

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591144

研究課題名(和文) 肺癌における診断及び治療標的としてのマイクロリボ核酸の解析

研究課題名(英文) Analysis of microRNA for the diagnosis and treatment of lung cancer

研究代表者

近藤 征史 (Kondo, Masashi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00378077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：miR-127は、第14番染色体短腕(14q32)領域に存在しており、この領域の欠失は胃癌などと同様に肺癌においても報告されている。miR-127の発現低下は、不死化の気道上皮細胞株と比較して、多くの肺癌細胞株で観察された。miR-127の過剰発現は2種類の肺癌細胞株の増殖抑制を生じさせる。さらに、疑似miR-127の導入による遺伝子の発現量をマイクロアレイで検討することにより、標的となる遺伝子を同定した。この結果により、miR-127がこの領域標的であり、非小細胞肺癌に増殖抑制効果を生じさせる効果があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA-127 (miR-127) is located in 14q32 region and the deletion in this region has been reported in lung cancer as well as gastric cancer and hepatocellular carcinoma. The reduced expressions of miR-127 were observed in most of lung cancer cell lines, compared the immortalized normal human bronchial epithelial cell by real time PCR method with Taqman microRNA assay. The overexpression of miR-127 in two lung cancer cell lines, led to tumor growth inhibition. Moreover, mRNA microarray analysis of H1975 cancer cell lines after transfection of miR-127 mimic indicated the candidate target genes of miR-127. These results suggested that miR-127 have tumor suppressive effect in non-small-cell lung cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：マイクロリボ核酸 肺癌

1. 研究開始当初の背景

癌細胞における染色体の欠失領域の検索より、今までに多くの癌抑制遺伝子が単離され、その機能が同定されてきた。これらの癌抑制遺伝子異常に関する研究により、癌の発生過程や生物学的な特徴が明らかにされ、肺癌の診断や治療の向上がはかられている。しかしながら、肺癌で高頻度の欠失する染色体領域のすべてにおいて、癌抑制遺伝子が単離されているわけではない。最近、マイクロホリボ核酸(マイクロ RNA)が遺伝子の発現、翻訳を制御することが判明し、発癌過程においても、癌関連遺伝子の発現制御することにより、重要な役割をはたすことが知られている。

2. 研究の目的

本研究において、以前より研究代表者が解析をおこなってきた第3番染色体の短腕などの欠失領域に存在するマイクロ RNA の肺癌発生過程における関与を明らかにすることを目的とする。肺癌をはじめとする悪性腫瘍においては、特定の染色体領域が欠失することが知られているが、欠失の標的が遺伝子だけではなく、マイクロ RNA である可能性があると考えられる。

本研究により、標的となるマイクロ RNA の同定より、肺癌診療の向上を目的とする。欠失領域のマイクロ RNA の発現レベルなどを検討することにより、肺癌の予後や薬剤の感受性の予測が可能になるかもしれない。また、マイクロ RNA の発現を回復させることにより、肺癌の治療への応用を指す。また、欠失の標的となっているマイクロ RNA により制御されている遺伝子を解析することにより、癌の生物学的特性の理解が深まることが期待できる。

3. 研究の方法

肺癌における最も高頻度の欠失領域である第3番染色体 21.3 領域に存在するマイクロ RNA をデータベースにてサーチして、その機能解析を行う。また、ゲノム刷り込みが生じている遺伝子が存在し、肺癌で中程度の頻度欠失している第14番染色体短腕(14q32)領域に存在するマイクロ RNA に関しても検討をおこなった。

不死化肺上皮細胞株と肺癌細胞株において発現量の解析を行った(リアルタイム PCR 法)。マイクロ RNA の本体ならびにプロモーター領域の変異解析を行った(シーケンス法)。マイクロ RNA を過剰発現させ(リポフェタミン等による疑似マイクロ RNA の肺癌細胞へのトランスフェクション)、癌細胞の増殖抑制効果を検討した(WST-1 アッセイ)。さらに抑制の機序を解明するため、細胞周期の解析をおこなった(propidium iodides 染色後による FACS 装置による解析)。

