

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08627

研究課題名(和文)小細胞肺癌の機能性RNA統合解析に基づくドラッグ・リポジショニングの考案

研究課題名(英文) Devising drug repositioning based on functional RNA integration analysis of small cell lung cancer.

研究代表者

水野 圭子 (Mizuno, Keiko)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：50531414

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)：小細胞肺癌(SCLC)は高悪性度かつ難治性癌であり、その予後は極めて不良である。治療抵抗性に至った小細胞肺癌患者の剖検検体から、マイクロアレイを使用してmRNA発現シグネチャーを同定した。癌と正常肺組織間での比較を行い、癌組織でアップレギュレートされた遺伝子を抽出し、その中から細胞周期経路に關与するMCMファミリー遺伝子に焦点を当て研究を進め、治療抵抗性SCLCの治療標的になる可能性があることを確認した。またRNA配列解析によりmicroRNA発現シグネチャーも作成した。今回、治療耐性を来したSCLC検体を元に導き出した結果は、治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌の分子病因の解明の一助になると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は高悪性度かつ難治性癌であり、一次治療に抵抗性になった患者では再発、遠隔転移を来し、その予後は極めて不良である。明確な標的分子も同定されていないため分子標的薬の適応もない。最近注目されている免疫チェックポイント阻害剤についてもその有効性はいまだ限定的であると言える。今回の研究では、通常は採取が困難である治療耐性をきたした小細胞肺癌検体を元にメッセンジャーRNAならびにマイクロRNAのプロファイルを明らかにした。さらに治療抵抗性小細胞肺癌の治療標的となる可能性がある分子の一つも解明した。これらの研究は、治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌の病因解明の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung cancer (SCLC) is a high-grade and refractory cancer with a very poor prognosis.

We used microarrays to identify mRNA expression signatures from autopsy specimens of patients with small cell lung cancer that had become refractory to therapy. Comparisons were made between cancer and normal lung tissue, and genes upregulated in cancer tissue were extracted. The microRNA expression signatures were also generated by RNA sequencing. The results of this study, based on treatment-resistant SCLC specimens, will help to elucidate the molecular etiology of small cell lung cancer that has developed resistance to therapy.

研究分野：小細胞肺癌

キーワード：小細胞肺癌 治療抵抗性 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(小細胞肺癌の臨床的背景) 肺癌全体の 10-15%を占める癌であるが、その生物学的な悪性度は極めて高く、初診時に外科的な治療を行える症例は稀である。切除不能症例については、化学療法・化学放射線療法を選択する。初回の治療反応性は良いが、治療経過中に、多くの症例で再発や遠隔転移を認める。治療抵抗性を獲得した患者の予後は極めて不良である。現在、小細胞肺癌の明確な治療標的も明らかになっていないため、肺腺癌でその有効性が示された分子標的治療薬の適応も無い。そのため、再発を来した患者の生命予後は極めて不良である。本疾患の治療法を考案するためには、治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌細胞に特徴的な分子経路を、最新のゲノム科学的手法で解析する必要がある。しかしながら、小細胞肺癌の再発組織や遠隔転移組織を得る事は臨床で極めて困難であり、本疾患のゲノム解析は十分に行われていない現状がある。

(小細胞肺癌における機能性 RNA 研究の学術的背景) 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事が明らかとなった。最近の研究から、これらの RNA 分子は、生体内で様々な機能を有している(機能性 RNA)事が明らかになりつつある。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、機能性 RNA (蛋白コード・非蛋白コード遺伝子)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 の特徴として、1 種類のマイクロ RNA は、数十~数百種類の機能性 RNA 分子の発現を制御していることから、マイクロ RNA の発現異常は、細胞内の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事が報告されている。

