

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 一瀬 淳二

癌細胞においては、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。miRNA による制御を回避する方法の 1 つが miRNA 生合成経路の抑制である。癌においては、miRNA の欠失や promoter の DNA メチル化、Drosha の発現抑制、Exportin-5 遺伝子の変異、Dicer の発現抑制といった機序が報告されている。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 による遺伝子制御を回避する機序もあり、ポリアデニル (polyA) 付加位置の 5'側への移動 (APA: alternative cleavage and polyadenylation) によって miRNA 結合部位の存在する 3'非翻訳領域 (3'UTR) が短縮する現象はこの代表である。

APA はトランスクリプトーム全体にわたる変化であり、ヒト遺伝子の 70~75%が APA を受けているとされる。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 APA 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。まず、mRNA を切断する因子が多いと代替 polyA シグナルが用いられ APA が生じるという機序が示されている。細胞周期制御に関わる転写因子である E2F が、mRNA 切断に関わる遺伝子の発現を増加させることで APA を促進するという報告もある。また、RNA 結合タンパクである PABPN1 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機序も示されている。さらに CPEB1 も APA をもたらす機能を持つことが新たに報告された。

APA による 3'UTR 短縮は増殖、発生、癌と関連し、miRNA による遺伝子制御を回避する機序として注目を集めているが、癌における 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。APA の評価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用いられているが、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を調べた。

まず、mRNA 3'UTR 短縮を簡便に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 らが報告した rmodel という Bioconductor 用の発現マイクロアレイ解析パッケージを用いた。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。Affymetrix HG-U133_Plus_2 を用いた肺腺癌 40 例、肺扁平上皮癌 18 例と正常肺組織 3 例の発現プロファイルを rmodel で解析し、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。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、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、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。

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。対象症例を肺癌組織 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。再発をエンドポイントとしたときの 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。

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。APA スコア高値群と低値群に分けて肺癌無再発率を 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。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い、APA スコア高値が独立した肺癌再発予測因子であることが示された。

PABPN1 発現低下と APA スコアは相関していた。APA スコアと E2F1 発現量の有意な相関は見出せず、CPEB1 は過去の報告とは逆に APA スコア高値群で発現量が少なかった。PABPN1 の発現量によって中央値で 2 群に分け肺癌無再発率を 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 低発現群が有意に予後不良であった。関連遺伝子の発現量と予後との関係を調べるために Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行ったところ、PABPN1 低発現が独立した肺癌再発予測因子であることが示された。

術前 PET 検査における腫瘍の 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 ; $P < 0.001$)。SUVmax 値はフルオロデオキシグルコース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 短縮と腫瘍細胞の活動性との関連を示す結果として興味深い。

また、PABPN1 遺伝子の発現量が低下している肺癌細胞株 H23 細胞に 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トニングによって、PABPN1 が強制発現されていることを確認した。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。PABPN1 強制発現によって多くの遺伝子で 3'UTR 短縮が解除され、また 12 個全ての遺伝子で mRNA 全発現量が低下していた。このなかで CCND2 についてタンパク産生量をウエスタンブロッティングで調べたが、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。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ところ、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。

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。