

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790173

研究課題名（和文）肺がん化学療法感受性に関わる miRNA データベースの構築

研究課題名（英文）Construction of the miRNA database associate with chemotherapeutic sensitivity in lung cancer.

研究代表者

鈴木 俊宏 (SUZUKI TOSHIHIRO)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80322527

研究成果の概要（和文）：肺がん化学療法感受性に関わる miRNA を見だし、利用することで化学療法の効率化を目的とし、分子標的治療薬であるゲフィチニブに耐性に関わると思われる miRNA の発現をマイクロアレイ及びリアルタイム RT-PCR で解析した。有意な変化の認められた miRNA の機能解析をしたところ、ErbB ファミリーの発現を調節することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Gefitinib has been used for treatment of non-small cell lung cancer. The EGFR gene mutation correlates with clinical response to Gefitinib. However, some patients are resistant to Gefitinib despite the existence of mutated EGFR gene. This resistance is a major problem in patients with NSCLC. Sensitive biomarker is required for effective therapy with chemotherapeutic drugs. Recently, circulating tumor cell and microRNA (miRNA) are focused on as biomarkers for cancer diagnosis.

In this study, we utilized miRNA array and real-time PCR to show that some miRNAs are significantly up-regulated in Gefitinib resistant lung cancer cell lines. Using the miRNA specific inhibitors, we identified ErbB family molecules are as a target gene of these miRNAs.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：miRNA、バイオマーカー、肺がん、薬剤耐性、ゲフィチニブ

1. 研究開始当初の背景

- (1) 本研究開始当初、発がんや転移などがんの特性に関わる miRNA に関する報告が相次いだ。また、抗癌

剤感受性との関わりについても報告が出始めてはいたが、散発的であり、細胞種や組織型の違いからと思われるが、結果が異なる報告も多く、薬剤感受性を反映するよ

うな miRNA すなわち、バイオマーカーとして一般化出来るような分子が存在しなかった。

- (2) 従来 RNA は不安定な分子であると思われていたが、エクソソームと呼ばれる小胞に包みこまれることで、血中に安定に存在していることが明らかにされてきた。それらの起源をたどると腫瘍など疾患臓器から分泌され、病態を反映することが明らかにされつつあった。

それらのことから、癌の早期診断や、病態のバイオマーカーとして miRNA が利用出来るのではないかと期待されるようになってきていた。

- (3) 研究代表者は、以前の検討(科研費若手 B 研究課題番号 20790147 : H20-H21 年度)で、シスプラチン感受性に関わる miRNA を見いだした。

そこで、同じ親株より、分子標的治療薬であるゲフィチニブに対する耐性株を樹立し、シスプラチンと同様の手法を用いて、ゲフィチニブ耐性株における miRNA の発現を解析することで、肺がん化学療法において Key となるプラチナベースの併用化学療法並びに分子標的治療薬の感受性が予測できれば癌化学療法の効率化に寄与することが期待できるのではないかと考え、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

- (1) 肺がんはまだまだ難治であり、化学療法が進歩した今日でも死亡率の高い社会的にも問題な疾患である。現在、プラチナベースの殺細胞薬による併用化学療法とゲフィチニブやクリゾチニブなどの分子標的治療薬による治療が大きな柱となっている。しかしながら、有効性は個人によって差が大きく、個別化医療の推進が求められている。現在 EGFR の変異など、一部はバイオマーカーとして優れた役割を果たしているが、その例外も多く、また再燃後の効果については良いバイオマーカーが存在しないのが現状である。

- (2) 前述のように癌組織由来の miRNA が血中にも遊離していることが示されていることから、化学療法の感受性に関わる miRNA を見だし、その発現パターンから薬剤に対する応答性を推測することができるようになれば、より効率的な化学療法を行う指標として利用することが可能であると思われる。

最終的な到達目標としては、比較的非侵襲的である採血程度で可能なサンプルである血中エクソソームの中に含まれる miRNA を逆転写 PCR で増幅検出することで化学療法の感受性を予測出来るようなバイオマーカーを見出し、鋭敏な診断方法を確立することである。