最近の機能性 RNA 研究から、ヒト血液や体液中には、エクソソームと呼ばれる、直径 50nm~150nm ほどの細胞外小胞が存在しており、エクソソーム内には、マイクロ RNA を含む核酸物質が内包されている事が明らかとなった。癌細胞が放出エクソソームは(エクソソーム中の核酸は) 周辺環境に影響を与え、癌細胞の転移や治療抵抗性に重要な役割を担っている事が明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌臨床検体の RNA (mRNA ならびにマイクロ RNA) 発現プロファイルに基づく統合理解から、小細胞肺癌細胞において活性化している分子経路を探索・検証することである。さらに治療抵抗性に関わる分子経路を、低分子化合物および既存の治療薬で遮断する(ドラッグ・リポジション)戦略を考案し、その有効性を実証する。

3. 研究の方法

- (1) 治療抵抗性に至った小細胞肺癌の剖検検体から作成した mRNA 発現プロファイルにおいて、発現異常を認める遺伝子を選別する。
- (2) 選別した遺伝子がコードする分子について、小細胞肺癌の臨床検体における蛋白発現を確認する。
- (3) 小細胞肺癌の細胞株を用いて、選別した遺伝子の siRNA を用いて Loss-of-function assay を行う。
- (4) 選別した mRNA の siRNA を用いて、抗がん剤(シスプラチン)に対する感受性への影響について解析する。
- (5) 治療抵抗性に至った小細胞肺癌の剖検検体からマイクロ RNA 発現プロファイルにおいて、発現が低下するマイクロ RNA から、癌抑制性マイクロ RNA を検出する。

4. 研究成果

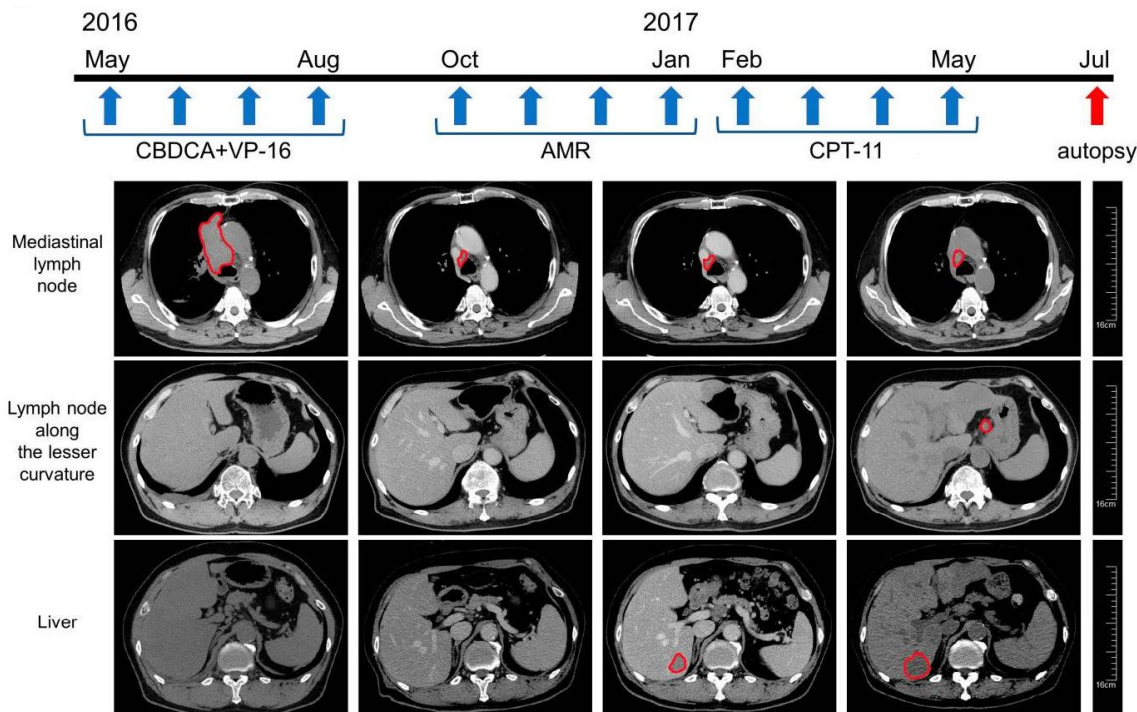
(1) 治療抵抗性小細胞肺癌における RNA 発現プロファイル作成

治療耐性に至った小細胞肺癌の剖検検体(3 症例)から作成した RNA 発現プロファイルから発現異常を認めた mRNA の選別を行った。下記の Table 1 に示す 3 症例より組織検体を採取した。Figure 1 に症例 1 の臨床経過を示す。

Table 1: Clinical features of the SCLC patients.

