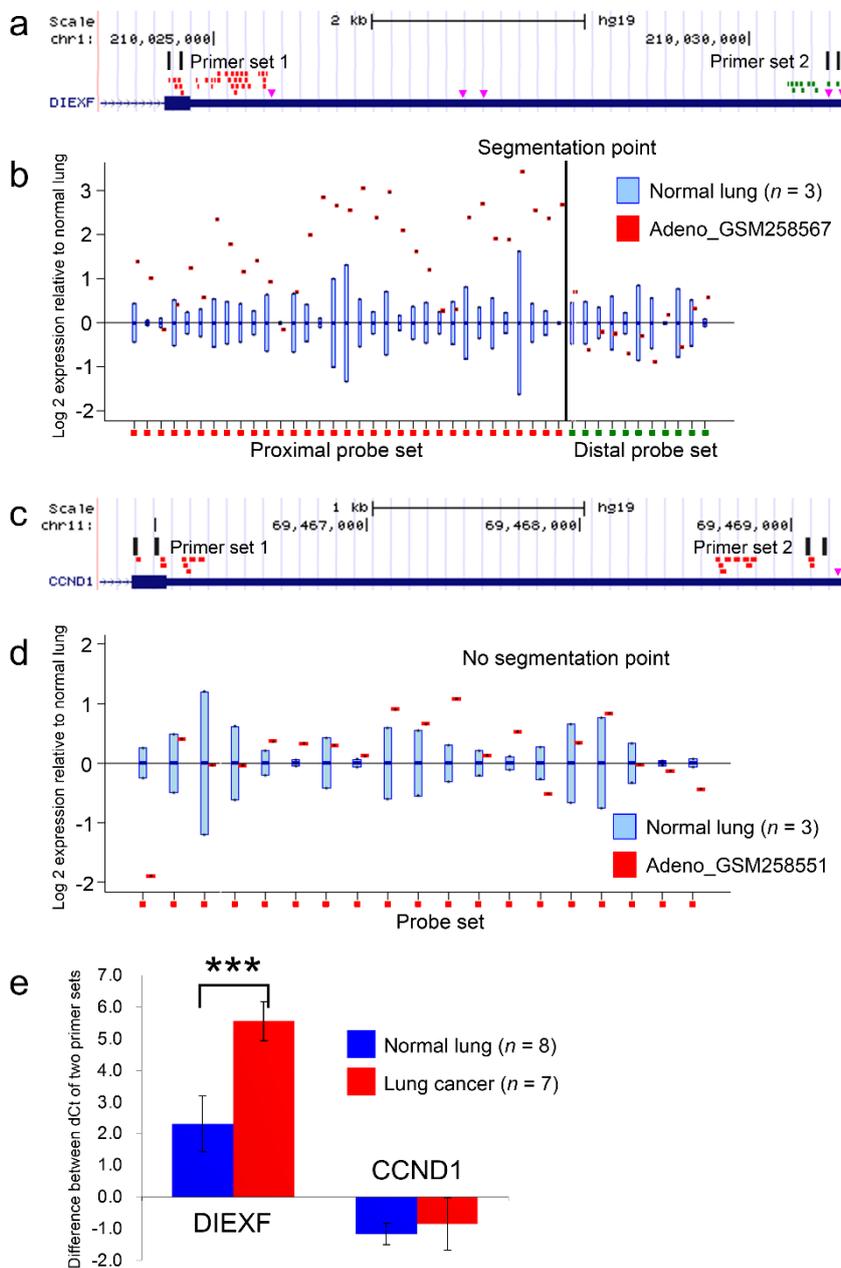


図4 rmodelによる3'UTR短縮指標遺伝子の選択

- (a) rmodelにより、Affymetrixのプロローブが赤色で示した近位側のセットと緑色で示した遠位側のセットの2群に分けられた。ピンク色の逆三角形は主な polyA シグナルである AAUAAA と AUUAAA を表す。
- (b) 陽性例。DIEXF は肺腺癌 GSM258567 において、正常肺に比べ mRNA 3'末端のプロープレベルに減少がみられる。
- (c, d) 陰性例。CCND1 は 3'UTR におけるプロープレベルに変化を認めない。
- (e) 正常肺組織 8 例、肺癌切除検体 7 例においてプライマーセット 1, 2 でリアルタイム PCR を行った dCt 値の差。DIEXF は肺癌において 3'UTR 短縮が起きていることが確認された。
- ***, $P < 0.001$.

この際、プライマーセット 2 は rmodel によって分けられた近位側プローブセットと遠位側プローブセットの境界より遠位側になるようにした。それぞれのプライマーセットを用いてリアルタイム PCR を行った。プライマーセット 1 はその遺伝子の mRNA 全てを定量することになるのに対し、プライマーセット 2 は 3'UTR 短縮のない完全長の mRNA のみを定量することになる。プライマーセット 1 および 2 でリアルタイム PCR を行い、正常肺組織をコントロールとして得られた肺癌組織における ddCt 値をそれぞれ ddCt1, ddCt2 とすると、下の数式によって完全長 mRNA 割合の比が計算できる。

$$\frac{\text{肺癌組織における完全長 mRNA の割合}}{\text{正常肺組織における完全長 mRNA の割合}} = \frac{1}{2^{ddCt2 - ddCt1}}$$

本研究では、肺癌組織における完全長 mRNA の割合が正常肺組織に比べ半分未満の場合、すなわち

$$ddCt2 - ddCt1 > 1$$

である場合に、この遺伝子を「3'UTR 短縮あり」と判定した。

また、rmodel では抽出されなかったが、過去の文献から 3'UTR 短縮が起こりやすいとされていた 10 遺伝子 (KRAS, NRAS, CCND1, CCND2, E2F1, FGF2, IMP1, MAPKAPK3, PDRG1, PDXK) (23, 32, 66)についても同様の方法で 3'UTR 短縮の程度を評価した。

DNase 処理、逆転写反応、リアルタイム PCR は全て前項と同様に行い、リアルタイム PCR は triplicate で行った。PCR は全て 2-step の 40 サイクルとし、アニーリングおよび伸長は全て 60 °C で行った。

プライマーの一覧とベタイン添加の有無を以下に示す。

	Primer set 1	Primer set 2
DIEXF		
Forward	TTTCTATGAACTGCCGACATATCC	CCATGCCCATTCACAAATAC
Reverse	ACCTCTGGGCATCATATTTGG	ATGCAGAAAACAATCTGGGAGG
Product	128 bp	111 bp
HN1L		
		(+1N Betaine)
Forward	CCCGTGCAGACTCGACAG	CTCTAAATTAGCCGGATGTGGTG
Reverse	GTTTGTGGGTGTGCCAAG	AGCCACAACCTCCTGGTCTC
Product	103 bp	99 bp
MUC20		
Forward	TGGTCACAGTTAGCAGGAATCC	ATAATTTGGCATGAATGGAGAGC
Reverse	ACTGCTGACCCAGCCTCTATG	TCACCCACTTGAGGAAATACAAAG
Product	115 bp	112 bp
NDFIP2		
Forward	TCAGAATCATCGGCTATAGAGCAG	AGATGTGGAAGTGTGAACCTGTG
Reverse	GTGGAGGGGAAGAGTCAGTTTC	CTCCAATCTTGAAAGGTTTGTCCAC
Product	106 bp	116 bp
SCAMP1		
Forward	ACAGGTGCTAGTTTTGAGAAGGC	TCAGGTATTTTGGGGATGGG
Reverse	ATTCTGAGCTGCACTAGATGCTG	AGTGGGTTTCAGTTTTTGTGCAG
Product	120 bp	108 bp
RBM33		
Forward	AACGGTAACCCACTGTTGCC	GTTCCACCCCTTTGTTCACTTC
Reverse	CACTGGATGGTACAAAATTGGATG	ACGAAATCACACAAATGAAACACAC
Product	133 bp	125 bp

C1orf52		
Forward	ACACCACTGAGAAGAAGCCTCC	CTGGTTGGAAAACGGACTGTC
Reverse	CGTCTCCTCCCCTTCTGGTAG	CTCAGTACCCACATGGACACTTG
Product	134 bp	121 bp
ESYT2 (+1N Betaine)		
Forward	GTCAAACGTCCCTCTGTGTCC	GCCTGGGCAACAGAGTGAG
Reverse	GACTGGTGTGGATGGAGCTG	AAGAAGGGCCGACCTCTTG
Product	108 bp	141 bp
SMC1A (+1N Betaine)		
Forward	CCTGAGAACCCTGAAGAGCC	AGAAGGGAGCAACAGATGCC
Reverse	AGCTGCCACTGTCTTCTCCC	CAGCCTCATGGAAGAACAGAAAC
Product	114 bp	109 bp
SSR1		
Forward	GATGCCTCATTCCGTTATCCTC	TGTGGTAAAGCCAAGATGGAAAC
Reverse	ACTCAAAGTTGCCTGTCTCTGG	GCATTTGACAGGACAGCAGACTAG
Product	106 bp	97 bp
EPN3 (+1N Betaine)		
Forward	GCTGGACCTGTTTGGAGACC	TTCAGGGACAAATGGCCTTC
Reverse	CTTTGCTTGGCTGGGTTAGTG	TGTAAGTGCATTGTGGGACTCC
Product	110 bp	106 bp
MAPK9 (+1N Betaine)		
Forward	AGTAGCAACGCCACTCCTTCTC	CTGTCTCCCCCATGTCCAG
Reverse	GACAGCCTTCAAGGGGTCC	TGACACGGTATGCACAGCC
Product	127 bp	111 bp
METTL9		
Forward	GGCAAGTGGGAGAAACCATC	TGTGGTGAAAATTGAAACCAAATC
Reverse	TTCACACAGGTATGGTAGTCTGGTG	AGCCATTGACACTCAGTAAGCAAC
Product	138 bp	113 bp
PDCD2		
Forward	GGCTGACAGACTGGGCAAG	AGTTTACAGGGCCTTTCCATTTG
Reverse	CATCCTGCTTCCACACAAATTC	ACACAGATGCCAAGTCGGTG
Product	113 bp	103 bp

RNASEH2C		
Forward	GCTTCATTGGAGCCACTGC	AGAAGCCCTTCCTCACCCCTC
Reverse	AAGGCTGGGCCAAGTTAAGG	CAGCCTGGTAGCACAAGTGG
Product	107 bp	125 bp
TMED5		
Forward	CTGCTTAGAGCATTGGAAGCTCG	TTTGGGGGGACAATCCTAAAG
Reverse	GACACCACCACCATGACCAC	AGACCTGGCAACCACGAATC
Product	104 bp	109 bp
KRAS		
Forward	ATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTG	ACACCCCCACAGAGCTAACTG
Reverse	GCAAATACACAAAGAAAGCCCTC	AATTGGCACTCAAAGGAAAAATG
Product	113 bp	112 bp
NRAS		
Forward	TCGGATGATGTACCTATGGTGC	AGGATGTCCGTGGAAGTTGTAAG
Reverse	TTCAATGAATGGAATCCCGTAAC	GCCAAGGAGGCCAATAGTTC
Product	114 bp	108 bp
CCND1 (+1N Betaine)		
Forward	TGCCAGGAGCAGATCGAAG	AGCGGAGTCTGTCCTGTGAC
Reverse	GCAAGCCAGGTCCACCTC	TTACATGTTGGTGCTGGGAAG
Product	117 bp	105 bp
CCND2		
Forward	CTTGCCAGGAGCAGATTGAG	AAGAGGTGTGGGTGTCTGTTTG
Reverse	GGCTTGGTCCAGTTCATCC	TGTCACCATCATAGCCAATACAAC
Product	101 bp	122 bp
E2F1 (+1N Betaine)		
Forward	CTCATCCCTCACACAGATCC	TTCACTGATGTGGGCAGGAG
Reverse	CATGCTCCAGGAGCGAGTC	AAGTGCAGATTGGAGGGTGG
Product	143 bp	121 bp
FGF2		
Forward	GTTGGTATGTGGCACTGAAACG	CCATCCTTTCTCCCTCGTTTC
Reverse	TCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG	ATGTTTCCCTCCAATGTTTCATTC
Product	104 bp	146 bp

IMP1

Forward	GAACGAGTTGCAGAATTTGACG	GCTTATTCTGTAATTGCGGCAAC
Reverse	CTGACTGGCATAGAAATGTCCG	CAGATTAAAGGATGGGAGGAAGG
Product	112 bp	105 bp

MAPKAPK3 (+1N Betaine)

Forward	GAGGAGATGACCAGTGCCTTG	AATGTCTGGTCCTGGCTTGG
Reverse	AGAGGAGCTGCCTGCCTG	TGCGTGTTCAGGCACTTGTC
Product	126 bp	137 bp

PDRG1

Forward	TGGACCTGGACACTAAAAGGAATC	TTCCCTGCTTGATTCCAAGAG
Reverse	GTCTCAGGGTGAGGCATCTTG	GTAAGAGGCGCATCCACTCAC
Product	127 bp	117 bp

PDXK (+1N Betaine)

Forward	TGTCTCCGTGTTTGTCCCTG	GGCTTCGTTTGCCTGGAG
Reverse	ACGTTTCACAATGAAGACCAGC	AAGTCAACAGGACCAGCACG
Product	117 bp	112 bp

5 肺癌細胞株への PABPN1 強制発現

American Type Culture Collection (ATCC) より購入した肺腺癌細胞株 H23 へ PABPN1 強制発現を行った。ベクターは、EBV 由来の複製起点 OriP と EBV Nuclear Antigen 1 (EBNA1) 遺伝子をもつ pEBMulti-Hyg ベクター (Wako) を使用した(図 5)。

