

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2023
課題番号：19K08605
研究課題名(和文) マイクロRNAを起点とした肺扁平上皮癌に関する分子経路と新規治療法の探索研究

研究課題名(英文) Exploration Study of Molecular Pathways and Novel Therapies in Lung Squamous Cell Carcinoma Initiated by MicroRNAs

研究代表者
内田 章文(Uchida, Akifumi)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教

研究者番号：40707923
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)：最近の我々の研究から、マイクロRNAのパスセンジャー鎖が癌の分子病理に深く関与している事が明らかとなった。肺癌のマイクロRNA発現プロファイルおよびThe Cancer Genome Atlas (TCGA) 解析から、miR-150-3pの発現は、肺扁平上皮癌組織で有意に抑制されている事を確認した。miR-150-3pの機能解析から肺扁平上皮癌における癌抑制型マイクロRNAである事を証明した。更に、miR-150-3pが直性制御する癌促進型遺伝子として、HELLS (helicase, lymphoid specific) を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌に対する化学療法が進歩した現在でも、肺扁平上皮癌進行症例に対する有効な治療法は限られており、生命予後は不良である。その理由として肺扁平上皮癌において治療の標的となる分子が見つからない事が挙げられる。肺扁平上皮癌の治療標的分子の探索は、本疾患に対する新規治療法開発に向けて重要な課題である。本研究の成果として、これまで機能が不明であったパスセンジャー鎖マイクロRNA (miR-150-3p) に着目し、その癌抑制機能と、miR-150-3pが制御する遺伝子を明らかにした。更に、肺扁平上皮癌の治療標的分子の候補として、HELLS (helicase, lymphoid specific) を見出した。

研究成果の概要(英文)：Our recent studies have revealed that passenger strands derived from pre-microRNAs are deeply involved in the molecular pathogenesis of cancer. MicroRNA expression signature of lung cancer and The Cancer Genome Atlas (TCGA) analysis confirmed that expression of miR-150-3p was significantly suppressed in lung squamous cell carcinoma (LUSQ) tissues. Functional analysis revealed that miR-150-3p acted as a tumor-suppressive microRNA in LUSQ. Furthermore, we discovered HELLS (helicase, lymphoid specific) as a cancer-promoting gene directly regulated by miR-150-3p.

研究分野：肺癌

キーワード：肺扁平上皮癌 マイクロRNA パssenジャー鎖 治療標的分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年の新規肺癌治療薬(分子標的薬など)の開発の恩恵を受けて、肺腺癌患者の治療成績は著しく向上している。しかしながら、肺扁平上皮癌、特に進行症例に対する有効な治療法は限られている。肺扁平上皮癌では、肺腺癌の様に、治療標的となるドライバー遺伝子が発見されていないため、分子標的治療薬の恩恵も乏しい。進行肺扁平上皮癌患者の1次治療にはプラチナ製剤を中心とした化学療法が施されるが、多くの症例で、癌細胞は治療抵抗性を獲得し、一次治療に抵抗性になった患者の予後は極めて不良である。最近では、免疫チェックポイント阻害剤の使用も承認されているが、有効性を示す症例は、2割程度にとどまり、多くの患者においてその効果は満足できるものではない。
- (2) ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒト細胞中には極めて多くの、蛋白に翻訳されないRNA分子が転写されていることが明らかとなった。最近の研究から、これらのRNA分子は、RNA分子のまま、生体内で様々な機能を有していることが明らかになりつつあり、機能性RNAと呼ばれている。機能性RNAの1種である、マイクロRNAは、僅か19~22塩基の低分子RNAである。このRNA分子は、最終的に1本鎖のRNA分子として機能し、蛋白コード遺伝子の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御をしている。マイクロRNAの生物学的な特徴として、1種類のマイクロRNAは、数十~数百種類の蛋白コード遺伝子の発現を制御している。そのため、マイクロRNAの発現異常は、細胞内のRNA分子ネットワークの破綻を引き起こし、ヒト癌を含む様々な疾患に関与していることが報告されている。一般的に、マイクロRNA前駆体から派生する2本の1本鎖RNAの中で、機能するマイクロRNAをガイド鎖、機能せず分解されるマイクロRNAをパッセンジャー鎖と呼ぶ。しかしながら、最近の研究から、一部のパッセンジャー鎖は、ガイド鎖と同様に、細胞内で遺伝子の発現をコントロールしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