No.	Sex	Age	BI	T	N	M	Stage	Therapy	Remarks
1	M	67	1440	4	2	1b	IV	Platinum based chemotherapy	Microarray expression analysis IHC staining
2	M	78	1180	2b	2	1b	IV	Platinum based chemotherapy	Microarray expression analysis IHC staining
3	M	65	990	2a	3	1a	IV	Platinum based chemotherapy	Microarray expression analysis IHC staining

IHC: Immunohistochemistry, BI: Brinkman index.



採取した検体より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を用いて mRNA 発現プロファイルを作成した。正常組織と比較して、癌組織で発現が亢進していた遺伝子を 1136 個抽出した。それらの遺伝子について、KEGG を用いて pathway 解析を行い、Cell cycle pathway に関連していた MCM family (MCM2、MCM4、MCM6、MCM7) に注目した。

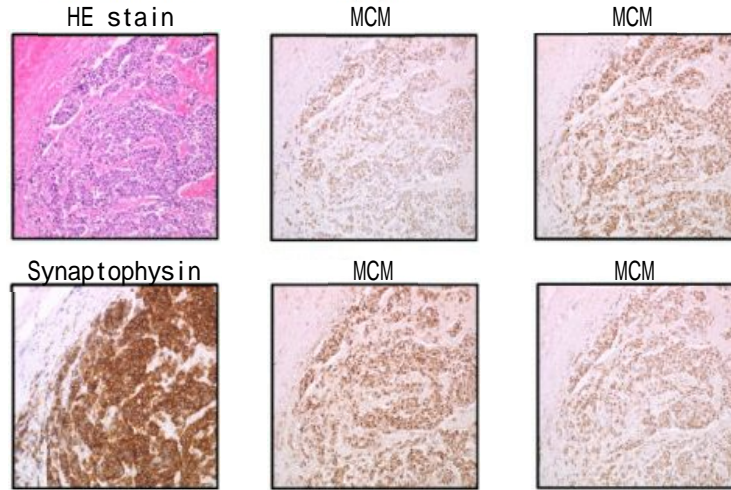
Table 2: Upregulated genes associated with the cell cycle pathway.

Entrez GeneID	Gene Symbol	Gene Name	Location	Normalized Read Count (Log2)			
				Log2 Fold Change	Normal Lung Tissues	SCLC Tissues	p-Value
7272	TTK	TTK protein kinase	6q14.1	3.67	-0.37	3.3	0.0034
9134	CCNE2	cyclin E2	8q22.1	3.57	0.05	3.62	0.0002
4173	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	8q11.21	3.33	0.2	3.54	0.0004
699	BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	2q13	3.18	-0.25	2.92	0.004
701	BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	15q15.1	3.08	-0.03	3.05	0.0018
9133	CCNB2	cyclin B2	15q22.2	3.05	0.05	3.1	0.0055
1029	GDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	9p21.3	3.01	0.24	3.25	0.0047
4171	MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	3q21.3	2.96	0.01	2.97	0.0008
995	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C	5q31.2	2.87	-0.01	2.87	0.0045
891	CCNB1	cyclin B1	5q13.2	2.82	-0.06	2.76	0.0008
1869	E2F1	E2F transcription factor 1	20q11.22	2.82	-0.3	2.52	0.01
9700	ESPL1	extra spindle pole bodies homolog 1	12q13.13	2.7	0.1	2.8	0.0007
8318	CDC45	cell division cycle 45 homolog	22q11.21	2.64	-0.29	2.34	0.0027
8317	CDC7	cell division cycle 7 homolog	1p22.2	2.62	0.01	2.63	0.0006
4085	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	4q27	2.61	-0.19	2.42	0.0013
898	CCNE1	cyclin E1	19q12	2.61	0.06	2.67	0.0041
1111	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog	11q24.2	2.57	0	2.57	0.0088
993	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A	3p21.31	2.5	-0.15	2.34	0.0044
9232	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1	5q33.3	2.4	0.07	2.47	0.003
983	CDK1	cyclin-dependent kinase 1	10q21.2	2.4	0.05	2.45	0.0058
10926	DBF4	DBF4 homolog	7q21.12	2.22	0.06	2.28	0.0002
4176	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	7q22.1	2.2	0.13	2.33	0.0002
890	CCNA2	cyclin A2	4q27	2.17	0.03	2.2	0.0141
4175	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	2q21.3	2.05	-0.11	1.94	0.0002
6502	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	5p13.2	2.04	0.23	2.27	0.0117
5111	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	20p13	2.04	0.01	2.05	0.0017
5591	PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	8q11.21	2.01	-0.03	1.98	0.0071
10744	PTTG2	pituitary tumor-transforming 2	4p14	2	-0.01	1.99	0.0084