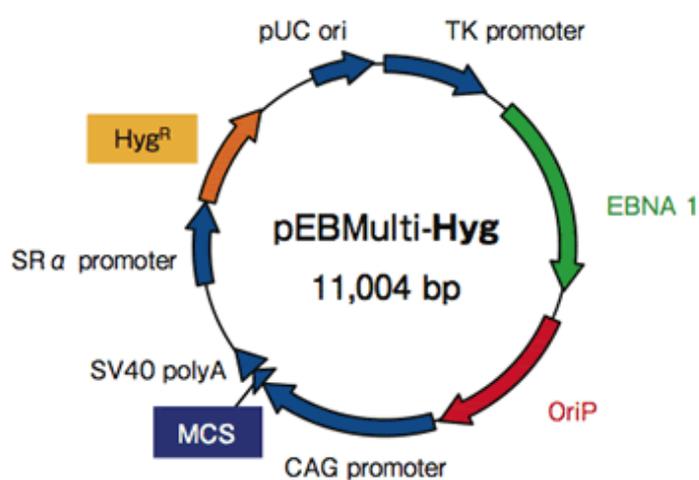


図 5 pEBMulti-Hyg ベクター
EBV 由来の複製起点 OriP と EBNA1 遺伝子、
ハイグロマイシン耐性カセットをもつ。

ベクターの作成過程は以下の通りである。

まず、pcDNA3.1/Zeo(+)ベクター (Invitrogen) を制限酵素 *XhoI* と *ApaI* で切断し、*XhoI*_FLAG_*ApaI*_forward と *XhoI*_FLAG_*ApaI*_reverse をそれぞれ混和し 95 °C で変成の後に再会合させたオリゴ DNA を ligation することで、FLAG タグ配列を組み込んだ。

ATCCより購入したHEK293tからRNAiso (TaKaRa) を用いて抽出した total RNA を用いて、3と同様の方法で cDNA 合成を行なった。これをテンプレートとして、プライマー PABPN1_NotI_forward とプライマー PABPN1_NotI_reverse を用いて制限酵素認識配列を両端に含む PABPN1 を PCR で増幅し、pGEM-T Easy (Promega) に TA クローニングした。このプラスミドを制限酵素 *NotI* で切断して得たインサートを、同じく *NotI* で切断した FLAG タグ付きの pcDNA3.1/Zeo(+)ベクターと ligation し pcDNA_PABPN1_FLAG を得た。

これをテンプレートとし、プライマー PABPN1_KpnI_forward とプライマー PABPN1_SalI_reverse を用いて両端の制限酵素配列と FLAG タグ配列を含む PABPN1 を PCR で増幅し、pGEM-T Easy (Promega) に TA クローニングした。このプラスミドを制限酵素 *KpnI*, *SalI* で切断して得たインサートを、同じく *KpnI*, *SalI* で切断した pEBMulti-Hyg ベクター (Wako) と ligation し、得られたプラスミド pEB_PABPN1_FLAG を PABPN1 導入用のベクターとした。コントロールベクターとしては元の pEBMulti_Hyg を用いた。

ベクター作成に用いたプライマー配列を以下に示す。

	Primer
XhoI_FLAG_ApaI_forward	TCGAGGATTACAAGGACGACGATGACAAGTAGGGGCC
XhoI_FLAG_ApaI_reverse	CCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCC
PABPN1_NotI_forward	GCGGCCGCGAGTCTGAGCGGCGATG
PABPN1_NotI_reverse	CATCATGGTATTCCCCTTACAAGCGGCCGC
PABPN1_KpnI_forward	GGTACCGCAGATATCCAGCACAGTGGC
PABPN1_SalI_reverse	GTCGACTGATCAGCGGGTTTAAACGG

H23 を、10%FBS 入りの RPMI-1640 培地 (Wako) を用いて 37 °C の CO2 インキュベーターにて培養した。total RNA は RNAiso (TaKaRa) を用いて抽出した。作成した PABPN1 発現ベクターとコントロールベクターを H23 細胞に ViaFect Transfection Reagent (Promega) を用いてリポフェクションし、48 時間後よりハイグロマイシン B (Wako) による薬剤選択を行った。リポフェクションはプラスミド 1 µg あたり試薬 3 µl を使用し、5~20 分室温にて incubate した。ハイグロマイシン B の濃度は 400 µg/ml とした。薬剤選択後、ハイグロマイシン B を除去してから 72 時間後に Complete Mini プロテアーゼ阻害薬 (Roche) を加えた RIPA buffer (PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) によるタンパク質抽出、RNAiso (TaKaRa) による total RNA 抽出を行った。

PABPN1 強制発現を行った細胞とコントロールの細胞で、PABPN1 発現の

違いをリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングによって調べた。リアルタイム PCR は3と同様に random hexamer による cDNA 合成の後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて triplicate で行った。内在性コントロールとして HPRT1 遺伝子を用い ddCt 法により定量を行った。ウエスタンブロッティングは、Tris-SDS β -ME sample buffer (Cosmo Bio) と共に 95 °C で 5 分 incubate したタンパク質を 5–20% グラディエントポリアクリルアミドゲル (SuperSep Ace; Wako) に 1 レーンあたり 30 μ g 注入し、Tris-glycine-SDS running buffer (0.1% SDS, 25 mM Tris Base, 192 mM Glycine) 中で電気泳動した。Hybond P (GE healthcare) に転写し、3% スキムミルクにて室温で 1 時間ブロッキングを行った後、一次抗体と 4 °C で一晩、二次抗体と室温で 1 時間反応させた。PABPN1 抗体は 2 種類使用した。タンパク質の検出は ECL Prime (GE healthcare) を用いて行った。

また、PABPN1 強制発現を行った細胞とコントロールの細胞で、3'UTR 短縮の程度を4と同様の方法でリアルタイム PCR を triplicate で行い評価した。この際、10 個の指標遺伝子に加え、CCND2 と NRAS についても同様に 3'UTR 短縮の程度を調べた。さらに、CCND2 タンパク質産生量の違いを先述と同様の方法でウエスタンブロッティングによって調べた。

使用した抗体と希釈率の一覧を以下に示す。

タンパク		抗体	希釈率
PABPN1 ①	一次抗体	ab75855; abcam	1:5000
	二次抗体	sc-2030; Santa Cruz Biotechnology	1:1500
PABPN1 ②	一次抗体	sc-33007; Santa Cruz Biotechnology	1:500
	二次抗体	sc-2350; Santa Cruz Biotechnology	1:2000
CCND2	一次抗体	ab-3085; abcam	1:50
	二次抗体	sc-2005; Santa Cruz Biotechnology	1:1500
β -actin	一次抗体	A5441; SIGMA-ALDRICH	1:20000
	二次抗体	sc-2060; Santa Cruz Biotechnology	1:20000
FLAG	一次抗体	F-1804; SIGMA-ALDRICH	1:1000
	二次抗体	sc-2005; Santa Cruz Biotechnology	1:3000

さらに、PABPN1 発現ベクターを導入した H23 細胞とコントロールベクターを導入した H23 細胞で増殖曲線を作成し、増殖速度の違いを評価した。2ml プレートに 2×10^4 個ずつ細胞を蒔き、1、3、5、7 日後にトリプシン-EDTA (Gibco) で剥がして回収し TC10 全自動セルカウンター (Bio-Rad) を用いて計測した。各 3 well の計測を triplicate で行った。

6 臨床データ収集および統計解析

全症例において、診療記録をもとに臨床病理学的データを抽出した。診断は病理学的所見に基づき、TNM分類第7版(76)によって病期を決定した。術後経過観察は6か月ごとに行った。本研究では肺癌再発をエンドポイントとし、手術日から肺癌再発までを無再発期間として計測した。無再発症例において、肺癌以外による死亡は打ち切りとして扱った。再発形式によって、同側胸腔内および同側リンパ節における再発を局所領域再発 (locoregional recurrence)、それ以外を遠隔再発 (distant recurrence) に分類した。

統計解析は全て JMP 11 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。APA スコアのカットオフ値は肺癌再発に関する ROC 曲線を描いて決定した。APA スコアと関連遺伝子の発現量および臨床病理学的特徴との関係は Student's t-test、Welch's method および χ^2 -test によって解析した。APA スコアと positron emission tomography (PET) 検査における腫瘍の the maximum standardized uptake values (SUVmax) との相関は Pearson correlation coefficient によって評価した。肺癌無再発率は Kaplan-Meier 法によって計算し log-rank test で比較した。予後因子についての多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。

結果

1 指標遺伝子の選択

Rmodel によるマイクロアレイデータ解析結果を検討し、GSE10245 データセットに含まれていた肺腺癌 40 例のうち 20 例以上で 3'UTR 短縮がみられた 16 遺伝子を抽出した。この 16 遺伝子全てにおいて、GSE10245 データセットに含まれていた肺扁平上皮癌 18 例のうち 11 例以上で 3'UTR 短縮がみられた。肺腺癌および肺扁平上皮癌における rmodel 解析結果を以下に示す。

肺腺癌 40 例のうち 20 例以上で 3'UTR 短縮がみられた 16 遺伝子

	SSR1	METTL9	TMED5	NDFP2	SCAMP1	RBM33	C1orf107	ESYT2	SMC1A	C1orf52	HN1L	MAPK9	MUC20	EPN3	PDCC2	RNASEH2C
合計	33	31	31	30	27	26	23	22	24	22	22	22	21	20	20	20
GSM258551	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GSM258552	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
GSM258554	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
GSM258558	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
GSM258559	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
GSM258560	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
GSM258561	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
GSM258564	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
GSM258567	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
GSM258568	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
GSM258569	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
GSM258571	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

GSM258572	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GSM258573	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
GSM258574	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
GSM258575	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
GSM258576	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GSM258577	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
GSM258579	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
GSM258581	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
GSM258582	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
GSM258584	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
GSM258586	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
GSM258587	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
GSM258588	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
GSM258589	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
GSM258591	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
GSM258592	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
GSM258593	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
GSM258595	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
GSM258597	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
GSM258598	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
GSM258600	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
GSM258601	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
GSM258602	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
GSM258604	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
GSM258605	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
GSM258606	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
GSM258607	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0
GSM258608	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0

1, 3'UTR 短縮あり、0, 3'UTR 短縮なし

肺扁平上皮癌における上記 16 遺伝子の 3'UTR 短縮の有無

	SSR1	METTL9	TMED5	NDPIP2	SCAMP1	RBM33	C1orf107	ESYT2	SMC1A	C1orf52	HN1L	MAPK9	MUC20	EPN3	PDCD2	RNASEH2C
合計	18	17	17	18	18	17	11	14	14	18	18	15	17	12	12	18
GSM258553	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
GSM258555	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
GSM258556	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
GSM258557	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
GSM258562	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
GSM258563	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
GSM258565	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
GSM258566	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
GSM258570	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GSM258578	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
GSM258580	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
GSM258583	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
GSM258585	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
GSM258590	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
GSM258594	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GSM258596	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
GSM258599	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GSM258603	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

1, 3'UTR 短縮あり、0, 3'UTR 短縮なし

次に、当院で採取された肺癌切除検体 7 例と正常肺組織 8 例を用いて、16 遺伝子における 3'UTR 短縮の程度をリアルタイム PCR によって評価した。それぞれの遺伝子について $ddCt2 - ddCt1$ 、すなわち $-\log_2$ (正常肺組織と比較した肺癌における完全長 mRNA 割合の比) を算出して縦軸にとると図 6 のようになった。肺癌組織における 3'UTR 短縮の程度が強かった上位 10 遺伝子 (C1orf52, DIEXF, ESYT2, HN1L, MUC20, NDFIP2, RBM33, SCAMP1, SMC1A, SSR1) を、肺癌における 3'UTR 短縮の指標遺伝子として選択した。以降の検討では、この 10 個の指標遺伝子のうち「3'UTR 短縮あり」と判定された遺伝子の数、すなわち完全長 mRNA の割合が正常肺組織に比べ半分未満となった遺伝子の数を APA スコアと定義し、この値によって 3'UTR 短縮の程度を評価した。

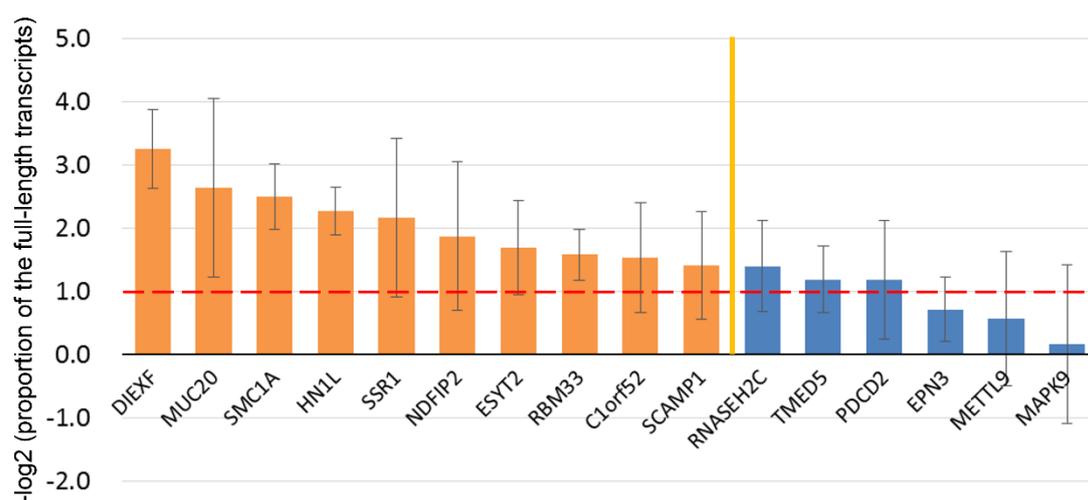


図 6 rmodel によって選ばれた 16 遺伝子の 3'UTR 短縮程度
縦軸は $-\log_2$ (正常肺組織と比較した肺癌における完全長 mRNA 割合の比) である。例えばこれが 1 のとき、3'UTR の長い mRNA の割合が正常肺組織に比べ肺癌切除検体において 1/2 になっていることを表す。