ゆえに、本研究では、上記到達目標を達成するために、耐性細胞株を複数用いて抗癌剤感受性に関わる miRNA を包括的に探索・同定することである。

3. 研究の方法

本研究では大きく以下の3つに準じて行った。

- 1) ゲフィチニブ耐性細胞のキャラクタライズ
 - 2) miRNA の発現プロファイル
 - 3) Anti-miRNA 導入による機能解析
- 1) ゲフィチニブ耐性細胞樹のキャラクタライズ
- 非小細胞肺がん細胞株 PC-9 由来ゲフィチニブ耐性株 PC-9/MET 及び PC-9/MET1K を用いた。感受性の検討には CCK-8(同仁化学)を用いた。EGFR、HER2、HER3、c-MET など各種関連分子の発現レベルについてはウエスタンブロットにより解析を行った。
- 2) miRNA の発現プロファイル
- miRNA を含むトータル RNA は miRNeasy (キアゲン) を用いて精製した。miRNA の発現はマイクロアレイ : 3D-GENE (東レ) を用いてプロファイリングを行った。
- 耐性株 2 株において、同様の発現傾向が認められた miRNA についてはサイバークリーンを用いたリアルタイム PCR によりバリデーションを行った。
- 得られた miRNA のターゲット分子の推定には miRecords データベース ([http:// mirecords.biolead.org/](http://mirecords.biolead.org/)) を用いた。

3) Anti-miRNA 導入による機能解析

耐性株で過剰発現していた miRNA については Anti-miR (アンビオン) を耐性株に導入し、リアルタイム PCR で抑制効率を、CCK アッセイ (同仁化学) によってシスプラチン感受性の変化を検討した。またその時の関連分子の発現レベルについてはウエスタンブロットにより解析した。

3. 研究成果

- 1) ゲフィチニブ耐性細胞株 2 株はゲフィチニブに対して高度な耐性 (IC_{50} として100倍以上)を示した。それらにおける関連分子の発現をウエスタンブロットで検討したところ、耐性株においてc-METタンパク質の過剰発現が認められたが、その他について大きな差違は認められなかった。
- 2) マイクロアレイによるスクリーニングにより耐性株 2 株で共に高発現 (2倍以上) していた miRNA は、miR-205、301a、9*、487b、31、106b、93、106b*、103、25、708、2277、152、551b、1293 の 15 種類であった。
- 3) 本検討の最終目的としては、血中に遊離してきた癌組織由来 miRNA を高感度に検出して解析することでバイオマーカーとして利用することであるため、本検討では、発現の亢進していた分子のみについて着目し解析することとした。
これらをリアルタイム PCR で定量を行い、再現性良く高値を示した miR-9*、-205 について、更に検討を行うこととした。
- 4) miRecords でターゲット分子の探索を行ったところ、ErbB3、zinc finger E-box binding homeobox 1、2 (ZEB1, 2)、VEGFA、inositol polyphosphate phosphatase -like 1 が miR-205 のターゲット候補としてあがり、EGFR を介したシグナル伝達に関与している可能性が示唆された (現在投稿準備中)。
- 5) miR-9*及び miR-205 の Anti-miR をゲフィチニブ耐性細胞株に導入し、

発現をリアルタイム PCR で確認したところ、ほぼ完全に miRNA の発現を抑制していた。

その時点でゲフィチニブに対する感受性を検討したが、有意な差は認められなかった。現在、抑制後の時間を変更して再検討を行っている。

- 6) また、抑制時における c-MET、EGFR、HER2、ErbB3 の発現をウエスタンブロットで検討したところ、miR-205、miR-9*共に ErbB3 タンパク質の発現亢進傾向が認められた。

現在これらの分子の変動とゲフィチニブ感受性との関係について検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Uemura M, Suzuki T, Nishio K, Chikuma M, Komeda S., An in vivo highly antitumor active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(ii) complex largely circumvents in vitro cisplatin resistance: two linkage isomers yield the same product upon reaction with 9-ethylguanine but exhibit different cytotoxic profiles., *Metalomics*, 査読有、2012, Epub ahead of print.
DOI: 10.1039/C2MT20026K
- ② Saito S, Ohno K, Sekijima M, Suzuki T, Sakuraba H, Database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant arylsulfatase B structures in mucopolysaccharidosis type VI., *J Hum Genet.*, 査読有、57, 2012, 280-282.
DOI: 10.1038/jhg.2012.6.
- ③ Shiozaki T, Fukai M, Hermawati E, Juliawaty LD, Syah YM, Hakim EH, Puthongking P, Suzuki T, Kinoshita K, Takahashi K, Koyama K., Takahashi K, Koyama K., Anti-angiogenic effect of α -mangostin., *J Nat Med.*, 査読有、2012, Epub ahead of print
DOI: 10.1007/s11418-012-0645-z
- ④ Saito S, Ohno K, Suzuki T, Sakuraba H., Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease., *Mol Genet Metab.*, 査読有、105, 2012,

244-248.

