

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17640

研究課題名（和文）機能性RNA統合理解に基づく治療抵抗性小細胞肺癌に関わる分子経路の探索

研究課題名（英文）Investigation of molecular signature involved in therapy-resistant small cell lung cancer based on understanding of functional RNA sequencing data integration.

研究代表者

美園 俊祐（Misono, Shunsuke）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：30837779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小細胞肺癌の生命予後は極めて不良であり、治療抵抗性や再発・遠隔転移を起こす分子メカニズムを明らかにする事が、本疾患の治療法の開発に繋がると考える。本研究では、治療後に遠隔転移をきたし亡くなった小細胞肺癌患者・剖検検体（3症例）から、次世代シーケンサーおよびマイクロアレイ解析を用いて、機能性RNA発現プロファイルを作製し、癌組織で発現の亢進している遺伝子の中でMCM family（MCM2、MCM4、MCM6、MCM7）に注目した。機能解析でこれらの遺伝子が癌遺伝子であること、抗がん剤（シスプラチン）への感受性を変化させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法後に治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌に対する治療は限定的である。小細胞肺癌に対して有効性が示された分子標的薬は未だ存在しない。本研究では、治療抵抗性となった小細胞肺癌の3例の剖検検体から機能性RNA発現プロファイルを作成し、癌の進行に関連する遺伝子を特定した。同様の研究を継続していくことにより、治療抵抗性となった小細胞肺癌に対する新規治療法の開発へ向けて重要な知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：Small cell lung cancer (SCLC) has an extremely poor prognosis. Elucidating the molecular mechanisms that cause treatment resistance, recurrence, and distant metastasis may lead to the development of therapy. In this study, the molecular signature of SCLC specimens after treatment failure was generated using next generation sequencing (NGS) and microarray. In this profiles, Aberrant expression of MCM2, MCM4, MCM6, and MCM7 were detected in SCLC clinical specimens after treatment failure. Functional analysis revealed that these genes are oncogenes and alter sensitivity to anticancer drugs (cisplatin).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌 機能性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)小細胞肺癌は、肺癌全体の15%~20%を占める疾患である。多くの症例で、初期治療(化学療法・化学放射線療法)に対して良好な反応を示すが、癌細胞は治療抵抗性を獲得し、再発や遠隔転移をきたす。再発や遠隔転移をきたした症例に対して有効な治療法は限定的であり、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬の効果も期待できない。そのため、再発や遠隔転移をきたした患者の生命予後は極めて不良であり、1年以内に殆どの患者は死亡する。再発や遠隔転移をきたした小細胞肺癌患者に対する2次治療、3次治療の開発は急務である。

(小細胞肺癌のゲノム解析研究の背景)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、RNA分子のまま、生体内で様々な機能を有している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の発現を制御している事から、マイクロRNAの発現異常は、細胞内の機能性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事が報告されている

小細胞肺癌の臨床において、初回の治療で、外科的切除となる症例は極めて少ない。再発や遠隔転移をきたした小細胞肺癌患者に対して、外科的治療は行われない。そのため、小細胞肺癌臨床検体を用いた解析は殆んど存在しない。特に、遠隔転移巣を用いた、マイクロRNAを含めた、網羅的なゲノム解析研究の報告は無い。

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。癌細胞由来のエクソソームは(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、治療抵抗性に至った小細胞肺癌患者の組織およびエクソソーム由来のマイクロRNA解析から、治療抵抗性・再発・遠隔転移に関わる「小細胞肺癌・癌促進型マイクロRNA」を探索する事。「小細胞肺癌・癌促進型マイクロRNA」が制御する機能性RNAネットワーク解析から、治療の標的となる分子および分子経路を探索する事である。本研究の成果は、治療抵抗性・小細胞肺癌に対する新規治療法の開発に向けて、有用な情報を提供できると考える。

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(3症例)から作成した機能性RNA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。

4. 研究成果

(1) 治療抵抗性に至った小細胞肺癌の剖検検体(3症例)から作成した機能性RNA発現プロファイルからは発現異常を認めたmRNAの選別

下記のTable 1に示す3症例より組織検体を採取した。採取した組織検体の種類についてはTable 2に示す。

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.

Table 2. Site of sample collection for microarray expression analysis.