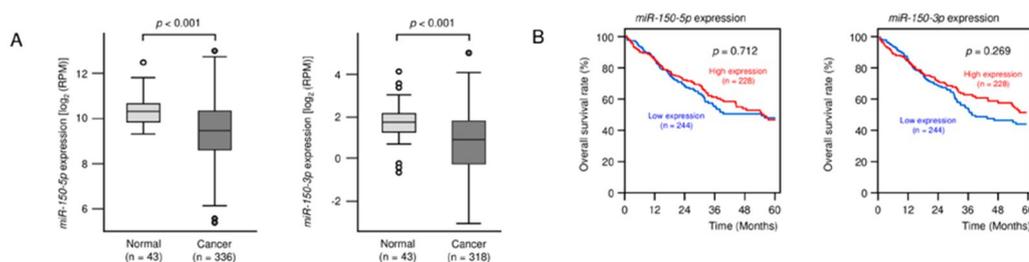
- (1) 肺扁平上皮癌・マイクロRNA発現解析プロファイルから、機能が明らかとなっていないパッセンジャー鎖マイクロRNAを探索し、その機能を明らかにする。
- (2) パッセンジャー鎖マイクロRNAが制御する肺扁平上皮癌の機能性RNAネットワークを探索し、肺扁平上皮癌の治療標的分子の候補を選択する。

3. 研究の方法

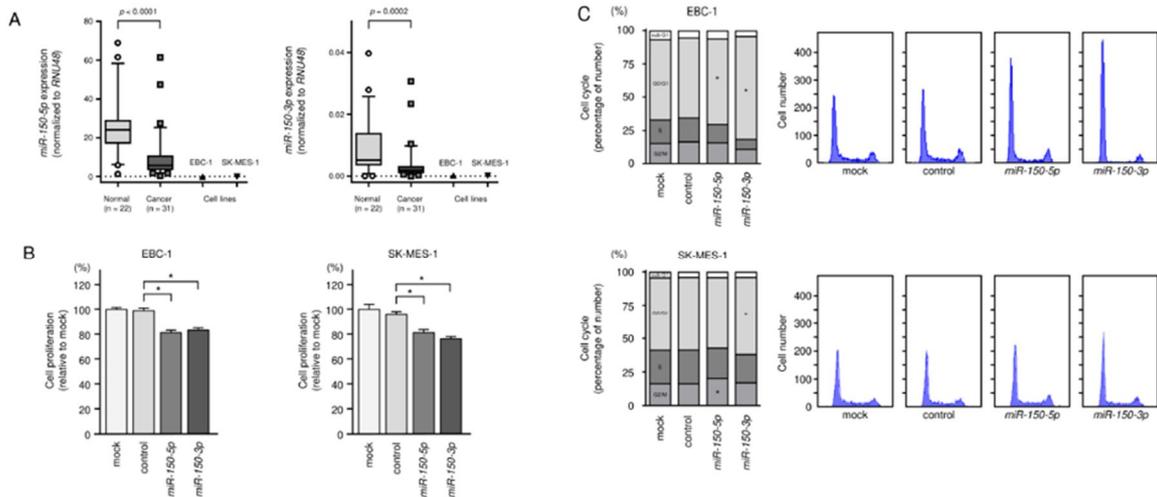
- (1) 肺扁平上皮癌・癌抑制型マイクロRNAの探索
 - (1-1) 肺癌・マイクロRNA発現プロファイルおよびTCGAデータ解析から、癌組織で発現が抑制されているマイクロRNA(パッセンジャー鎖マイクロRNA)を選択する。
 - (1-2) 候補となったマイクロRNAを肺扁平上皮癌細胞株(EBC-1、SK-MES-1)に核酸導入し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について評価する。
- (2) 癌抑制型マイクロRNAが制御する肺扁平上皮癌・機能性RNAネットワークの探索
 - (2-1) 癌抑制型マイクロRNAによって発現制御を受ける遺伝子について、TargetScan database、マイクロRNAを核酸導入した細胞を用いた癌細胞株の発現解析、肺癌臨床検体の発現データの3種類を組み合わせ探索する。
 - (2-2) 候補となった遺伝子について、GeneCodis解析から、その機能を予測しパスウェイ解析を行う。また、候補遺伝子については、TCGAデータを用いて臨床病理学的解析を行う。
 - (2-3) 候補遺伝子について、siRNAを用いたノックダウン実験から、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について評価する。

4. 研究成果

- (1) 肺扁平上皮癌・癌抑制型マイクロRNAの同定
肺癌・マイクロRNA発現プロファイルから、*miR-150-5p*(ガイド鎖)および*miR-150-3p*(パッセンジャー鎖)に着目した。TCGA解析から、両マイクロRNAの発現は、肺扁平上皮癌組織で有意に抑制されていた。