(2) 臨床検体における MCM family の発現

小細胞肺癌の臨床検体において、MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 の発現を免疫染色にて検討した。いずれの蛋白も肺癌細胞で高発現していた。

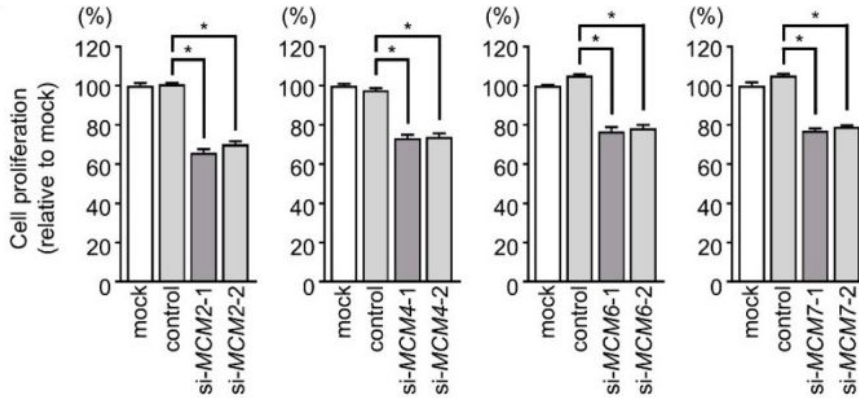
Figure 2: Histopathological findings and immunohistochemical analyses of MCM2, MCM4, MCM6, and MCM7 (Metastasis of hilar lymph node).



(3) siRNA を用いた機能欠失解析 (Loss-of-function assay)

MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 の siRNA を小細胞肺癌細胞株 (SBC-3、H82) に核酸導入して機能解析 (XTT assay, cell cycle assay, apoptosis assay)を行った。MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 を knockdown することで細胞増殖は抑制された。

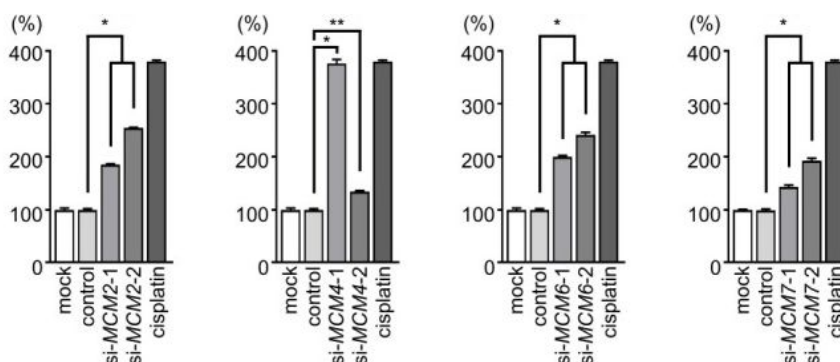
Figure 3: Effect of siRNA-mediated knockdown of MCM family members on the proliferation of SCLC cells.