一方、過去の文献において 3'UTR 短縮が起こりやすいとされていた 10 遺伝子 (KRAS, NRAS, CCND1, CCND2, E2F1, FGF2, IMP1, MAPKAPK3, PDRG1, PDXK) についても肺癌切除検体 7 例と正常肺組織 8 例を用いて同様に 3'UTR 短縮の程度を評価した。結果は図のようになり、CCND2 と NRAS では 3'UTR 短縮がみられたものの、それ以外の遺伝子では rmodel によって選ばれた指標遺伝子に比べ 3'UTR 短縮の程度は小さかった。

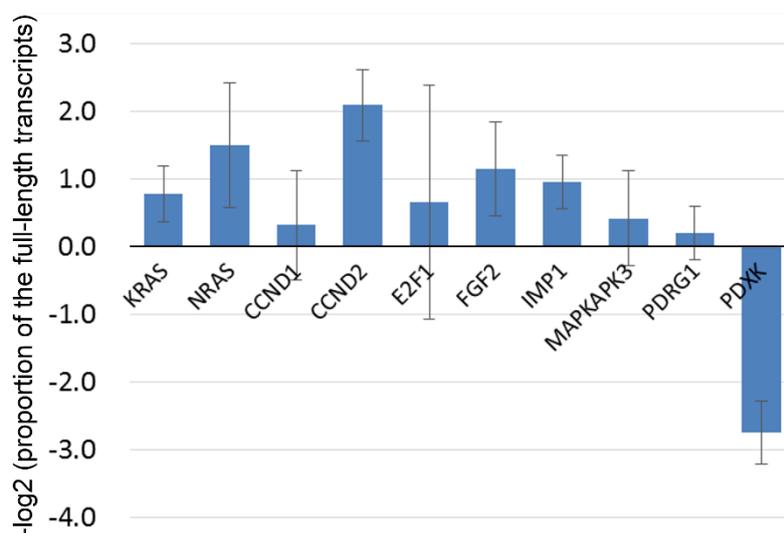


図 7 過去の文献から選ばれた 10 遺伝子の 3'UTR 短縮程度
 図 6 の rmodel によって選んだ 16 遺伝子と比較すると、CCND2 と NRAS 以外の遺伝子では 3'UTR 短縮程度が小さかった。

2 APA スコアと腫瘍の悪性度の関係

原発性非小細胞肺癌 147 例の肺癌サンプルおよび非喫煙者 10 例の正常肺サンプルを解析した。臨床病理学的特徴を表 1 に示す。

表 1 非小細胞肺癌手術症例の臨床病理学的特徴

	Tumor tissues (<i>n</i> = 147)	Normal tissues (<i>n</i> = 10)
Age (years)		
Median, range	69, 34-85	65, 55-75
<70 (%)	74 (50)	7 (70)
≥70 (%)	73 (50)	3 (30)
Gender (%)		
Male	84 (57)	3 (30)
Female	63 (43)	7 (70)
Smoking habit (%)		
Negative history	54 (37)	10 (100)
Positive history	93 (63)	0 (0)
Histological type (%)		
Adenocarcinoma	122 (83)	10 (100)
Squamous cell carcinoma	18 (12)	0 (0)
Others	7 (5)	0 (0)
Disease stage (%)		
IA	68 (46)	10 (100)
IB	39 (27)	0 (0)
IIA	10 (7)	0 (0)
IIB	9 (6)	0 (0)
IIIA	21 (14)	0 (0)

T factor (%)		
T1	75 (51)	10 (100)
T2	58 (39)	0 (0)
T3	14 (10)	0 (0)
N factor (%)		
N0	117 (80)	10 (100)
N1	10 (7)	0 (0)
N2	20 (14)	0 (0)
EGFR mutation (%)		
Negative	75 (51)	-
Positive	41 (28)	-
Exon 19	15	-
Exon 21	26	-
Unknown	31 (21)	-
Lymphatic invasion (%)		
Negative	115 (78)	10 (100)
Positive	32 (22)	0 (0)
Vascular invasion (%)		
Negative	96 (65)	10 (100)
Positive	51 (35)	0 (0)
Adjuvant chemotherapy (%)		
Negative	110 (75)	10 (100)
Positive	37 (25)	0 (0)
Recurrence		
Negative	107 (73)	10 (100)
Positive	40 (27)	0 (0)
Locoregional	13	-
Distant	27	-

APA スコアのカットオフ値の設定および検証を行うために、対象症例を、2005年6月から2006年9月までに採取した肺癌組織47例と正常肺組織4例からなるトレーニングセットおよび2006年10月から2009年5月までに採取した肺癌組織100例と正常肺組織6例からなるテストセットの2群に分けた。2群間における臨床病理学的特徴の比較を表2に示す。

表2 トレーニングセットとテストセットの比較

	Training set		Test set		<i>P</i> (<i>Tumor tissues</i>)
	Tumor tissues (<i>n</i> = 47)	Normal tissues (<i>n</i> = 4)	Tumor tissues (<i>n</i> = 100)	Normal tissues (<i>n</i> = 6)	
Age (years)					
Median, range	67, 34-83	61, 55-75	70, 41-85	66, 61-75	
<70 (%)	26 (55)	3 (75)	48 (48)	4 (67)	NS
≥70 (%)	21 (45)	1 (25)	52 (52)	2 (33)	
Gender (%)					
Male	32 (68)	0 (0)	52 (52)	3 (50)	NS
Female	15 (32)	4 (100)	48 (48)	3 (50)	
Smoking habit (%)					
Negative history	13 (28)	4 (100)	41 (41)	6 (100)	NS
Positive history	34 (72)	0 (0)	59 (59)	0 (0)	
Histological type (%)					
Adenocarcinoma	36 (77)	4 (100)	86 (86)	6 (100)	NS
Squamous cell carcinoma	9 (19)	0 (0)	9 (9)	0 (0)	
Others	2 (4)	0 (0)	5 (5)	0 (0)	

Disease stage (%)						
IA	16 (34)	4 (100)	52 (52)	4 (67)		NS
IB	13 (28)	0 (0)	26 (26)	2 (33)		
IIA	5 (11)	0 (0)	5 (5)	0 (0)		
IIB	4 (9)	0 (0)	5 (5)	0 (0)		
IIIA	9 (19)	0 (0)	12 (12)	0 (0)		
T factor (%)						
T1	20 (43)	4 (100)	55 (55)	4 (67)		NS
T2	22 (47)	0 (0)	36 (36)	2 (33)		
T3	5 (11)	0 (0)	9 (9)	0 (0)		
N factor (%)						
N0	33 (70)	4 (100)	84 (84)	6 (100)		NS
N1	5 (11)	0 (0)	5 (5)	0 (0)		
N2	9 (19)	0 (0)	11 (11)	0 (0)		
EGFR mutation						
Negative	31 (66)	-	44 (44)	-		NS
Positive	15 (32)	-	26 (26)	-		
Exon 19	6	-	9	-		
Exon 21	9	-	17	-		
Unknown	1 (2)	-	30 (30)	-		
Lymphatic invasion (%)						
Negative	34 (72)	4 (100)	81 (81)	6 (100)		NS
Positive	13 (28)	0 (0)	19 (19)	0 (0)		
Vascular invasion (%)						
Negative	27 (57)	4 (100)	69 (69)	6 (100)		NS
Positive	20 (43)	0 (0)	31 (31)	0 (0)		
Adjuvant chemotherapy (%)						
Negative	33 (70)	4 (100)	77 (77)	6 (100)		NS
Positive	14 (30)	0 (0)	23 (23)	0 (0)		

Recurrence					
Negative	34 (72)	4 (100)	73 (73)	6 (100)	NS
Positive	13 (28)	0 (0)	27 (27)	0 (0)	
Locoregional	5	-	8	-	
Distant	8	-	19	-	

NS, not significant.

観察期間中央値はトレーニングセットで 78 か月、テストセットで 58 か月であった。

原発性非小細胞肺癌 147 例と正常肺組織 10 例について APA スコアを決定した。肺癌および正常肺における APA スコアの分布を表 3、図 8 に示す。

表 3 肺癌および正常肺における APA スコアの分布

APA スコア	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
正常肺組織	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0
腺癌	25	24	12	11	18	12	8	6	5	1
扁平上皮癌	1	0	0	3	2	3	3	3	3	0
その他	0	1	1	2	1	1	0	0	1	0

APA スコアの中央値はそれぞれ、正常肺組織 0、腺癌 2.5、扁平上皮癌 5.5、その他 3 であり、図 8 に示すように腺癌に比べ扁平上皮癌やその他で APA スコアが高い傾向があった。

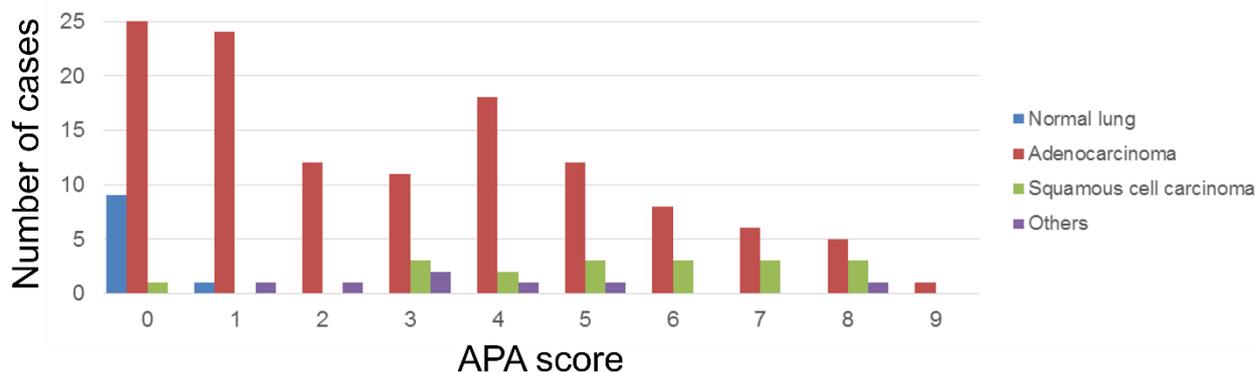


図 8 正常肺および肺癌における APA スコアの分布
腺癌（赤）と比較し、扁平上皮癌（緑）やその他（紫）において APA スコアが高い傾向があった。

APA スコアの最適なカットオフ値はトレーニングセットにおける ROC 曲線より 5 と決定され、テストセットの結果からもこの値が最適であると確かめられた。

再発をエンドポイントとしたそれぞれの ROC 曲線を以下に示す。

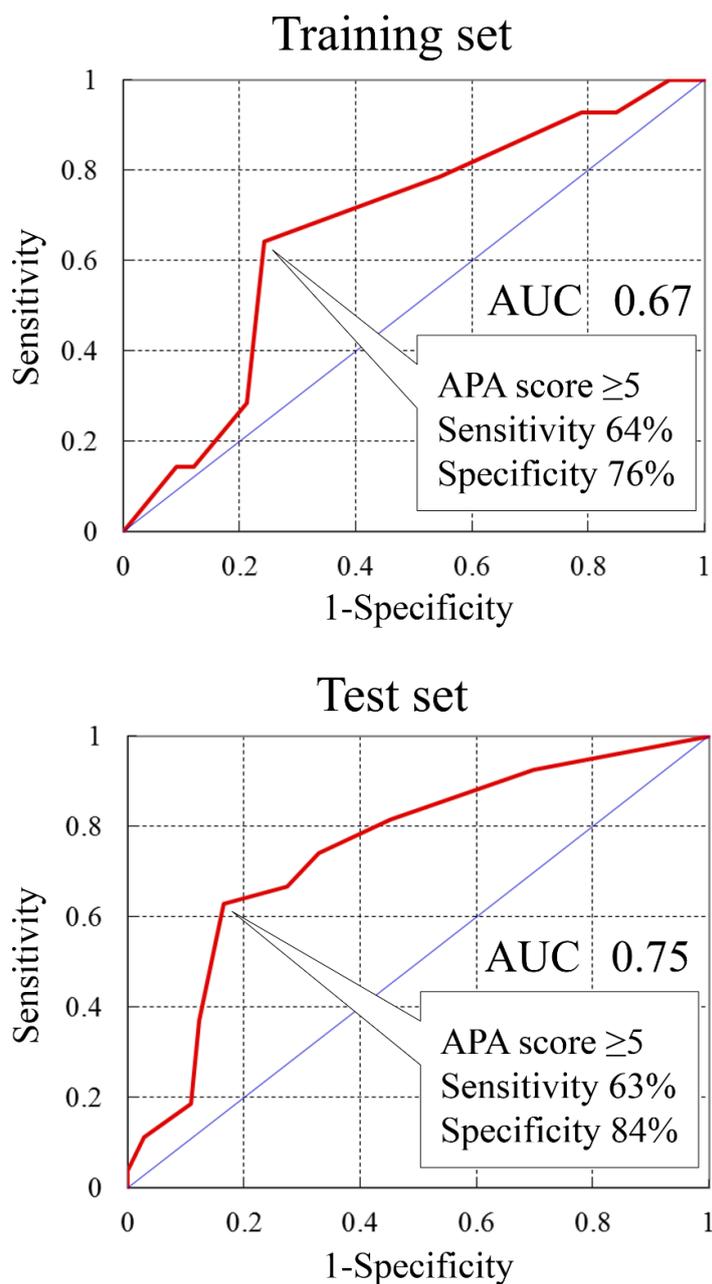


図9 再発をエンドポイントとした APA スコアの ROC 曲線
トレーニングセット、テストセットのいずれにおいても、APA スコア
の閾値を 5 と設定するのが最適という結果であった。

3'UTR 短縮の程度と臨床病理学的な特徴との関係を表 4 に示す。

APA スコア高値は T2 以上、リンパ節転移陽性、血管浸潤陽性と有意に相関しており、非腺癌および術後補助化学療法施行例が多かった。EGFR 遺伝子変異の有無とは有意な相関を認めなかった。APA スコア高値群において肺癌再発が多かったが、再発形式の違いはみられなかった。

表 4 3'UTR 短縮の程度と臨床病理学的な特徴との関係

	Training set (n = 47)			Test set (n = 100)		
	High APA	Low APA	<i>P</i>	High APA	Low APA	<i>P</i>
Age (years)						
<70	7	19	NS	13	35	NS
≥70	10	11		16	36	
Sex						
Male	16	16	0.01	19	33	NS
Female	1	14		10	38	
Smoking habit						
Negative history	1	12	0.03	21	38	NS
Positive history	16	18		8	33	
Histological type						
Adenocarcinoma	11	25	NS	21	65	0.03
Others	6	5		8	6	
T factor						
T1	4	16	NS	9	46	0.004
T2, T3	13	14		20	25	

N factor						
N0	9	24	NS	18	66	<0.001
N1, N2	8	6		11	5	
Lymphatic invasion						
Negative	10	24	NS	20	61	NS
Positive	7	6		9	10	
Vascular invasion						
Negative	6	21	0.04	12	57	<0.001
Positive	11	9		17	14	
EGFR mutation						
Negative	14	18	NS	19	25	NS
Positive	2	13		7	19	
Exon 19	0	6		3	6	
Exon 21	2	7		4	13	
Unknown	1	0		3	27	
Adjuvant chemotherapy						
Negative	10	23	NS	18	59	0.04
Positive	7	7		11	12	
Recurrence						
Negative	8	26	<0.01	12	61	<0.001
Positive	9	4		17	10	
Locoregional	3	2	NS	5	3	NS
Distant	6	2		12	7	

NS, not significant.

