

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肺腺癌におけるマイクロ RNA 編集の異常と臨床病理学的検討

氏名 前村啓太

原発性肺癌は世界における癌死の原因の第一位を占めている。原発性肺癌の 85% は非小細胞肺癌に分類され、そのほとんどが腺癌と扁平上皮癌からなる。切除不能・進行非小細胞肺癌に対する薬物治療は近年目覚ましい進歩を遂げている。肺腺癌の中で特定のドライバー遺伝子異常 (*EGFR* 遺伝子変異, *ALK* 融合遺伝子, および *ROS1* 融合遺伝子) を有する症例に対しては分子標的薬が有効であり、従来の殺細胞性抗癌剤と比較して奏効率も高く、長期の無増悪生存期間を達成することが可能となってきた。また非小細胞肺癌に対しては免疫チェックポイント阻害薬が一部の患者に有効であり、奏効率は低いものの年単位の無増悪生存期間を得ることが期待できる。これらの薬剤は ASCO (American Society of Clinical Oncology) のガイドラインや日本肺癌学会による「EBM の手法による肺癌診療ガイドライン 2016 年」にも記載されており、標準治療の一角を担っている。しかしこれらの薬剤は予後の延長を見込むことはできるが根治を見込むことができないものではない。病理学的病期が IA 期の一部および IB 期から IIIA 期までの根治可能な非小細胞肺癌に対しては術後補助化学療法を追加が再発率を低下させ、ひいては予後を延長できることが示されている。しかし IB 期であっても 5 年生存率は 80% 程度に留まっており、病期が進行するごとに生存率は低下する。より個別化された術後補助化学療法を提供するために、術後再発のリスクを予測する新たなバイオマーカーの探索は重要な課題である。

RNA 編集はゲノムから転写された mRNA が塩基の置換や欠失、挿入を受ける現象である。ヒトにおいてはアデノシンからイノシンへの RNA 編集とシチジンからウリジンへの RNA 編集が知られている。前者は ADAR ファミリータンパクに属する ADAR1 および

ADAR2によって触媒されており，RNA編集の異常は非小細胞肺癌や肝細胞癌，慢性骨髄性白血病，膠芽腫といった種々の悪性腫瘍において癌の形質に関与している．一方後者はAPOBEC1に代表されるAPOBECファミリータンパクによって触媒されるが，癌の形質への関与は乏しいとされている．

2004年にマイクロRNAがアデノシンからイノシンへのRNA編集を受けていることが報告された．マイクロRNAは22塩基前後の一本鎖RNAで，標的となる遺伝子群の発現を抑制する機能を有している．マイクロRNA編集によりマイクロRNAの配列が変化することで，マイクロRNAの生合成の効率が変化したり，異なる標的遺伝子を制御したりという現象が生じる．アデノシンからイノシンへのマイクロRNA編集は*in vitro*や*in vivo*の実験で腫瘍の形質に関与していることが知られている．例えば悪性黒色腫の細胞株においては，miR-455-5pのRNA編集を受ける割合が低い状態では腫瘍抑制遺伝子である*CPEB1*の発現が抑制され，遠隔転移をきたしやすいと報告されている．他の例として，神経膠芽腫の細胞株では，RNA編集を受けているmiR-376a-5pの発現が低下し，RNA編集を受けないmiR-376-5pの発現が上昇することで，それぞれ*AMFR*の発現量の上昇と*RAP2A*の発現抑制を引き起こし，どちらも細胞の遊走能および浸潤能を上昇させる働きを持つことが報告されている．しかしながら，ヒトの腫瘍組織部分と正常組織部分のマイクロRNA編集を受ける割合の比較に関しては未知の部分が大きく，本研究では肺腺癌におけるマイクロRNA編集について検討を行った．

本研究ではまず次世代シーケンサーから出力された肺腺癌のsmall RNAのディープシーケンスのデータを*in silico*で解析し，肺腺癌においてマイクロRNA編集が生じている塩基を網羅的に探索した．マイクロRNA編集を*in silico*で解析した既報で用いられていたperlのスク립トはレファレンスのマイクロRNAのデータベースとしてmiRBase (<http://www.mirbase.org/>)のrelease 18(2011年11月公開)を用いていた．本研究においては，最新版のrelease 21(2014年6月公開)をもとに作成したレファレンスのデータ形式に対応させるため，スク립トの一部を修正して用いた．NCBI(National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)内のSRA(sequence read archive) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)からダウンロードした74症例(148サンプル)の肺腺癌の腫瘍組織部分および正常組織部分のデータを解析の対象とした．8つのマイクロRNAにおいて，5症例以上にわたって腫瘍組織部分と正常組織部分の両方からアデノシンからイノシンへのマイクロRNA編集が検出された．miR-379-5p，miR-99a-5p，およびmiR-497-5pにおいては腫瘍組織部分のRNA編集の割合が正常組織部分のRNA編集の割合よりも有意に低い症例が多くを占めていた．miR-200b-3pにおいては腫瘍組織部分のRNA編集の割合が正常組織部分のRNA編集の割合よりも有意に高い症例がおよそ半数を占めていた．これらの4つのマイクロRNAのうち，腫瘍組織部分と正常組織部分のRNA編集を受ける割合の差が