また、MCM2、MCM4 を knockdown することで G0/G1 期で細胞周期を止め、MCM6、MCM7 を knockdown することで G2/M 期で細胞周期を止めることを確認した。

apoptosis assay においては、MCM4、MCM6、MCM7 を knockdown することで、apoptosis が誘導されることを確認した。

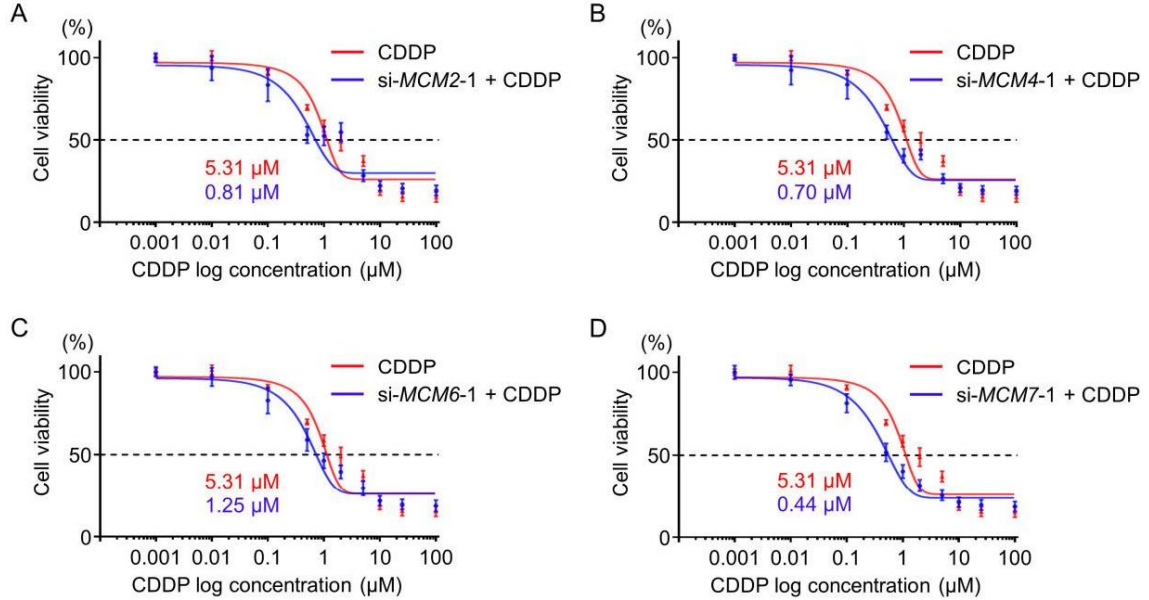
Figure 4: Effect of siRNA-mediated knockdown of MCM family members on apoptosis in SCLC cells.



(4) MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 の抗がん剤 (シスプラチン) に対する影響

MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 の siRNA を小細胞肺癌細胞株 (SBC-3、H82) に核酸導入した際のシスプラチンへの感受性の変化を検討した。シスプラチンの添加のみの細胞株の増殖能とシスプラチンの添加と各 siRNA の核酸導入を同時に行った細胞株の増殖能について、XTT assay を用いてシスプラチンの IC50 の変化を評価した。シスプラチンに各 siRNA を加えることで、シスプラチンの IC50 は低下することを確認した。

Figure 5: Effect of siRNA-mediated knockdown of MCM family members on cisplatin sensitivity.