APA スコア高値群と低値群に分けて、再発をエンドポイントに肺癌無再発率を Kaplan-Meier 法によって計算したところ、図 10 のようになった。log-rank test で比較すると、トレーニングセット、テストセットのいずれにおいても APA スコア高値群が有意に予後不良であった。

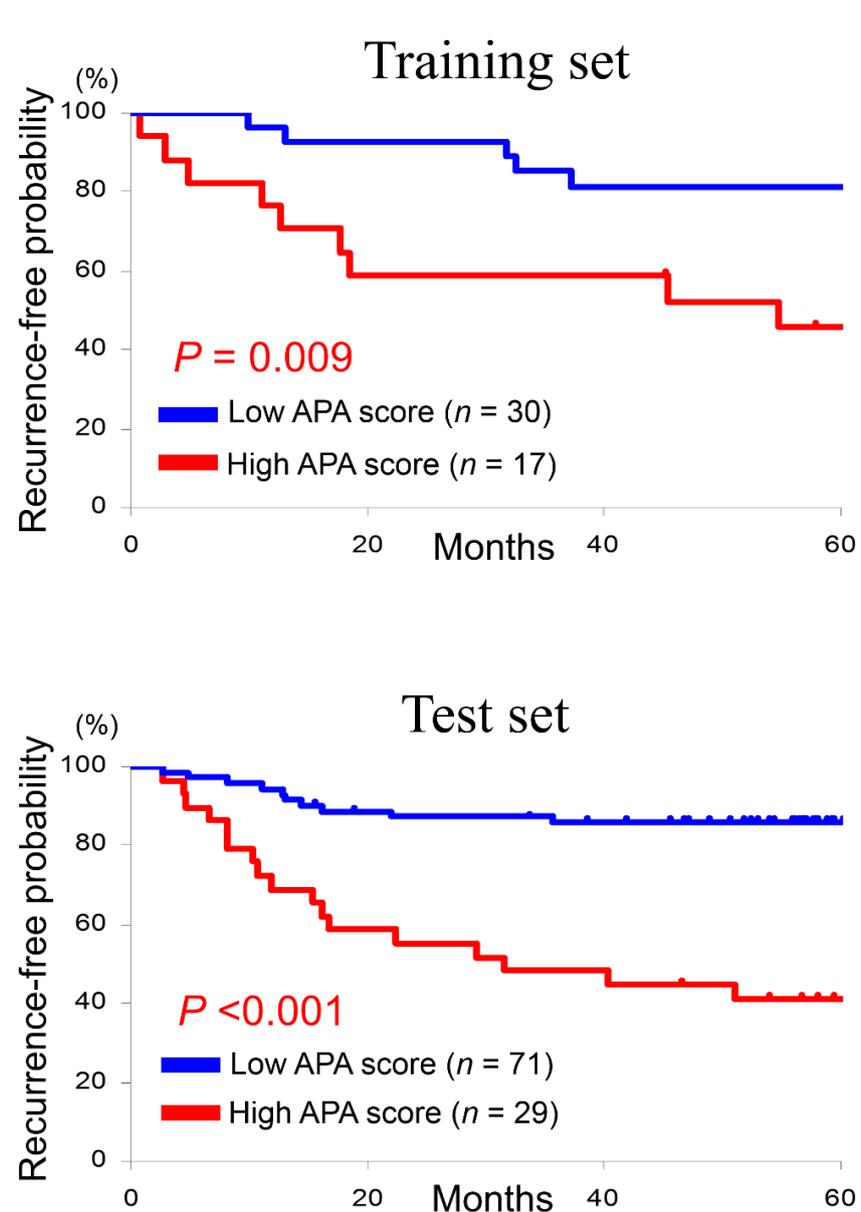


図 10 APA スコアと肺癌無再発率との関係
トレーニングセット、テストセットのいずれにおいても
APA スコア高値群が有意に予後不良であった。

トレーニングセット、テストセットそれぞれにおいて、再発をエンドポイントとした log-rank test による単変量解析を行った結果を表 5 に示す。APA スコア高値、組織型、T 因子、N 因子、リンパ管浸潤の有無が 2 群に共通する予後因子であった。

表 5 単変量解析による予後予測因子

	Training set (<i>n</i> = 47)		Test set (<i>n</i> = 100)	
	Hazard ratio	<i>P</i>	Hazard ratio	<i>P</i>
APA score ≥ 5	3.9	0.009	5.4	<0.001
Age ≥ 70 years	1.1	NS	0.6	NS
Male	3.5	NS	1.7	NS
Positive smoking history	2.6	NS	2.3	NS
Non-adenocarcinoma	3.1	0.03	2.8	0.02
T2, T3	13.7	<0.001	5.2	<0.001
N1, N2	2.9	0.04	9.7	<0.001
Lymphatic invasion (+)	3.3	0.02	5.8	<0.001
Vascular invasion (+)	1.9	NS	8.2	<0.001
Adjuvant chemotherapy	2.5	NS	4.8	<0.001

NS, not significant.

テストセットにおいて、再発をエンドポイントとし、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った結果を表 6 に示す。表 5 に示した臨床病理学的特徴のうちリンパ管浸潤・血管浸潤の有無、術後補助化学療法の有無は N 因子と交絡が非常に強かったため除外し、残る 7 項目で解析を行った。APA スコア高値、リンパ節転移陽性および年齢 70 歳以上が独立した予後規定因子であった。

表 6 多変量解析による予後予測因子

	Test set (<i>n</i> = 100)		
	Hazard ratio	95% CI	<i>P</i>
APA score ≥ 5	3.0	1.1 – 8.0	0.03
T2, T3	2.6	0.9 – 7.6	NS
N1, N2	4.7	1.8 – 12.5	0.002
Age ≥ 70 years	0.4	0.1 – 0.8	0.02
Male	1.0	0.3 – 3.3	NS
Positive smoking history	2.2	0.6 – 7.6	NS
Non-adenocarcinoma	1.6	0.6 – 4.2	NS

NS, not significant; CI, confidence interval.

そこで、リンパ節転移のない群とリンパ節転移のある群に分け、それぞれにおける APA スコアと予後の関係を図 11 に示した。リンパ節転移のない 117 例に限定した場合でも、APA スコア高値群が予後不良であった。リンパ節転移のある群では症例数が少なく有意差に至らなかったが、同様の傾向が認められた。

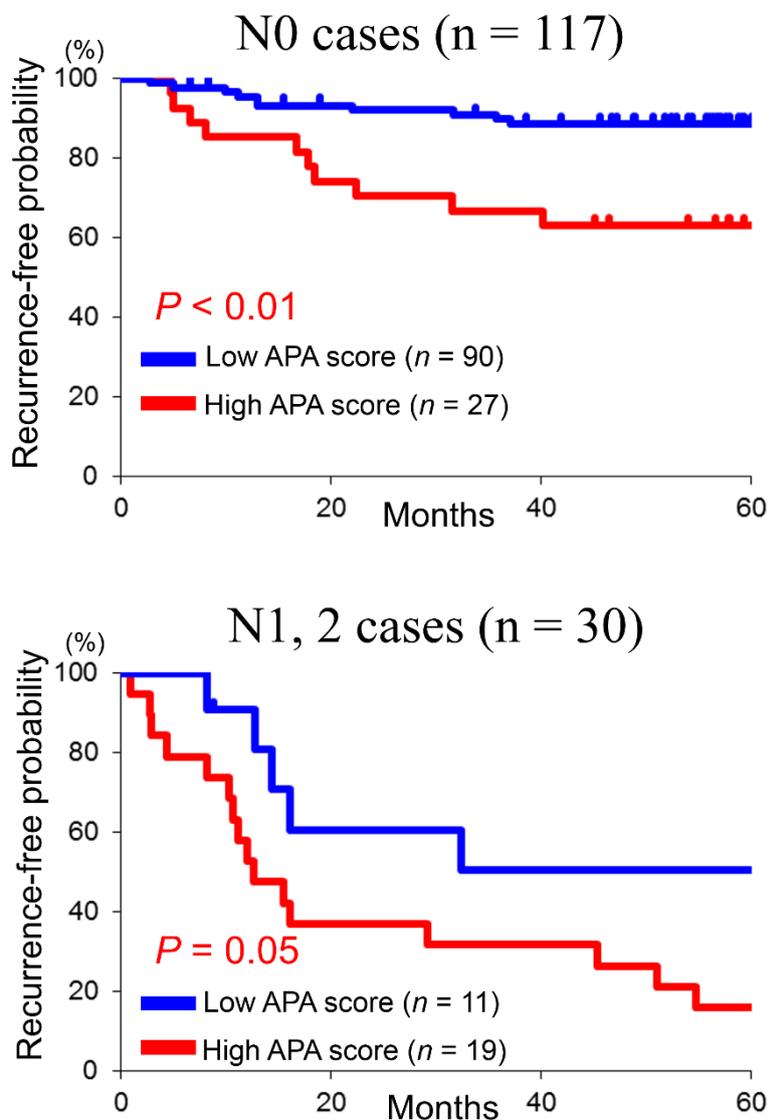


図 11 リンパ節転移の有無で分けた APA スコアと肺癌無再発率との関係
リンパ節転移の有無によらず、APA スコア高値群が低値群に比べ予後不良であった。

PET 検査は 147 例のうち 130 例で術前に施行され、115 例 (78%) において腫瘍の SUVmax 値が測定されていた。腫瘍の SUVmax 値は APA スコアと相関しており ($r = 0.53$; $P < 0.001$)、APA スコア低値群に比べ高値群の方が腫瘍の SUVmax 値が高かった (11.8 ± 8.0 vs. 5.6 ± 4.8 ; $P < 0.001$)。

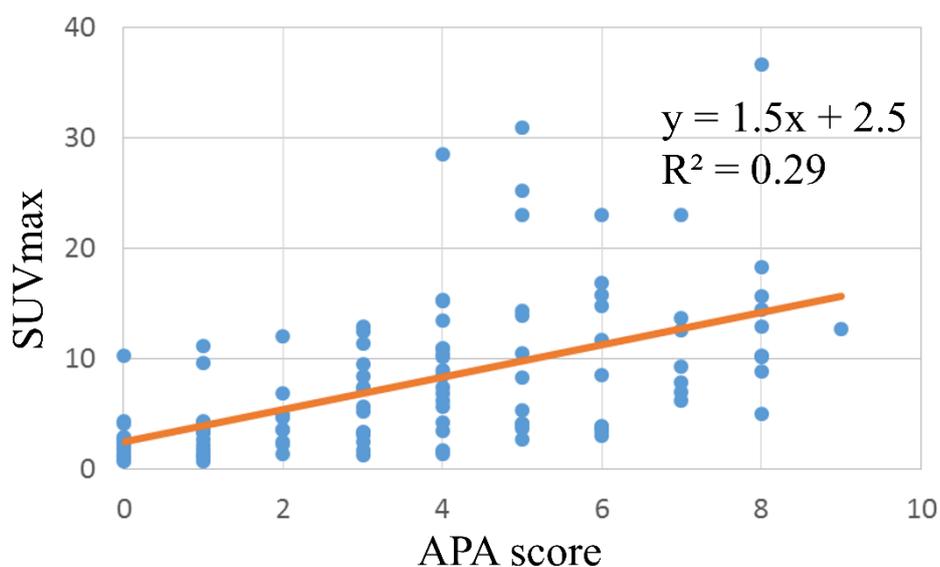


図 12 APA スコアと PET における腫瘍の SUVmax との関係
青い点が各症例であり、橙色の線が近似曲線を表す。
腫瘍の SUVmax 値は APA スコアと相関していた ($r = 0.53$; $P < 0.001$)。

3 PABPN1 発現量と APA スコア、腫瘍の悪性度の関係

APA 関連遺伝子として選択した 6 遺伝子の発現量と APA スコアの関係を図 11 に示す。腫瘍の APA スコアと PABPN1 遺伝子の発現量とは逆相関の関係にあった ($r = 0.53$; $P < 0.001$)。APA スコア高値群では、増殖マーカーである MKI67、TOP2A、MCM2 が高発現である一方、PABPN1、CPEB1 は低発現であった。