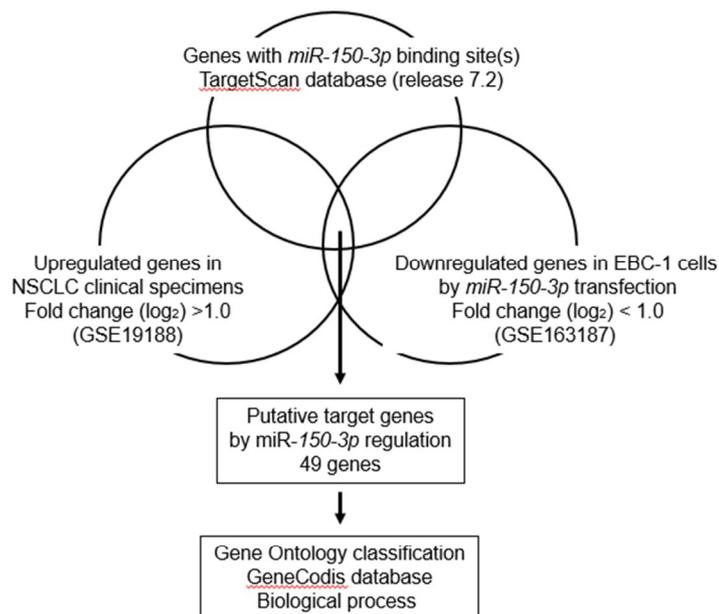


miR-150-5p および *miR-150-3p* を肺扁平上皮癌細胞株 (EBC-1、SK-MES-1) に核酸導入し、これらマイクロ RNA の癌抑制機能を評価した。それぞれのマイクロ RNA を導入した細胞では、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を有意に抑制した。*miR-150-3p* を導入した細胞では、顕著な G1 アレストが誘導された。これらの結果から、*miR-150-3p* (パッセンジャー鎖) は、*miR-150-5p* (ガイド鎖) 同様に、癌抑制型マイクロ RNA であることを証明した。*miR-150-5p* (ガイド鎖) については、これまでに複数の癌種で癌抑制型マイクロ RNA であることが報告されている。今回の解析により、*miR-150-3p* (パッセンジャー鎖) についても、肺扁平上皮癌における癌抑制型マイクロ RNA であることを初めて明らかにした。



(2) 癌抑制型マイクロ RNA (*miR-150-3p*) が制御する肺扁平上皮癌・機能性 RNA ネットワークの探索

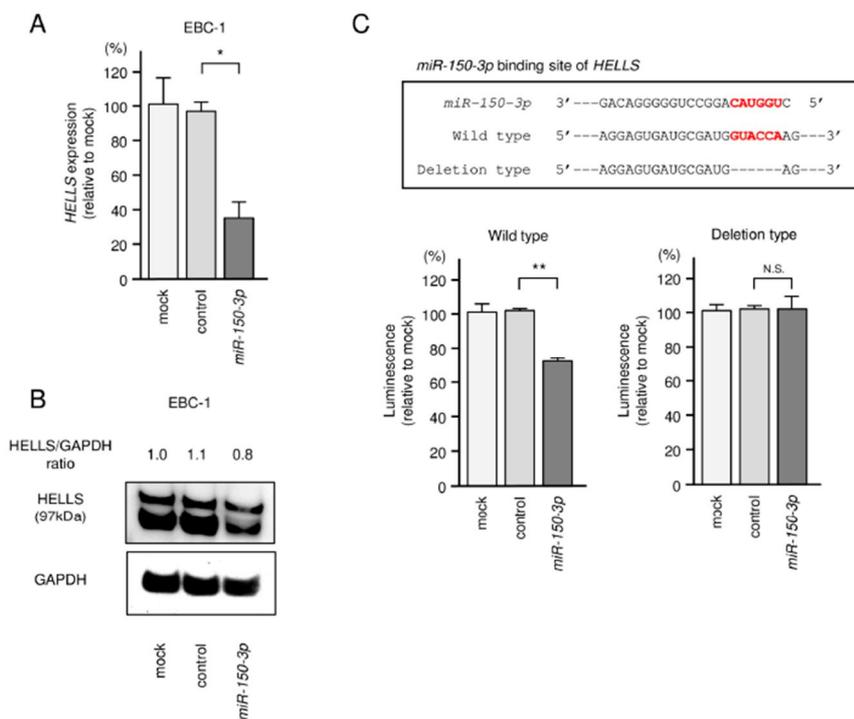
これまでに肺扁平上皮癌で報告の無い、*miR-150-3p* (パッセンジャー鎖) に着目した。肺扁平上皮癌細胞内で、*miR-150-3p* が制御する遺伝子の探索を行った。解析の結果、49 種の遺伝子が *miR-150-3p* の制御を受ける遺伝子として選択された。GeneCodis を用いて、これら遺伝子の機能を調べた結果、細胞周期に関与する遺伝子が 17 種類、細胞分裂に関与する遺伝子が 12 種類含まれていた。これらの結果から、*miR-150-3p* (パッセンジャー鎖) は、肺扁平上皮癌細胞内で、細胞周期関連遺伝子をコントロールする癌抑制型マイクロ RNA であ