(5) 治療抵抗性小細胞肺癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイル作成

治療抵抗性の SCLC 患者の剖検検体からマイクロ RNA 発現シグネチャーを作成した。RNA-sequencing では、441,473,462 から 615,202,138 個のリードを得た。このリードをファイリングし、トリミングした結果、19塩基以上の9,428,865から20,351,100のマイクロ RNA リードがヒトゲノムにマップされた。さらに SCLC 組織において、有意にダウンレギュレートされたマイクロ RNA を同定した。同定した合計 49 のダウンレギュレーションマイクロ RNA を Table 3 に示す。興味深いことに、これらの調節不全の miRNA のうち、18個は miRBase データベース (Release 22, <http://www.mirbase.org/>) で miRNA の passenger strands としてアノテーションされていた。

Table 3: Downregulated miRNAs identified by RNA sequencing of SCLC clinical specimens.

MicroRNA	miRBase accession No	side or passenger str	Log ₂ fold change	Normalized read count (CPM)			p-value	FDR
				Normal lung tissues	SCLC tissues	SCLC tissues		
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	guide strand	-4.61	155.35	4.47	6.00E-05	0.02	
hsa-miR-4655-3p	MIMAT0003273	guide strand	-4.18	5.94	0.16	4.89E-05	0.02	
hsa-miR-4293-5p	MIMAT0018226	passenger strand	-3.86	6.47	0.31	1.76E-05	0.011	
hsa-miR-4722-3p	MIMAT0019827	guide strand	-3.86	2.92	0.05	5.15E-04	0.088	
hsa-miR-504-5p	MIMAT0002675	guide strand	-3.83	38.4	2.26	8.61E-05	0.022	
hsa-miR-515a-3p	MIMAT0004770	guide strand	-3.71	4.33	0.42	6.52E-04	0.088	
hsa-miR-515a-3p	MIMAT0002689	guide strand	-3.61	2.75	0.25	1.34E-03	0.125	
hsa-miR-3p	MIMAT0004584	passenger strand	-3.27	382.91	31.19	1.68E-05	0.011	
hsa-miR-21b-1-3p	MIMAT0004655	passenger strand	-3.27	35.99	3.38	1.58E-05	0.011	
hsa-miR-1283	MIMAT0003978	guide strand	-3.12	0.91	0.04	1.14E-02	0.268	
hsa-miR-223-3p	MIMAT0004670	passenger strand	-3.1	13.33	1.98	5.98E-05	0.02	
hsa-miR-4658	MIMAT0018653	guide strand	-3.05	5.68	0.55	6.36E-04	0.088	
hsa-miR-23a-3p	MIMAT0004673	passenger strand	-2.85	313.35	38.53	1.52E-04	0.022	
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	guide strand	-2.9	38.23	4.3	8.01E-05	0.022	
hsa-miR-459-3p	MIMAT0018068	guide strand	-2.89	2.36	0.23	4.83E-03	0.18	
hsa-miR-1819-3p	MIMAT0003270	passenger strand	-2.8	381.13	60.44	2.21E-06	0.006	
hsa-miR-188	MIMAT0003454	guide strand	-2.75	10.51	1.54	1.76E-03	0.13	
hsa-miR-52a-3p	MIMAT0003080	passenger strand	-2.7	6203.3	853.06	1.24E-03	0.125	
hsa-miR-443-3p	MIMAT0019232	passenger strand	-2.67	1.43	0.19	1.97E-02	0.20	
hsa-miR-1247-3p	MIMAT0022721	passenger strand	-2.62	12.81	2.76	1.69E-03	0.13	
hsa-miR-3677-5p	MIMAT0017957	guide strand	-2.61	5.23	0.76	2.89E-03	0.138	
hsa-miR-4234-5p	MIMAT0019811	passenger strand	-2.59	1.78	0.19	1.62E-02	0.309	
hsa-miR-4733-3p	MIMAT0019832	guide strand	-2.59	1.34	0.17	1.89E-02	0.336	
hsa-miR-100-3p	MIMAT0004512	passenger strand	-2.59	22.7	4.42	4.40E-04	0.087	
hsa-miR-3759	MIMAT0019384	guide strand	-2.57	5.16	0.78	2.42E-03	0.138	
hsa-miR-4538-5p	MIMAT0019078	guide strand	-2.53	1.16	0.15	2.62E-02	0.368	
hsa-miR-944	MIMAT0006957	guide strand	-2.38	13.17	2.09	5.17E-03	0.183	
hsa-miR-345-5p	MIMAT0006955	passenger strand	-2.36	119.81	24.48	3.18E-02	0.428	
hsa-miR-302a-5p	MIMAT0000297	guide strand	-2.26	77110.51	18284.68	8.85E-03	0.245	