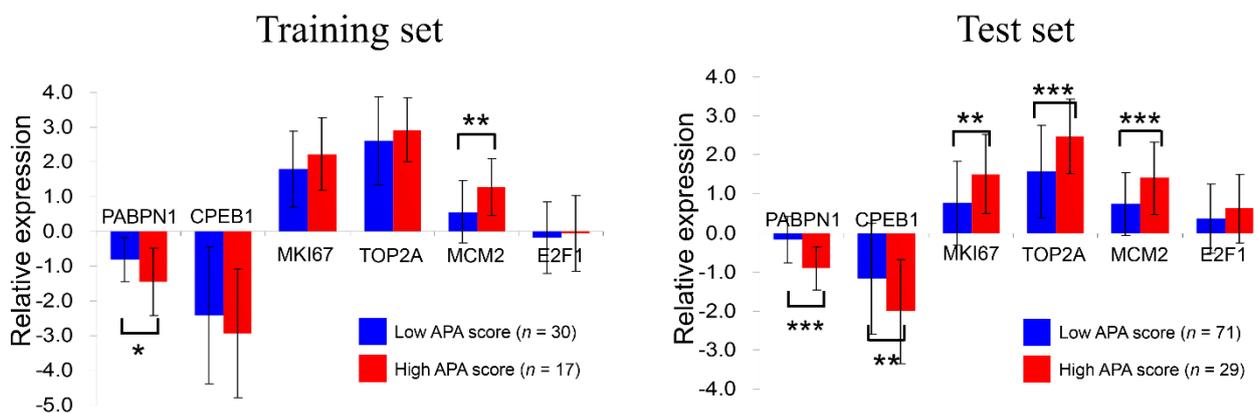


図 13 APA スコアと関連遺伝子発現量との関係
APA スコア高値群では、増殖マーカーである MKI67、TOP2A、MCM2 が高発現である一方、PABPN1、CPEB1 は低発現であった。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

肺癌および正常肺における PABPN1 遺伝子の発現量の分布を図 14 に示す。正常肺 10 例の平均値を基準として log2 スケールで表した。肺癌 147 例における PABPN1 発現量の中央値は-0.3 であり、正常肺での発現量よりわずかに少ない程度であった。Dicer と Drosha の低発現が卵巣癌の予後不良因子であることを示した Merritt らの論文(61)に準じ、PABPN1 および他の関連遺伝子 (CPEB1, MKI67, TOP2A, MCM2, E2F1) について、発現量の中央値をカットオフ値としてそれぞれ 2 群に分けた。

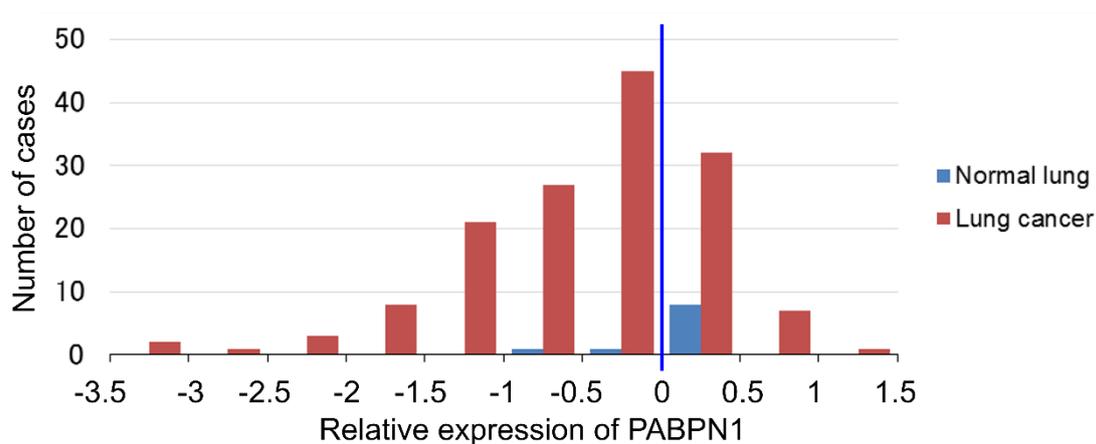


図 14 肺癌および正常肺における PABPN1 発現量の分布
 正常肺の平均値を基準 (0) として log2 スケールで表した。肺癌 147 例における PABPN1 発現量の中央値は-0.3 であり、これをカットオフ値として用いた。

PABPN1 低発現と増殖マーカー高発現との相関は比較的弱く、PABPN1 抑制は増殖マーカーとは独立して 3'UTR 短縮に寄与していた。

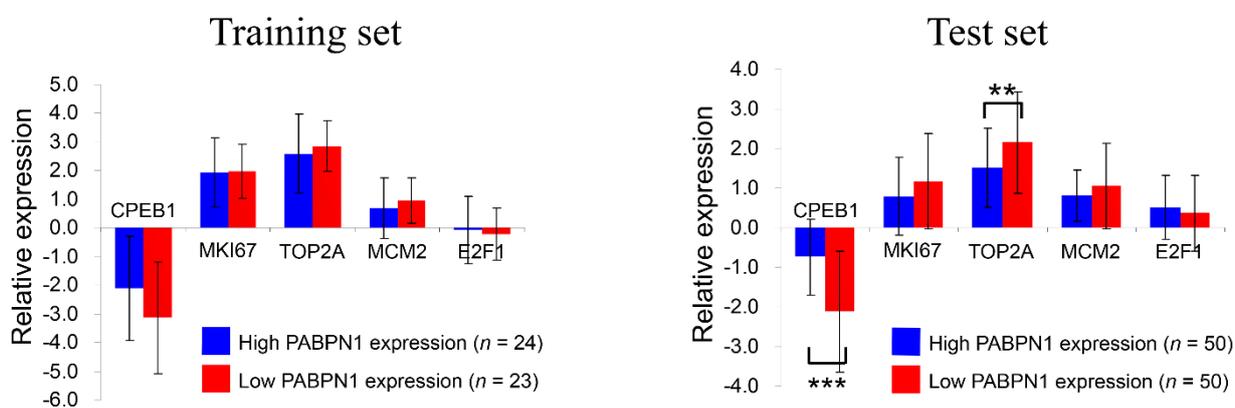


図 15 PABPN1 発現量と関連遺伝子発現量との関係

PABPN1 発現量によって中央値で 2 群に分けて比較した。

PABPN1 低発現と増殖マーカー高発現との相関は比較的弱かった。

, P < 0.01; *, P < 0.001.

最近の報告では E2F や CPEB1 が 3'UTR 短縮をもたらすと示されている(21, 24)。本研究では APA スコアと E2F1 発現量の有意な相関は見出せず、CPEB1 は逆に、APA スコア高値群で発現量が少ない結果となった。さらに CPEB1 発現量は肺癌組織において著明に抑制されていた。

PABPN1 遺伝子の発現量によって中央値で 2 群に分け、再発をエンドポイントに肺癌無再発率を Kaplan-Meier 法によって計算したところ、図 16 のようになった。log-rank test で比較すると、トレーニングセット、テストセットのいずれにおいても PABPN1 低発現群は高発現群に比べ予後不良であった。

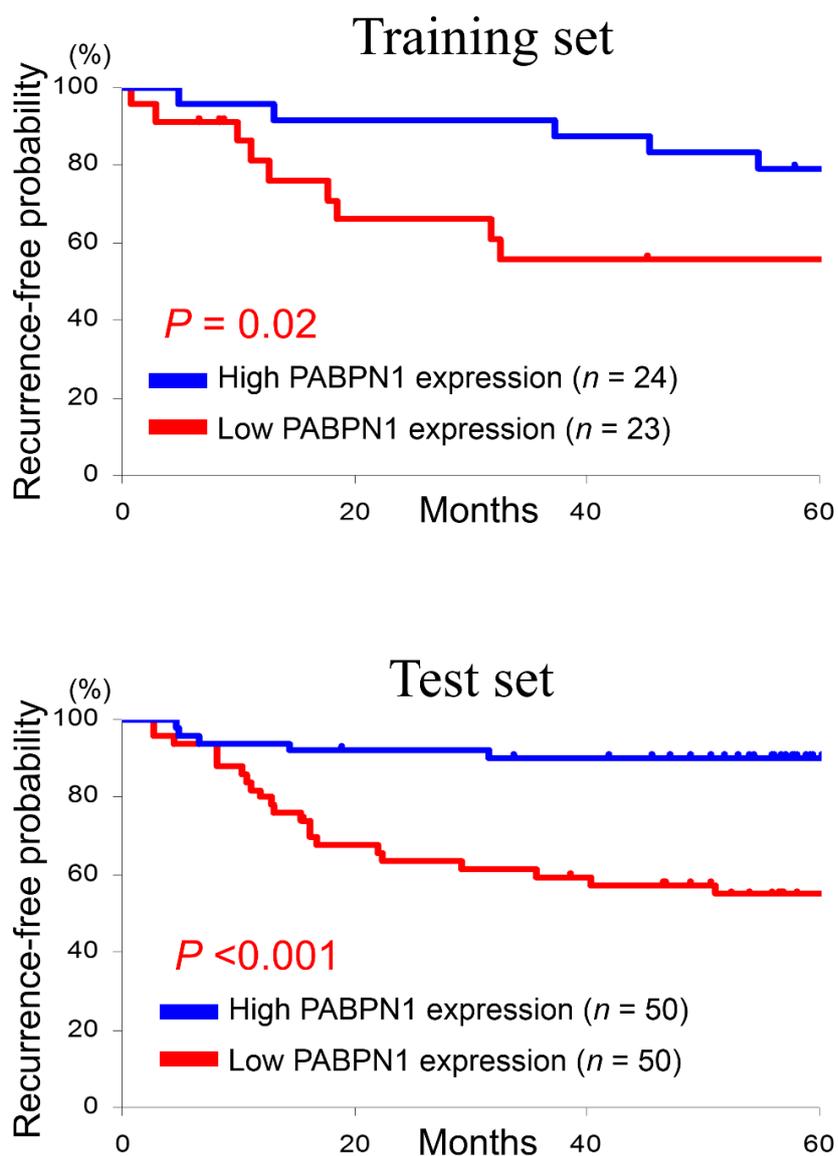


図 16 PABPN1 発現量と肺癌無再発率との関係
 トレーニングセット、テストセットのいずれにおいても
 PABPN1 低発現群は高発現群に比べ有意に予後不良であった。

3'UTR 短縮を制御する遺伝子の発現量が患者の予後に与える影響を調べるために、トレーニングセット、テストセットそれぞれにおいて、再発をエンドポイントとした log-rank test による単変量解析を行った結果を表 7 に示す。PABPN1 遺伝子の低発現のみが 2 群に共通して有意な予後不良因子であった。

表 7 関連遺伝子の発現量と予後との関係 (単変量解析)

	Training set (<i>n</i> = 47)		Test set (<i>n</i> = 100)	
	Hazard ratio	<i>P</i>	Hazard ratio	<i>P</i>
Loss of PABPN1*	3.7	0.02	5.3	<0.001
Loss of CPEB1*	0.7	NS	3.4	0.003
Gain of MKI67*	1.5	NS	4.2	<0.001
Gain of TOP2A*	1.5	NS	5.3	<0.001
Gain of MCM2*	2.9	NS	2.2	0.04
Gain of E2F1*	1.0	NS	2.9	0.008

* 各遺伝子発現量の中央値をカットオフ値として、高発現群と低発現群の 2 群に分けた。

NS, not significant

テストセットにおいて、再発をエンドポイントとし、APA に関連する 6 遺伝子の発現量について Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った結果を表 8 に示す。PABPN1 低発現と E2F1 高発現が独立した予後不良因子であることが示された。

表 8 関連遺伝子の発現量と予後との関係 (多変量解析)

	Test set (<i>n</i> = 100)		
	Hazard ratio	95% CI	<i>P</i>
Loss of PABPN1*	3.5	1.3 – 11.3	0.01
Loss of CPEB1*	2.1	0.8 – 5.8	NS
Gain of MKI67*	1.7	0.5 – 6.2	NS
Gain of TOP2A*	2.1	0.5 – 9.0	NS
Gain of MCM2*	0.4	0.1 – 1.3	NS
Gain of E2F1*	3.9	1.3 – 13.6	0.02

* 各遺伝子発現量の中央値をカットオフ値として、高発現群と低発現群の 2 群に分けた。

NS, not significant; CI, confidence interval.