cell cycle	GO:0007049	17	CENPA,CIT,CCNE1,CCNE2,TIMELESS,BUB1,MCM4,HELLS, SKA3, CDCA2,FANCD2,NUF2,E2F2,SUV39H2,CASC5,ZWILCH,CKAP2
cell division	GO:0051301	12	CENPA,CIT,CCNE1,CCNE2,TIMELESS,BUB1,HELLS,SKA3,CDCA2, NUF2,CASC5,ZWILCH

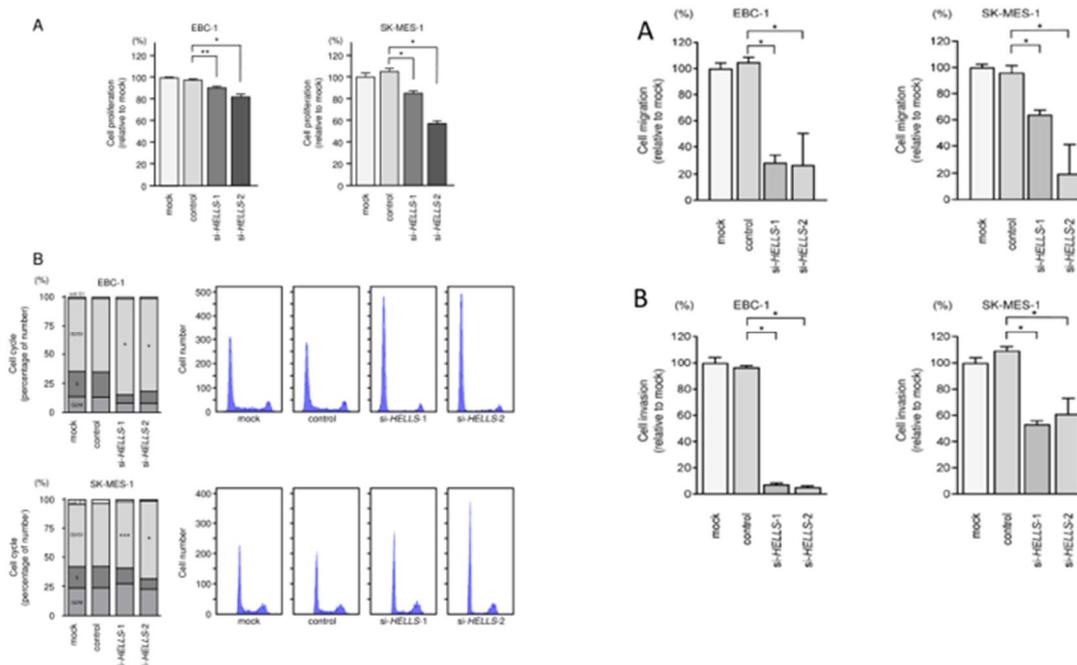
ることが明らかになった。

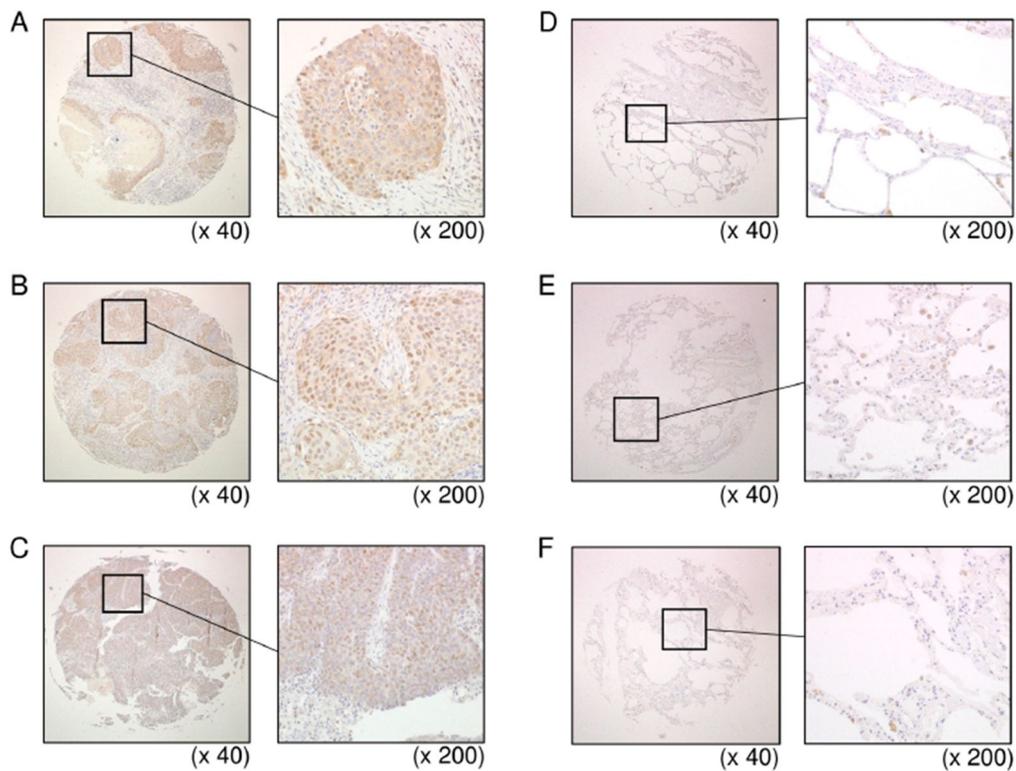
- (3) *miR-150-3p* が制御する HELLS (helicase, lymphoid specific) の機能解析
 49 種の候補遺伝子から細胞周期、細胞分裂に関する遺伝子である HELLS (helicase, lymphoid specific) に着目した。ルシフェラーゼ・レポータ解析から、*miR-150-3p* は、HELLS 遺伝子の 3' UTR に直接結合し、その発現を負に制御している事を明らかにした。



肺扁平上皮癌における HELLS の機能を調べるため、siRNA を用いたノックダウン解析を施行した。siRNA 導入した肺扁平上皮癌細胞では、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。また、HELLS 抗体を用いた免疫組織染色では、扁平上皮癌細胞の強染色を確認した。これらの結果から、HELLS は、肺扁平上皮癌細胞において、癌促進型遺伝子であることが明らかとなった。

これまで解析が殆ど行われていなかった *miR-150-3p* (パッセンジャー鎖) が、肺扁平上皮の分子病理に深く関与していることを明らかにした。更に、*miR-150-3p* を起点として、肺扁平上皮癌の治療標的分子を見出すことが可能であった。





文献

Involvement of Dual Strands of miR-143 (miR-143-5p and miR-143-3p) and Their Target Oncogenes in the Molecular Pathogenesis of Lung Adenocarcinoma.

Sanada H, Seki N, Mizuno K, Misono S, Uchida A, Yamada Y, Moriya S, Kikkawa N, Machida K, Kumamoto T, Suetsugu T, Inoue H.

Int J Mol Sci. 2019 Sep 11;20(18):4482. doi: 10.3390/ijms20184482.

PMID: 31514295