- ⑤ Fukai M, Tsukada M, Miki K, Suzuki T, Sugita T, Kinoshita K, Takahashi K, Shiro M, Koyama K., Hypoxylonols C-F, benzol[j]fluoranthenes from Hypoxylon truncatum., *J Nat Prod.*, 査読有、75, 2012, 22-25.
DOI: 10.1021/np2004193
- ⑥ Tsukimura T, Kawashima I, Togawa T, Kodama T, Suzuki T, Watanabe T, Chiba Y, Jigami Y, Fukushige T, Kanekura T, Sakuraba H., Efficient uptake of recombinant α -galactosidase A produced with a gene-manipulated yeast by Fabry mice kidneys., *Mol Med.*, 査読有、18,2012, 76-82.
- ⑦ Tsukada M, Fukai M, Miki K, Shiraishi T, Suzuki T, Nishio K, Sugita T, Ishino M, Kinoshita K, Takahashi K, Shiro M, Koyama K., Chemical constituents of a marine fungus, *Arthrimum sacchari.*, *J Nat Prod.*, 査読有、74, 2011, 1645-1649
- ⑧ Kodama T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Matsuoka K, Kitakaze K, Tsuji D, Itoh K, Ishida Y, Suzuki M, Suzuki T, Sakuraba H. Lyso-GM2 ganglioside: a possible biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease., *PLoS One*, 査読有、6(12), 2011, e29074.
- ⑨ Kaneko A, Tsukada M, Fukai M, Suzuki T, Nishio K, Miki K, Kinoshita K, Takahashi K, Koyama K. KDR Kinase Inhibitor Isolated from the Mushroom *Boletopsis leucomelas.*, *J Nat Prod.*, 査読有、73, 2010, 1002-1004
- ⑩ Ohkawa Y, Miki K, Suzuki T, Nishio K, Sugita T, Kinoshita K, Takahashi K, Koyama K, Antiangiogenic metabolites from a marine-derived fungus, *Hypocrea vinosa.*, *J Nat Prod.*, 査読有、73, 2010, 579-582

[学会発表] (計8件)

- ① Suzuki T, Irisawa A, Nishio K, Togawa T, Sakuraba H, MicroRNA expression profiling in cisplatin resistant human non-small cell lung cancer cell lines, American Association for Cancer Research

102nd Annual Meeting, 2011/4, Orlando, Florida

- ② Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H, MicroRNA expression profiling in drug resistant lung cancer cell lines, The 1st Medicinal Chemistry Seminar 2010 of JSPS Asia-Africa Science Platform Program, 2011/1, Quezon City, Philippines

- ③ 入澤愛、鈴木俊宏、西尾和人、大森亨、兎川忠靖、櫻庭均、miRNAによるゲフィチニブ耐性調節機構の解明、日本薬学会第132年会、2012/3、札幌

- ④ 入澤愛、鈴木俊宏、西尾和人、大森亨、兎川忠靖、櫻庭均、ゲフィチニブ耐性細胞株におけるmicroRNAの発現解析、第70回日本癌学会学術総会、2011/10、名古屋

- ⑤ 入澤愛、鈴木俊宏、西尾和人、大森亨、兎川忠靖、櫻庭均、ゲフィチニブ耐性に関するmicroRNAの探索、第84回日本生化学会大会、2011/9、京都

- ⑥ 鈴木俊宏、入澤愛、西尾和人、大森亨、兎川忠靖、櫻庭均、非小細胞肺癌細胞株におけるmiRNAのプロファイリング、日本薬学会第131年会、2011/3、静岡

- ⑦ 鈴木俊宏、西尾和人、大森亮、兎川忠靖、櫻庭均、肺癌化学療法感受性に関わるmiRNAの探索、第83回日本生化学会大会、2010/12、神戸

- ⑧ 米田誠治、Yuh-Lin Lingb、鈴木俊宏、植村雅子、千熊正彦、制がん活性を有するアゾラト架橋白金(II)二核錯体、第2回メタロミクス研究フォーラム、2010/11、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊宏 (Suzuki Toshihiro)
明治薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80322527