4 肺癌細胞株への PABPN1 強制発現

まず、H23 細胞から抽出した total RNA における PABPN1 遺伝子の発現量が、正常肺組織から抽出された Human Lung Total RNA (Ambion) と比較して 1/4 と著明に減少していることを確認した。H23 細胞に FLAG タグ付き PABPN1 発現ベクターとコントロールベクターを導入し、薬剤選択を行って安定発現株を得た。リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングによって、PABPN1 が強制発現されていることを下図のとおり確認した。

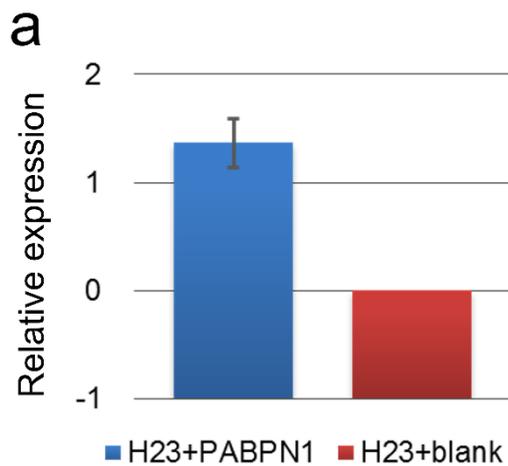
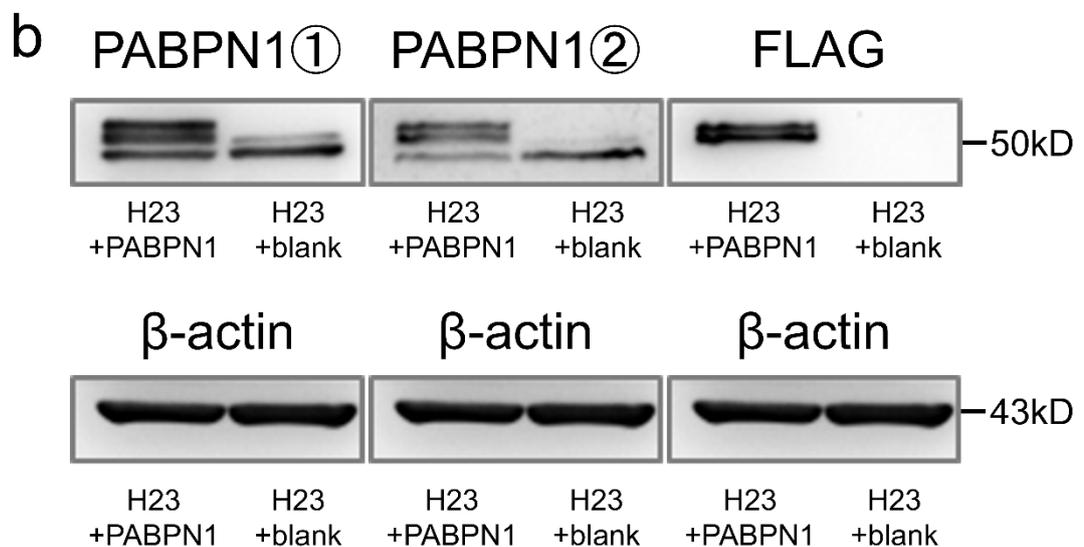


図 17 PABPN1 遺伝子の強制発現

- (a) リアルタイム PCR の Ct 値にして、 1.4 ± 0.2 だけ発現量が増加した。
 (b) 2 種類の PABPN1 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって、PABPN1 強制発現を確認した。図は全て 1 回の泳動で行った結果であり、下段の β -actin を示した図は 3 つとも同一のものである。



この 2 種の細胞において、10 個の指標遺伝子に CCND2、NRAS を加えた 12 遺伝子についてリアルタイム PCR を行い、3'UTR 短縮の程度を評価した。それぞれの遺伝子について ddCt2-ddCt1、すなわち $-\log_2$ (完全長 mRNA 割合の比) を算出して縦軸にとると下図のようになり、PABPN1 強制発現によって 12 遺伝子のうち 7 遺伝子において 3'UTR が有意に延長したことが示された。

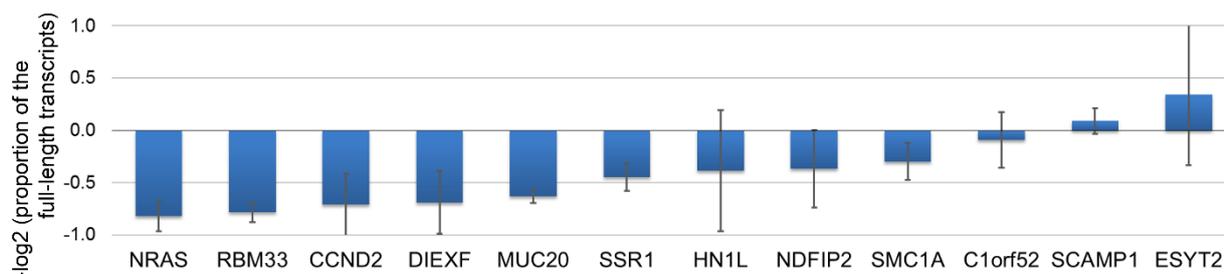


図 18 PABPN1 強制発現による APA 解除

縦軸は $-\log_2$ (完全長 mRNA 割合の比) である。たとえばこれが -1 のとき、PABPN1 強制発現によって 3'UTR の長い mRNA の割合が 2 倍になったことを表す。12 遺伝子のうち 7 遺伝子において 3'UTR が有意に延長した。

これらの遺伝子の mRNA 全発現量の変化は下図の通りであり、PABPN1 強制発現によって全ての遺伝子の発現量が低下していた。ESYT2 や SCAMP1 など、図 18 において明らかな 3'UTR 延長がみられなかった遺伝子においても同様に発現量の低下が見られた。

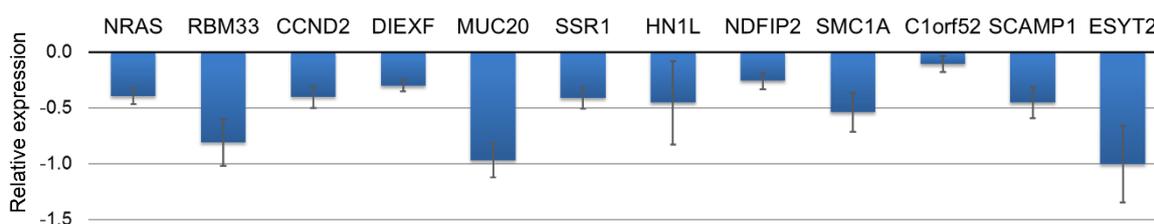


図 19 PABPN1 強制発現による遺伝子発現量の変化
縦軸は発現量の変化を log2 スケールで示しており、たとえばこれが-1 のとき発現量が 1/2 になったことを表す。PABPN1 強制発現によって全ての遺伝子の発現量が低下していた。

このなかで CCND2 についてウエスタンブロッティングを行ったが、PABPN1 強制発現に伴う CCND2 の 3'UTR 短縮解除、mRNA 発現量低下にも関わらず、CCND2 タンパク産生量には顕著な差を確認できなかった。

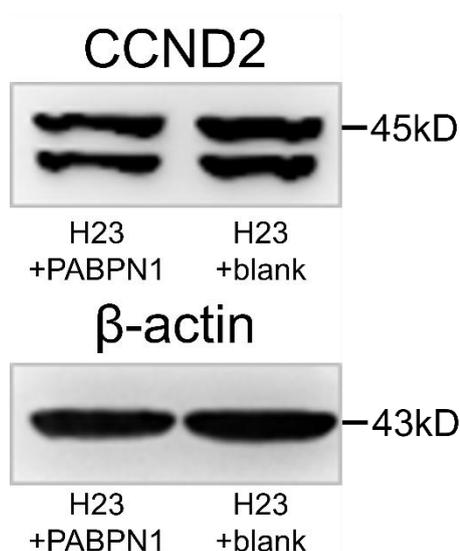


図 20 PABPN1 強制発現による CCND2 発現の変化
CCND2 タンパク産生量には顕著な差を確認できなかった。

PABPN1 発現 H23 細胞とコントロール H23 細胞で増殖速度を比較した。

3well ずつの測定を triplicate で行った結果は下図のとおりであり、PABPN1

発現群の方がやや増殖が遅くなっていたが有意な差には至らなかった。

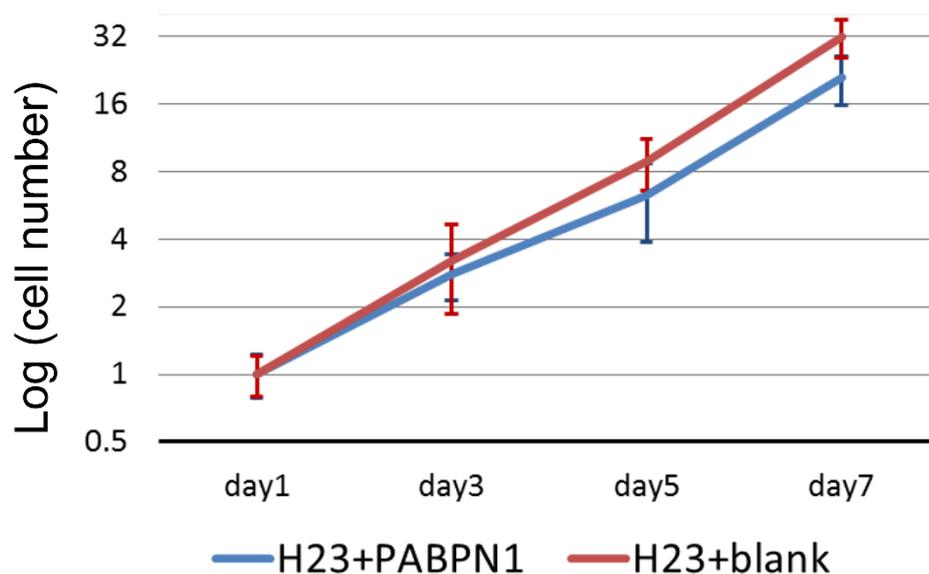


図 21 PABPN1 強制発現による増殖速度の変化

Day 1 の細胞数を基準として day 3, 5, 7 の細胞数を示した。PABPN1 発現群の方がやや増殖が遅くなっていたが有意な差には至らなかった。

考察

1 3'UTR 短縮の評価法

本研究では、Rmodel によるマイクロアレイデータの解析により、肺癌特異的な 3'UTR 短縮の指標遺伝子を同定することで、10 遺伝子に対するリアルタイム PCR のみで 3'UTR 短縮の評価が可能であった。3'UTR 短縮を評価するために、以前は機能のよく知られた遺伝子を対象としたノーザンブロットティングが行われていたが(32)、ゲノム全体にわたる変化である 3'UTR 短縮を評価するには、数種の mRNA を解析するだけでは不十分であり、近年では多くの研究において発現マイクロアレイ(65)や次世代シーケンサー(21, 23, 66)が用いられている。しかしこのような手法はいまだに多くの費用がかかり、臨床の場に適用するのは容易ではない。我々の方法は、発現マイクロアレイの解析という包括的なアプローチと、リアルタイム PCR という簡便で安価な手段を併用したものであり、3'UTR 短縮の評価を簡便で効率良く行うことが可能であった。これまでの研究の結果から 3'UTR 短縮が高頻度で見られると予想された 10 個の遺伝子 (KRAS, NRAS, CCND1, CCND2, E2F1, FGF2, IMP1, MAPKAPK3, PDRG1, PDXK) についても同じ手法によって評価したが、肺癌切除検体における 3'UTR 短縮の程度は小さく、rmodel によって選ばれた指標遺伝子に比べ 3'UTR 短縮の指標として有用ではなかった。

CCND1, FGF2, IMP1 は肺癌も含む癌細胞株において(32)、PDXK は大腸癌切除検体において(66)、CCND2, E2F1, MAPKAPK3, PDRG1 は PABPN1 をノックダウンした骨肉腫細胞株において(23)、それぞれ 3'UTR 短縮が見られたと報告されている。顕著な 3'UTR 短縮をきたす遺伝子は、癌種によって、また細胞株か臨床検体かによって大きく異なる可能性がある。3'UTR 短縮の特徴的な分布によって血液腫瘍の亜分類を診断できるとした、*rmodel* を使用した報告をみてもそれが示唆される(77)。対象とする疾患において特異的に 3'UTR 短縮がみられる指標遺伝子を *rmodel* によって選別する方法は、簡便に効率よく 3'UTR 短縮を評価するうえで非常に有用である。また、リアルタイム PCR によって 3'UTR 短縮を評価する際、これまでの研究では、オリゴ dT プライマーと特異的プライマーを用い、3'UTR の長い mRNA と 3'UTR の短い mRNA それぞれの 3'末端でリアルタイム PCR を行って比較することが多かった(23, 66)。我々も当初はこの手法で試みたが、臨床手術検体という多様なサンプルを対象とする場合、片側のプライマーのみが特異的な PCR では非特異的増幅が生じやすく、正確な結果を得にくかった。そのため本研究では、3'UTR 遠位端に位置し完全長の mRNA のみ増幅されるプライマーセットと、翻訳領域に位置し長い mRNA と短い mRNA のいずれも増幅されるプライマーセットを用意し、その差分を取るという方法によって

3'UTR 短縮を評価した。この方法では両側とも特異的プライマーであるため、非特異的な増幅を生じることなく正確な評価が可能であった。

Rmodel は 2 つのサンプルグループを比較し、プローブレベルのパターンに顕著な差が見られた場合に、プローブセットをその境界で区分けするプログラムである(67)。これと同様の概念で全 RNA シークエンスのデータを解析した研究が最近報告された(78)。この研究では、the Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録された全 RNA シークエンスのデータを解析し、リード数を 1 塩基ごとにプロットして、その分布を正常組織と癌組織で比較している。3'UTR 短縮が起きている場合には、図 22 のようにある点を境に急にリード数が減少することとなる。