Regulation of Oncogenic Targets by Tumor-Suppressive miR-150-3p in Lung Squamous Cell Carcinoma.

Mizuno K, Tanigawa K, Misono S, Suetsugu T, Sanada H, Uchida A, Kawano M, Machida K, Asai S, Moriya S, Inoue H, Seki N.

Biomedicines. 2021 Dec 11;9(12):1883. doi: 10.3390/biomedicines9121883.

PMID: 34944699

MicroRNA signature of small-cell lung cancer after treatment failure: impact on oncogenic targets by miR-30a-3p control.

Tanigawa K, Misono S, Mizuno K, Asai S, Suetsugu T, Uchida A, Kawano M, Inoue H, Seki N.

Mol Oncol. 2023 Feb;17(2):328-343. doi: 10.1002/1878-0261.13339. Epub 2022 Nov 23.

PMID: 36345848

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuno Keiko, Tanigawa Kengo, Misono Shunsuke, Suetsugu Takayuki, Sanada Hiroki, Uchida Akifumi, Kawano Minami, Machida Kentaro, Asai Shunichi, Moriya Shogo, Inoue Hiromasa, Seki Naohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of Oncogenic Targets by Tumor-Suppressive miR-150-3p in Lung Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1883 ~ 1883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9121883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関 直彦 (Seki Naohiko) (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	水野 圭子 (Mizuno Keiko) (50531414)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------