最も大きかったものは miR-99a-5p であった。miR-381-3p, miR-589-3p, miR-411-5p, miR-6503-3p においてはほとんどの症例において腫瘍組織部分と正常組織部分の RNA 編集の割合に有意な差を認めなかった。

次に東京大学医学部附属病院呼吸器外科において肺腺癌と診断されて根治的手術を受けた 50 症例 (腫瘍組織部分 50 サンプルおよび正常組織部分 50 サンプル) について、最終病理診断に必要な部分を確保した上で採取した組織片から RNA を抽出し、miR-99a-5p が RNA 編集を受ける割合を定量した。なお、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」を申請して承認を受け (受付番号: 1069), 全症例に対して研究内容について説明し書面で同意を取得した。この検討においては次世代シーケンサーを用いず、RNA 編集を受けている miR-99a-5p および RNA 編集を受けていない miR-99a-5p を同時に PCR で増幅し、制限酵素で処理した増幅産物をライゲーションしてコンカテマーを作った上でクローニングを行い、100 アンプリコン以上の増幅産物をシーケンスする手法を用いた。50 症例のうち 19 症例 (38%) では腫瘍組織部分の RNA 編集の割合が正常組織部分の RNA 編集の割合よりも有意に低かった。RNA 編集の割合が低下している 19 症例とそれ以外の 31 症例の 2 群を比較したところ、性別や喫煙歴、病理学的病期、EGFR 遺伝子変異といった臨床情報に関しては有意な差は認められなかった。全生存期間に関しては RNA 編集の割合が低下している群においてログランク検定で $P=0.047$ と有意に短く、Cox 比例ハザードモデルでハザード比 3.25, 95%信頼区間 0.95-11.13 であった。無再発生存期間に関しては RNA 編集の割合が低下している群において短い傾向にあったが、統計学的有意差は認めなかった (ログランク検定で $P=0.103$, Cox 比例ハザードモデルでハザード比 1.91, 95%信頼区間 0.87-4.19)。サブグループ解析では病理学的病期 IB 期の群 (23 症例) において、無再発生存期間が RNA 編集の割合が低下している群 (11 症例) において有意に短かった (ログランク検定で $P=0.028$, Cox 比例ハザードモデルでハザード比 5.08, 95%信頼区間 1.01-25.58)。

最後にこの 50 症例 100 サンプルについて RNA 編集およびマイクロ RNA の生合成に関わる遺伝子群 (*ADARI*, *ADAR2*, *DROSHA*, *DICER*) の発現量をリアルタイム PCR で定量した。*GAPDH* を内在コントロールとした各サンプルの各遺伝子の発現量と miR-99a-5p が RNA 編集を受ける割合の相関をスピアマンの順位相関係数を求めて検討したところ、*ADAR2* の相関係数が最も大きい値を示しており、*ADARI* については $r_s=0.258$, *ADAR2* については $r_s=0.424$, *DROSHA* については $r_s=0.225$, *DICER* については $r_s=0.403$ であった。既報ではいくつかの癌の細胞株に *ADARI* もしくは *ADAR2* を強制発現させたところ *ADAR2* の強制発現でのみ miR-99a-5p の受ける RNA 編集の割合が上昇したと報告されており、本研究の結果はこの既報に合致していた。正常組織部分に対する腫瘍組織部分の相対発現量と無再発生存期間の関連について検討したところ、*ADARI* の相対発現量が低い群 ($n=25$) に

において有意に無再発生存期間が短く、*ADAR2* の相対発現量が低い群 ($n=25$) において無再発生存期間が短い傾向にあった。

以上の結果より、腫瘍組織部分において *miR-99a-5p* が RNA 編集を受ける割合が正常組織部分と比較して低下していることは、肺腺癌に対する根治的手術後の予後を予測する新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。本研究の限界および今後の課題として、まずマイクロ RNA 編集の割合を定量する方法が挙げられる。次世代シーケンサーを用いる方法では、22 塩基前後の短いリードをゲノムにマッピングする際に 1 塩基の変異で複数箇所にマッピングすることが避けられないマイクロ RNA が生じてしまうため、ゲノムのどちら由来のリードなのかを厳密に判定できないという限界がある。次世代シーケンサーを用いない方法に関しては、本研究で行った手法では大量のサンプルをシーケンスする必要があるため効率化の余地がある。また、当院のコホートとした肺腺癌の組織検体は 50 症例分と少なく、**training set** と **validation set** の 2 群に分けてバイオマーカーの妥当性を評価することは困難であるため、さらなるデータの集積が必要である。