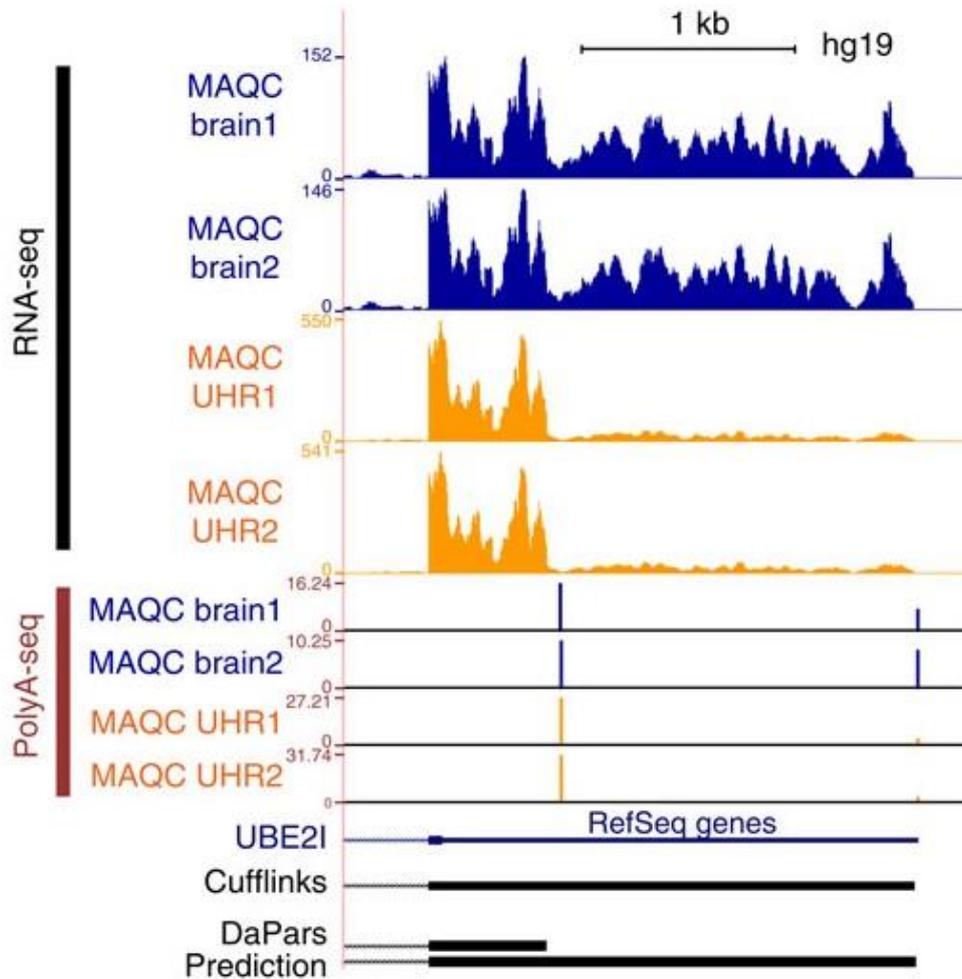


図 22 全 RNA シーケンスデータ解析による APA の評価 (77)
 UBE2I 遺伝子の 3'UTR におけるリード数の変化より、MAQC brain と比較して
 MAQC universal human reference において 3'UTR が短縮していると判断できる。
 下段の polyA シーケンスによる結果と一致している。

Rmodel による解析と比較すると、既定のプローブに限定されず 1 塩基レベルで評価できる点、既知の遺伝子マップにとらわれない点が優れている。この解析では、肺腺癌、肺扁平上皮癌、乳癌、腎癌、頭頸部扁平上皮癌、膀胱癌、子宮体癌の 7 種類を比較しているが、やはり癌種によって 3'UTR 短縮をきたす遺伝子の数、種類、頻度など 3'UTR 短縮プロフィールが大きい

く異なっていることが示されており、対象疾患に特異的な指標遺伝子を選ぶ重要性が確認できる。また 20%以上の肺癌サンプルで繰り返し APA がみられた 790 遺伝子が示されており、本研究で rmodel によって選んだ 10 個の指標遺伝子のうち 4 個が含まれたが、先述した過去の文献から選んだ 10 個の遺伝子から含まれたものは 1 個のみであった。

2 3'UTR 短縮の機序

3'UTR 短縮が起こる機序については、現在研究が盛んに行われており、大きく分けて 2 種類の説明がなされている。1 つは何らかの原因によって 3'UTR の短い mRNA の方が 3'UTR の長い mRNA よりも多く合成されているとするものであり、もう 1 つは 3'UTR の長い mRNA の方が 3'UTR の短い mRNA より分解されやすいことによるものである。前者には、細胞増殖の亢進に伴い E2F の働きによって切断因子が誘導されたとする報告や(21)、PABPN1 や CPEB1 といった APA を制御する遺伝子の発現量の変化によるとする報告が含まれる(23, 24)。一方、後者の立場として、腫瘍で発現量が増加する miRNA によって 3'UTR の長い mRNA が分解され、相対的な 3'UTR 短縮がもたらされているとする報告がある(25, 79)。このような提唱されている機序のうち、どれが癌細胞において優位に機能しているのかはいまだ

不明である。

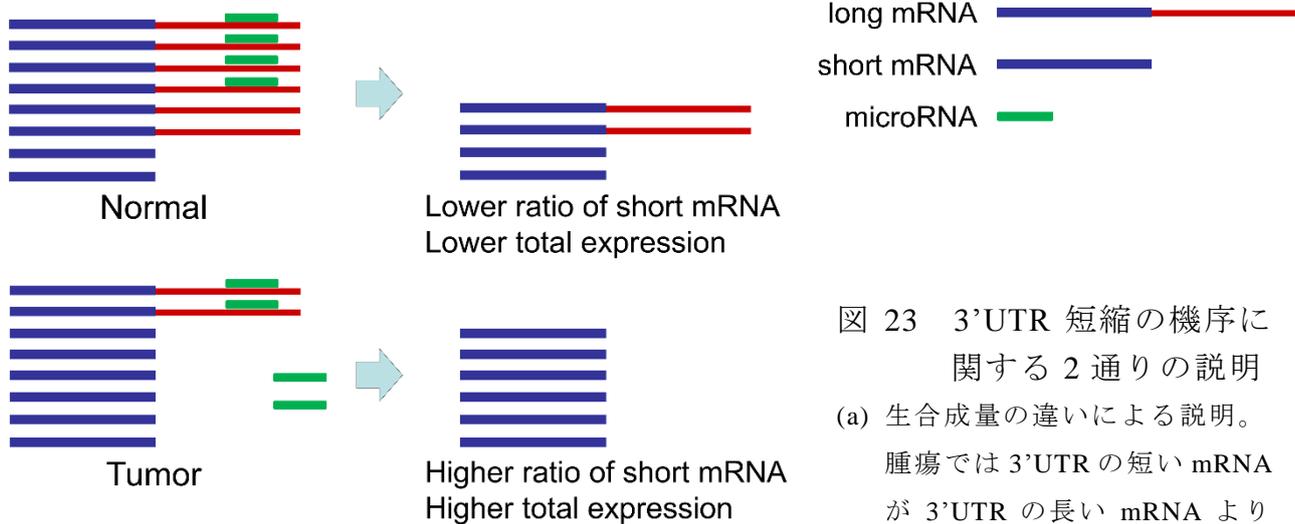
本研究における肺癌切除検体では、PABPN1 低発現と増殖マーカー遺伝子の高発現はいずれも 3'UTR 短縮および患者の予後不良と相関していた。

PABPN1 低発現と増殖マーカー遺伝子の高発現は相関しておらず、PABPN1 発現低下によって 3'UTR 短縮をもたらす機序は、増殖細胞における 3'UTR 短縮機序とは独立したものであることが示唆された。一方、CPEB1 の低発現が 3'UTR 短縮と相関していた。この結果は CPEB1 が APA を誘導するとする過去の報告とは合わない(24)。そもそも肺癌切除検体において、CPEB1 遺伝子の発現量は著しく低下していた。このことから、少なくとも肺癌において、3'UTR 短縮に対して CPEB1 が与えている影響は小さいと思われる。

3'UTR 短縮が遺伝子の発現量に与える影響についてはこれまでさまざまな報告がある。先述の 2 つの理論のうち、前者のように mRNA を合成する段階で切断因子や RNA 結合タンパクによる制御によって 3'UTR の短い mRNA が多く作られているのであれば、miRNA による mRNA の分解促進作用が効かなくなり、mRNA 発現量は増えるはずである。それに対し、後者のように癌において 3'UTR の長い mRNA の分解が促進されているとすると、3'UTR の短い mRNA の割合が相対的に増えてはいるものの、全体の発現

量は減少するはずである(図 23)。

a Differential synthesis



b Differential degradation

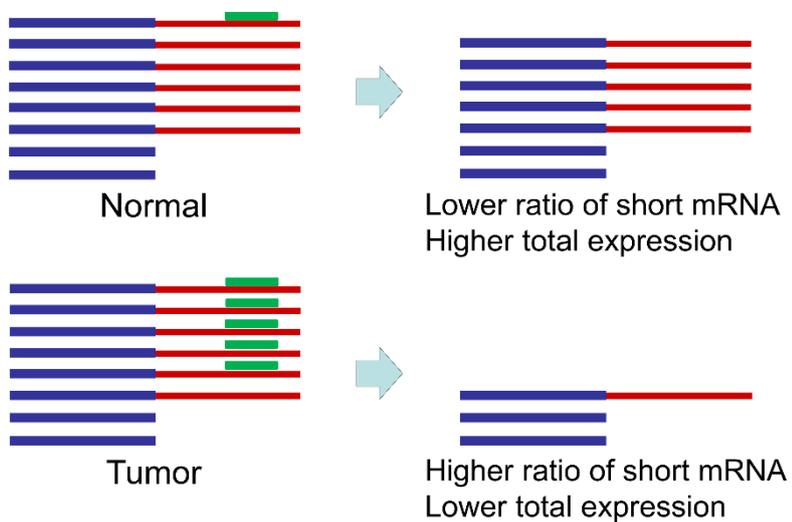


図 23 3'UTR 短縮の機序に関する 2 通りの説明

- (a) 生合成量の違いによる説明。
腫瘍では 3'UTR の短い mRNA が 3'UTR の長い mRNA よりも多く合成される。
全体の発現量は増加する。
- (b) 分解量の違いによる説明。
腫瘍では 3'UTR の長い mRNA がより多く分解される。
全体の発現量は減少する。

これまでの報告のうち、乳癌と肺癌の発現マイクロアレイを解析した検討では mRNA 発現量の増加がみられ(65)、最近の次世代シーケンサーを用いた検討においても、癌において 3'UTR の短縮がみられた遺伝子の大部分で発現量が増えていた(78)。その一方で、発現量に変化を認めなかったとする報告もある(25)。本研究では、3'UTR 短縮指標遺伝子の発現量は、正常肺組織に比べ肺癌において低い傾向があった(図 24)。

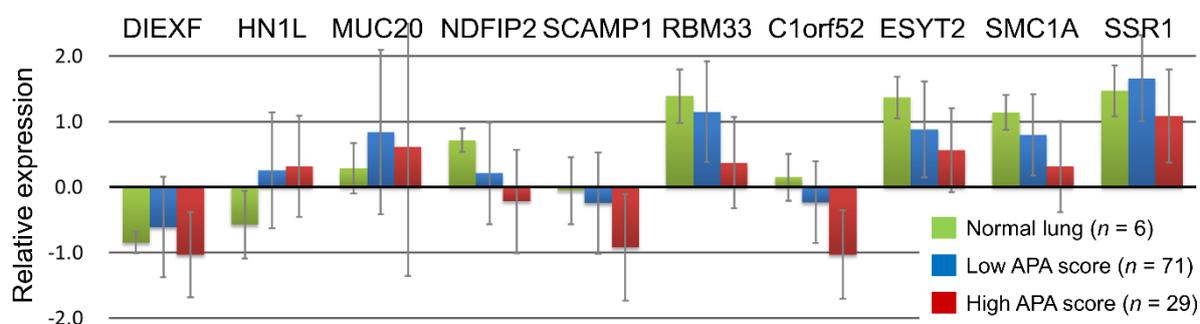


図 24 3'UTR 短縮指標遺伝子の発現量

3'UTR 短縮指標遺伝子の発現量は、正常肺組織（緑）に比べ肺癌において低い傾向があり、特に APA スコア高値群（赤）で低かった。

この結果には 3 通りの可能性が考えられる。まず、先述の后者の理論のとおり癌細胞で高発現となる miRNA によって 3'UTR の長い mRNA が分解され、3'UTR の短い mRNA の割合が増えた可能性がある。指標遺伝子はいずれも長い 3'UTR を有しており、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)によると、よく保存された miRNA 結合部位が多数存在している。次に、癌細

胞で発現量が増加する遺伝子は多数あるが、その結果として指標遺伝子の発現量が相対的に低下したのかもしれない。3'UTR 短縮指標遺伝子はあくまで指標にすぎず、癌遺伝子そのものではないことは留意する必要がある。最後に、3'UTR 短縮によってタンパク産生量が増加した結果、そのネガティブフィードバックによって mRNA 発現量が抑制された可能性も考えられる。

3 PABPN1 遺伝子の役割

肺癌細胞株 H23 において PABPN1 を強制発現させた結果、APA が解除され、3'UTR の長い mRNA の割合が多くなるという結果が得られた。PABPN1 が 3'UTR 短縮を抑制する機能を持つことを癌細胞で示した研究はこれまでになく、非常に興味深い結果と思われる。

3'UTR 短縮の解除がみられた遺伝子の全 mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって調べたところ、PABPN1 強制発現によって全ての遺伝子で発現量が低下していた。そこで、3'UTR 短縮の解除が明らかであり mRNA 発現量も低下していた CCND2 を対象にウエスタンブロットティングによってタンパク産生量の変化を調べたが、これには顕著な差を認めなかった。CCND2 は D-cyclins の 1 つであり G1 期から S 期への移行を制御する。TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) の結果は図 25 の通りであり、CCND2 はよく保

また、PABPN1 強制発現と増殖速度との関係を調べた。PABPN1 導入群の方がやや増殖が遅い傾向があったが、7日間という限られた期間では有意な差を示すに至らなかった。肺癌細胞株 H23 は KRAS 変異を有している。増殖を強力に促進するドライバー変異がある場合には、3'UTR 短縮解除による影響は緩徐で限定的なものとなるのかもしれない。より長期間で観察すれば増殖速度の差を明らかにできる可能性があり、マウスを用いた実験を検討中である。

肺癌切除検体を用いた検討において、PET 検査における腫瘍の SUVmax 値と APA スコアに相関が見られたことは興味深い。SUVmax 値はフルオロデオキシグルコース (FDG) の腫瘍への取り込みを表し、腫瘍細胞の活動性を反映する。3'UTR 短縮と腫瘍細胞の増殖亢進との因果関係を明らかにするには、さらなる介入研究が必要である。