hsa-miR-3607-3p	MIMAT0019330	passenger strand	-2.25	0.97	0.07	6.69E-02	0.624	
hsa-miR-521	MIMAT0023854	guide strand	-2.24	0.36	0.01	7.79E-02	0.684	
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	guide strand	-2.22	367.12	78.55	1.12E-02	0.288	
hsa-miR-6528-3p	MIMAT0025480	guide strand	-2.18	1.66	0.34	3.28E-02	0.424	
hsa-miR-4727-5p	MIMAT0019847	passenger strand	-2.17	0.51	0.02	8.95E-02	0.642	
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	guide strand	-2.15	5480.55	1462.45	2.06E-03	0.135	
hsa-miR-223-3p	MIMAT0003280	guide strand	-2.13	333.22	99.74	3.44E-03	0.153	
hsa-miR-4604-3p	MIMAT0019885	passenger strand	-2.12	0.64	0.05	7.89E-02	0.688	
hsa-miR-226-2-3p	MIMAT0005015	passenger strand	-2.11	13.31	2.45	2.92E-03	0.138	
hsa-miR-549-5p	MIMAT0019320	guide strand	-2.08	0.38	0.01	8.79E-02	0.727	
hsa-miR-1208	MIMAT0005009	guide strand	-2.08	0.88	0.15	7.92E-02	0.692	
hsa-miR-203b-3p	MIMAT000284	guide strand	-2.05	268.47	83.1	2.96E-03	0.138	
hsa-miR-5125-5p	MIMAT0002659	guide strand	-2.05	0.34	0	8.84E-02	0.727	
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003229	guide strand	-2.05	2537.12	695	9.77E-03	0.252	
hsa-miR-34c-3p	MIMAT0004677	passenger strand	-2.04	13.64	2.81	5.34E-02	0.548	
hsa-miR-6507-5p	MIMAT0025470	guide strand	-2.03	0.64	0.09	9.81E-02	0.764	
hsa-miR-145-3p	MIMAT0006011	passenger strand	-2.01	183.32	50.6	5.19E-03	0.183	
hsa-miR-4603-3p	MIMAT0019979	guide strand	-2.01	0.42	0.03	1.16E-01	0.864	
hsa-miR-5499-5p	MIMAT0025528	guide strand	-2.01	0.47	0.08	1.24E-01	0.856	
hsa-miR-34e-5p	MIMAT0000986	guide strand	-2	394.48	100	6.51E-02	0.616	

今回の研究は、治療抵抗性となった小細胞肺癌の病態解明および新規治療標的の発見に結びつくものとする。今後も研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Misono Shunsuke, Mizuno Keiko, Suetsugu Takayuki, Tanigawa Kengo, Nohata Nijiro, Uchida Akifumi, Sanada Hiroki, Okada Reona, Moriya Shogo, Inoue Hiromasa, Seki Naohiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular Signature of Small Cell Lung Cancer after Treatment Failure: The MCM Complex as Therapeutic Target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1187 ~ 1187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13061187	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 -

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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kengo Tanigawa, Keiko Mizuno, Shunsuke Misono, Minami Kawano, Takayuki Suetsugu, Hiromasa Inoue
2. 発表標題 Minichromosome maintenance complex component (MCM) genes in lung adenocarcinoma: MCM-family acts as a potential therapeutic target
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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)	

	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
研究協力者	谷川 健悟 (Tanigawa Keingo)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生 (17701)	
研究協力者	美園 俊祐 (Misono Shunsuke)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	
研究協力者	末次 隆行 (Suetsugu Takayuki)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・助教 (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