A. Cancer Tissues			<i>n</i> = 8
Sample Name	Tissue	Case No.	
SCLC-Pri-1	Primary lesion	2	
SCLC-Pri-2	Primary lesion	3	
SCLC-Meta-1	Lesser curvature lymph node metastasis	1	
SCLC-Meta-2	Mediastinal lymph node metastasis	1	
SCLC-Meta-3	Para-aortic lymph node metastasis	1	
SCLC-Meta-4	Right hilar lymph node metastasis	2	
SCLC-Meta-5	Liver metastasis	1	
SCLC-Meta-6	Right intrapulmonary metastasis	3	
B. Normal lung tissues			<i>n</i> = 4
Sample name	Tissue	case no.	
SCLC N-1	Normal lung tissue	1	
SCLC N-2	Normal lung tissue	1	
SCLC N-3	Normal lung tissue	2	
SCLC N-4	Normal lung tissue	3	

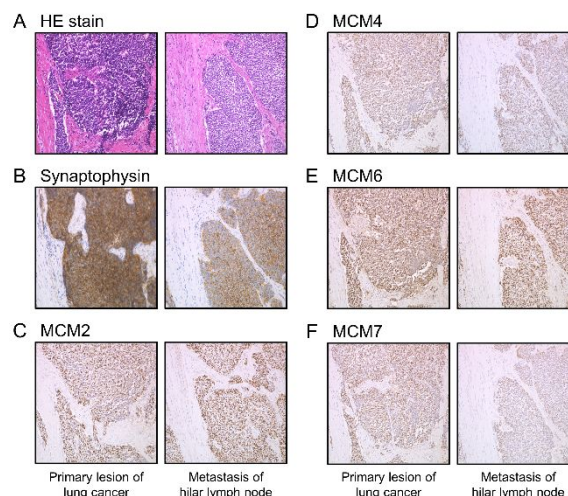
採取した検体より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を用いて機能性 RNA 発現プロファイルを作成した。正常組織と比較して、癌組織で発現が亢進していた遺伝子を 1136 個抽出した。それらの遺伝子について、KEGG を用いて pathway 解析を行い、Cell cycle pathway に関連していた MCM family (MCM2、MCM4、MCM6、MCM7) に注目した。

Table 4. Upregulated genes associated with the cell cycle pathway.

Entrez GeneID	Gene Symbol	Gene Name	Location	Normalized Read Count (Log ₂)			
				Log ₂ Fold Change	Normal Lung Tissues	SCLC Tissues	<i>p</i> -Value
7272	<i>TTK</i>	TTK protein kinase	6q14.1	3.67	-0.37	3.30	0.0034
9134	<i>CCNE2</i>	cyclin E2	8q22.1	3.57	0.05	3.62	0.0002
4173	<i>MCM4</i>	minichromosome maintenance complex component 4	8q11.21	3.33	0.20	3.54	0.0004
699	<i>BUB1</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	2q13	3.18	-0.25	2.92	0.0040
701	<i>BUB1B</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	15q15.1	3.08	-0.03	3.05	0.0018
9133	<i>CCNB2</i>	cyclin B2	15q22.2	3.05	0.05	3.10	0.0055
1029	<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	9p21.3	3.01	0.24	3.25	0.0047
4171	<i>MCM2</i>	minichromosome maintenance complex component 2	3q21.3	2.96	0.01	2.97	0.0008
995	<i>CDC25C</i>	cell division cycle 25 homolog C	5q31.2	2.87	-0.01	2.87	0.0045
891	<i>CCNB1</i>	cyclin B1	5q13.2	2.82	-0.06	2.76	0.0008
1869	<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	20q11.22	2.82	-0.30	2.52	0.0100
9700	<i>ESPL1</i>	extra spindle pole bodies homolog 1	12q13.13	2.70	0.10	2.80	0.0007
8318	<i>CDC45</i>	cell division cycle 45 homolog	22q11.21	2.64	-0.29	2.34	0.0027
8317	<i>CDC7</i>	cell division cycle 7 homolog	1p22.2	2.62	0.01	2.63	0.0006
4085	<i>MAD2L1</i>	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	4q27	2.61	-0.19	2.42	0.0013
898	<i>CCNE1</i>	cyclin E1	19q12	2.61	0.06	2.67	0.0041
1111	<i>CHEK1</i>	CHK1 checkpoint homolog	11q24.2	2.57	0.00	2.57	0.0088
993	<i>CDC25A</i>	cell division cycle 25 homolog A	3p21.31	2.50	-0.15	2.34	0.0044
9232	<i>PTTG1</i>	pituitary tumor-transforming 1	5q33.3	2.40	0.07	2.47	0.0030
983	<i>CDK1</i>	cyclin-dependent kinase 1	10q21.2	2.40	0.05	2.45	0.0058
10926	<i>DBF4</i>	DBF4 homolog	7q21.12	2.22	0.06	2.28	0.0002
4176	<i>MCM7</i>	minichromosome maintenance complex component 7	7q22.1	2.20	0.13	2.33	0.0002
890	<i>CCNA2</i>	cyclin A2	4q27	2.17	0.03	2.20	0.0141
4175	<i>MCM6</i>	minichromosome maintenance complex component 6	2q21.3	2.05	-0.11	1.94	0.0002
6502	<i>SKP2</i>	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	5p13.2	2.04	0.23	2.27	0.0117
5111	<i>PCNA</i>	proliferating cell nuclear antigen	20p13	2.04	0.01	2.05	0.0017
5591	<i>PRKDC</i>	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	8q11.21	2.01	-0.03	1.98	0.0071
10744	<i>PTTG2</i>	pituitary tumor-transforming 2	4p14	2.00	-0.01	1.99	0.0084