また、本研究では検体の採取時期によってトレーニングセットとテストセットの 2 群に分け、いずれの群でも同様の結果が得られたことから結果の妥当性を確認した。しかし、妥当性の検証は本来異なる施設において異なる集団を対象に行われるべきであり、新たな確認研究が必要である。

4 本研究の臨床的意義

本研究によって、非小細胞肺癌手術症例において mRNA の 3'UTR 短縮と PABPN1 遺伝子の発現低下が予後不良因子であり、腫瘍の悪性度と相関していることが示された。3'UTR 短縮の評価には包括的なアプローチが必要であり、バイオマーカーとして臨床の場に適用するのはコストの面から容易ではなかったが、本研究では肺癌特異的な 3'UTR 短縮の指標遺伝子を同定することで、簡便で効率良く 3'UTR 短縮の程度を評価することが可能であった。腫瘍の 3'UTR 短縮程度をバイオマーカーとして術後再発リスクを予測することにより、術後補助化学療法の対象患者や使用薬剤の最適化を行える可能性がある。また将来 miRNA による肺癌治療が可能になった際、3'UTR の短縮は治療効果予測因子として非常に重要となると思われる。

また、癌細胞において、PABPN1 遺伝子が 3'UTR 短縮を解除し遺伝子発現を抑制する機能を持つことが示された。PABPN1 発現低下に起因する 3'UTR 短縮によって腫瘍の悪性度が増している機序が考えられ、さらなる詳細な機能解析を行うことにより、この経路が新たな治療標的となる可能性がある。

結語

非小細胞肺癌手術症例において、腫瘍における mRNA の 3'UTR 短縮と PABPN1 の発現低下が腫瘍の悪性度と相関していることを明らかにした。また、肺癌細胞株において PABPN1 が 3'UTR 短縮を解除し遺伝子発現を抑制する機能を持つことを示した。PABPN1 発現低下、3'UTR 短縮によって腫瘍の悪性度が増している可能性がある。

謝辞

本研究にあたり、多大なる御高配と御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学医学部附属病院呼吸器外科中島淳教授に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始直接の御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学医学部附属病院検査部高井大哉講師に深く感謝致します。

終わりに、本研究に数々の御助言、御協力を賜りました東京大学医学部附属病院呼吸器内科 305 研究室の諸氏に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.
2. EBM の手法による肺癌診療ガイドライン 2014 年版: 日本肺癌学会; 2014.
3. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretic L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernandez-Cuesta L, Bosco G, Muller C, Dahmen I, Jahchan NS, Park KS, Yang D, Karnezis AN, Vaka D, Torres A, Wang MS, Korbelt JO, Menon R, Chun SM, Kim D, Wilkerson M, Hayes N, Engelmann D, Putzer B, Bos M, Michels S, Vlastic I, Seidel D, Pinther B, Schaub P, Becker C, Altmuller J, Yokota J, Kohno T, Iwakawa R, Tsuta K, Noguchi M, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA, Petersen I, Chen Y, Soltermann A, Tischler V, Choi CM, Kim YH, Massion PP, Zou Y, Jovanovic D, Kontic M, Wright GM, Russell PA, Solomon B, Koch I, Lindner M, Muscarella LA, la Torre A, Field JK, Jakopovic M, Knezevic J, Castanos-Velez E, Roz L, Pastorino U, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Thunnissen E, Kohler J, Schuler M, Botling J, Sandelin M, Sanchez-Cespedes M, Salvesen HB, Achter V, Lang U, Bogus M, Schneider PM, Zander T, Ansen S, Hallek M, Wolf J, Vingron M, Yatabe Y, Travis WD, Nurnberg P, Reinhardt C, Perner S, Heukamp L, Buttner R, Haas SA, Brambilla E, Peifer M, Sage J,

- Thomas RK. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 524;47-53:2015.
4. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511;543-50:2014.
 5. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489;519-25:2012.
 6. Sachs A. The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr Opin Cell Biol* 2;1092-8:1990.
 7. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265;11-23:2001.
 8. D'Ambrogio A, Nagaoka K, Richter JD. Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs. *Nat Rev Cancer* 13;283-90:2013.
 9. Subtelny AO, Eichhorn SW, Chen GR, Sive H, Bartel DP. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* 508;66-71:2014.
 10. Proudfoot NJ. Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev* 25;1770-82:2011.
 11. Mandel CR, Bai Y, Tong L. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* 65;1099-122:2008.

12. Kuhn U, Gundel M, Knoth A, Kerwitz Y, Rudel S, Wahle E. Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem* 284;22803-14:2009.
13. Shepard PJ, Choi EA, Lu J, Flanagan LA, Hertel KJ, Shi Y. Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq. *Rna* 17;761-72:2011.
14. Oszolak F, Kapranov P, Foissac S, Kim SW, Fishilevich E, Monaghan AP, John B, Milos PM. Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* 143;1018-29:2010.
15. Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 33;201-12:2005.
16. Shi Y. Alternative polyadenylation: new insights from global analyses. *RNA* 18;2105-17:2012.
17. Beadoing E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 10;1001-10:2000.
18. Takagaki Y, Manley JL. Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell

- differentiation. *Mol Cell* 2;761-71:1998.
19. Takagaki Y, Seipelt RL, Peterson ML, Manley JL. The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell* 87;941-52:1996.
 20. Yao C, Biesinger J, Wan J, Weng L, Xing Y, Xie X, Shi Y. Transcriptome-wide analyses of CstF64-RNA interactions in global regulation of mRNA alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109;18773-8:2012.
 21. Elkon R, Drost J, van Haaften G, Jenal M, Schrier M, Vrieling JA, Agami R. E2F mediates enhanced alternative polyadenylation in proliferation. *Genome Biol* 13;R59:2012.
 22. Martin G, Gruber AR, Keller W, Zavolan M. Genome-wide analysis of pre-mRNA 3' end processing reveals a decisive role of human cleavage factor I in the regulation of 3' UTR length. *Cell Rep* 1;753-63:2012.
 23. Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, van Haaften G, Kuhn U, Menzies FM, Oude Vrieling JA, Bos AJ, Drost J, Rooijers K, Rubinsztein DC, Agami R. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 149;538-53:2012.
 24. Bava FA, Eliscovich C, Ferreira PG, Minana B, Ben-Dov C, Guigo R, Valcarcel

- J, Mendez R. CPEB1 coordinates alternative 3'-UTR formation with translational regulation. *Nature* 495;121-5:2013.
25. Liaw HH, Lin CC, Juan HF, Huang HC. Differential microRNA regulation correlates with alternative polyadenylation pattern between breast cancer and normal cells. *PLoS One* 8;e56958:2013.
26. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79;351-79:2010.
27. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 320;1643-7:2008.
28. Thomsen S, Azzam G, Kaschula R, Williams LS, Alonso CR. Developmental RNA processing of 3'UTRs in Hox mRNAs as a context-dependent mechanism modulating visibility to microRNAs. *Development* 137;2951-60:2010.
29. Ji Z, Lee JY, Pan Z, Jiang B, Tian B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106;7028-33:2009.
30. Ji Z, Tian B. Reprogramming of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation in generation of pluripotent stem cells from different cell types.

PLoS One 4:e8419:2009.

31. Fu Y, Sun Y, Li Y, Li J, Rao X, Chen C, Xu A. Differential genome-wide profiling of tandem 3' UTRs among human breast cancer and normal cells by high-throughput sequencing. *Genome Res* 21;741-7:2011.
32. Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138;673-84:2009.
33. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136;215-33:2009.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75;843-54:1993.
35. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403;901-6:2000.
36. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294;862-4:2001.
37. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294;858-62:2001.

38. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294;853-8:2001.
39. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34;D140-4:2006.
40. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9;102-14:2008.
41. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455;64-71:2008.
42. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466;835-40:2010.
43. Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen CY, Shyu AB, Yates JR, 3rd, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 35;868-80:2009.
44. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero

- A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435;834-8:2005.
45. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64;3753-6:2004.
46. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120;635-47:2005.
47. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315;1576-9:2007.
48. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65;9628-32:2005.
49. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of

- microRNAs. *Nature* 432;235-40:2004.
50. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303;95-8:2004.
51. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293;834-8:2001.
52. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99;15524-9:2002.
53. Watanabe K, Takai D. Disruption of the expression and function of microRNAs in lung cancer as a result of epigenetic changes. *Frontiers in genetics* 4;275:2013.
54. 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*

130;2580-90:2012.

55. 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* 102;2126-31:2011.
56. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20;2202-7:2006.
57. Melo SA, Moutinho C, Ropero S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R, Fernandez AF, Davalos V, Villanueva A, Montoya G, Yamamoto H, Schwartz S, Jr., Esteller M. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18;303-15:2010.
58. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Bicciato S, Piccolo S. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141;1195-207:2010.
59. Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, Rossi S, Fernandez AF, Carneiro F, Oliveira C, Ferreira B, Liu CG, Villanueva A,

- Capella G, Schwartz S, Jr., Shiekhattar R, Esteller M. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* 41;365-70:2009.
60. Kumar MS, Pester RE, Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J, Kirsch DG, Golub TR, Jacks T. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* 23;2700-4:2009.
61. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 359;2641-50:2008.
62. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96;111-5:2005.
63. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinsky SA, Slack FJ, Weidhaas JB. A SNP in a let-

- 7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 68;8535-40:2008.
64. Persson M, Andren Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106;18740-4:2009.
65. Lembo A, Di Cunto F, Provero P. Shortening of 3'UTRs correlates with poor prognosis in breast and lung cancer. *PLoS One* 7;e31129:2012.
66. Morris AR, Bos A, Diosdado B, Rooijers K, Elkon R, Bolijn AS, Carvalho B, Meijer GA, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res* 18;5256-66:2012.
67. Salisbury J, Hutchison KW, Wigglesworth K, Eppig JJ, Graber JH. Probe-level analysis of expression microarrays characterizes isoform-specific degradation during mouse oocyte maturation. *PLoS One* 4;e7479:2009.
68. Kuner R, Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Bunes A, Xu EC, Schnabel P, Warth A, Poustka A, Sultmann H, Hoffmann H. Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes. *Lung Cancer* 63;32-8:2009.
69. Crouser ED, Julian MW, Crawford M, Shao G, Yu L, Planck SR, Rosenbaum JT,

- Patrick Nana-Sinkam S. Differential expression of microRNA and predicted targets in pulmonary sarcoidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 417;886-91:2012.
70. Jakobsen JN, Sorensen JB. Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 79;1-7:2013.
71. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol* 25;351-70:2010.
72. Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer* 100;1128-34:2009.
73. Oda M, Arakawa Y, Kano H, Kawabata Y, Katsuki T, Shirahata M, Ono M, Yamana N, Hashimoto N, Takahashi JA. Quantitative analysis of topoisomerase IIalpha to rapidly evaluate cell proliferation in brain tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 331;971-6:2005.
74. Elias JM. Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors. *Biotech Histochem* 72;78-85:1997.
75. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR

- amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 25;3957-8:1997.
76. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC) TNM classification of malignant tumours, 7th edition. New York: Wiley-Liss; 2010.
77. Singh P, Alley TL, Wright SM, Kamdar S, Schott W, Wilpan RY, Mills KD, Graber JH. Global changes in processing of mRNA 3' untranslated regions characterize clinically distinct cancer subtypes. *Cancer Res* 69;9422-30:2009.
78. Xia Z, Donehower LA, Cooper TA, Neilson JR, Wheeler DA, Wagner EJ, Li W. Dynamic analyses of alternative polyadenylation from RNA-seq reveal a 3'-UTR landscape across seven tumour types. *Nat Commun* 5;5274:2014.
79. Legendre M, Ritchie W, Lopez F, Gautheret D. Differential repression of alternative transcripts: a screen for miRNA targets. *PLoS Comput Biol* 2;e43:2006.
80. Zhu C, Shao P, Bao M, Li P, Zhou H, Cai H, Cao Q, Tao L, Meng X, Ju X, Qin C, Li J, Yin C. miR-154 inhibits prostate cancer cell proliferation by targeting CCND2. *Urol Oncol* 32;31 e9-16:2014.
81. Zhou J, Tian Y, Li J, Lu B, Sun M, Zou Y, Kong R, Luo Y, Shi Y, Wang K, Ji G. miR-206 is down-regulated in breast cancer and inhibits cell proliferation

- through the up-regulation of cyclinD2. *Biochem Biophys Res Commun* 433;207-12:2013.
82. Zhang L, Liu X, Jin H, Guo X, Xia L, Chen Z, Bai M, Liu J, Shang X, Wu K, Pan Y, Fan D. miR-206 inhibits gastric cancer proliferation in part by repressing cyclinD2. *Cancer Lett* 332;94-101:2013.
83. Yan D, Dong XD, Chen X, Yao S, Wang L, Wang J, Wang C, Hu DN, Qu J, Tu L. Role of microRNA-182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor development through MITF, BCL2 and cyclin D2. *PLoS One* 7;e40967:2012.
84. Li L, Sarver AL, Alamgir S, Subramanian S. Downregulation of microRNAs miR-1, -206 and -29 stabilizes PAX3 and CCND2 expression in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* 92;571-83:2012.
85. Gutierrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, Ferminan E, Martin-Jimenez P, Chillon C, Risueno A, Hernandez JM, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, San Miguel JF. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 24;629-37:2010.
86. Dong Q, Meng P, Wang T, Qin W, Qin W, Wang F, Yuan J, Chen Z, Yang A, Wang H. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells

in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. PLoS One 5;e10147:2010.

87. Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Vicente Duenas C, Krzeminski P, Wiktorska K, Corchete L, Quwaider D, Rojas E, Corral R, Martin AA, Escalante F, Barez A, Garcia JL, Sanchez-Garcia I, Garcia-Sanz R, San-Miguel JF, Gutierrez NC. Post-transcriptional modifications contribute to the upregulation of cyclin D2 in multiple myeloma. Clin Cancer Res:2015.