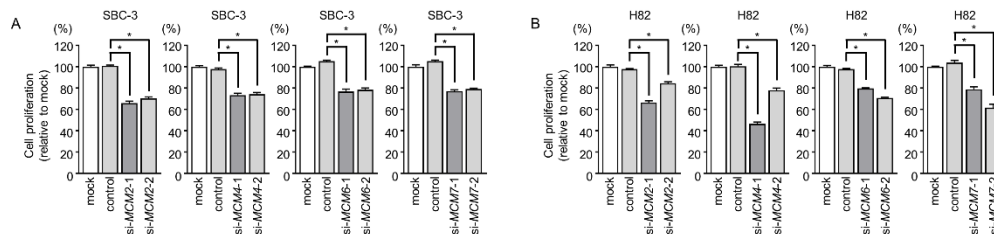
(2) 臨床検体における MCM family の発現

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。

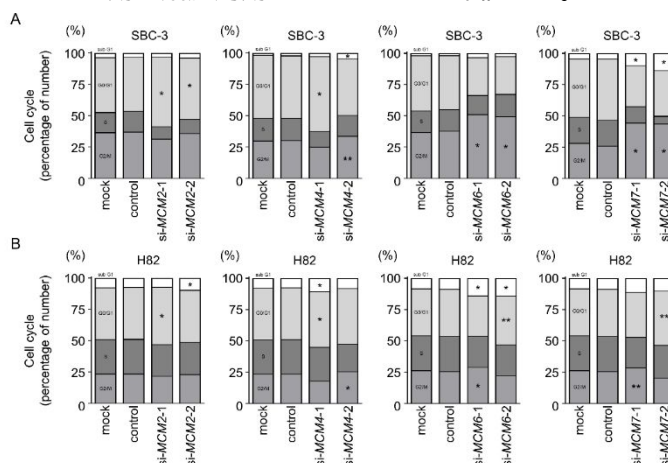


(3) siRNA を用いた Loss-of-function assay

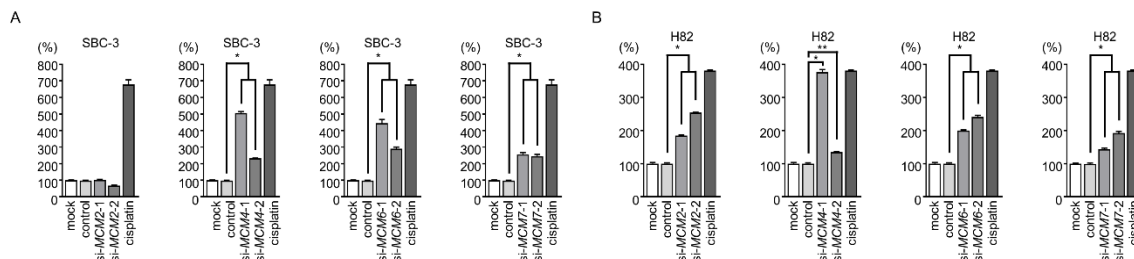
MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 の siRNA を小細胞肺癌細胞株 (SBC-3、H82) に核酸導入して機能解析 (XTT assay, cell cycle assay, apoptosis assay) を行った。MCM2、MCM4、MCM6、MCM7 を knockdown することで細胞増殖は抑制された。



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。

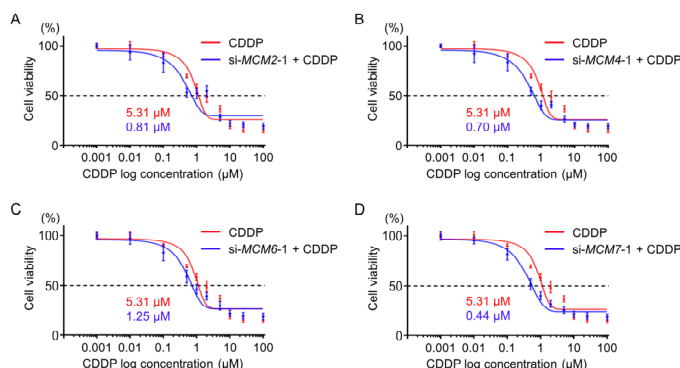


apoptosis assay においては、MCM4、MCM6、MCM7 を knockdown することで、apoptosis が誘導されることを確認した。



(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。



(5) 研究のまとめ

今回の研究から、MCM family (MCM2、MCM4、MCM6、MCM7) は治療抵抗性に至った小細胞肺癌にお

ける重要な機能性 RNA であることが示唆された。化学療法後に治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌に対する治療は限定的であり、予後は極めて不良である。本研究による知見から、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開発に寄与するものと期待する。

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 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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------