データベース検索やマイクロアレイによる mRNA の発現の解析により、その領域に存在しているマイクロ RNA が制御している遺伝

子を同定する。

4. 研究成果

(1) miR-566

高頻度の欠失領域である第3染色体短腕(3p21.3 領域)に存在するセマフォリン 3F(SEMA3F)の遺伝子内に存在している miR-566 の解析を行った。8種類の肺癌細胞株と56臨床検体(腺癌 26 例、扁平上皮癌 30 例)より DNA を抽出し、PCR 増幅(Fwd miR-566 : GGAGCATTAACCCACCTGAGC, Rev miR-566 : CATGCGGTGCTGGTCCCTC)し、塩基配列をシーケンスして、プロモーター領域およびマイクロ RNA 本体の変異の検索をおこなった。既知の遺伝子多型(rs6446201)を認めたが、それ以外の新たな塩基配列の変化を認めなかった。

次に、SEMA3F と miR-566 の発現のパターンを比較検討した。一部の肺癌細胞株において発現の低下を認めたが、従来いわれているように、マイクロ RNA が存在している遺伝子(SEMA3F)の発現と必ずしも一致していなかった(図1A, B)。miR-566 の発現の低下している肺癌細胞株(A549, NCI-H-460)に、疑似マイクロ RNA を導入して、細胞増殖能を検討したが、細胞増殖能に変化を認めなかった(図2)。さらに、足場非依存性増殖を検討するために、寒天培地におけるコロニー形成を検討したが、差が見られなかった。

以上の結果より、三番染色体短腕 21.3 領域に存在する miR-566 は、この領域の欠失の標的である可能性は低いと考えられた。しかしながら、最近、肺癌での高い頻度が知られている三番染色体の他の領域(FHIT 遺伝子の内)のマイクロ RNA が腫瘍増殖抑制効果を有することが報告されており、本研究のごとくのアプローチには、妥当性があると思われる。

(2) miR-127

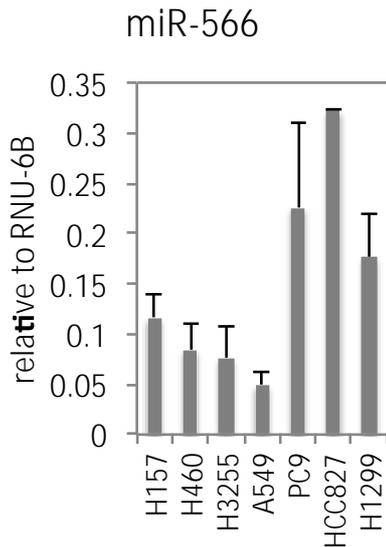
miR-127 は、第14番染色体短腕(14q32)領域に存在しており、この領域は肺癌において中程度の欠失が報告されている。最初に、腫瘍細胞株 16 株および不死化正常細胞 2 株における miR-127 の発現を、Taqman microRNA assay を用いた real time PCR 法により検討した。不死化正常細胞と比較して、13種類の肺癌細胞株において、著明な miR-127 発現レベルの低下を認めた。低発現株(NCI-H-157, NCI-H-1975)に疑似 miR-127 を導入したところ、著明な増殖の抑制を認めた(図3)。さらにコロニー形成能の低下も認めた。増殖抑制の機序を検討するために、細胞周期の解析を行ったところ、NCI-H-1975 では、疑似 miR-127 の導入により、G1 アレストが生じている可能性が示唆された。さらに、miR-127 により発現制御されている遺伝子を、データベースおよびマイクロアレイによる発現解析にて検討した結果、数個の候補遺伝子が選択された(図4)。

疑似 miR-127 の遺伝子導入により、標的遺

伝子の発現の低下と、その遺伝子をノックダウンすることにより、肺癌細胞の増殖を抑制する効果を認めている。さらに、複数の肺癌細胞株を用いて検討中である。

図 1 miR-566(A)と SEMA-3F(B)の肺癌細胞株における発現

A



B

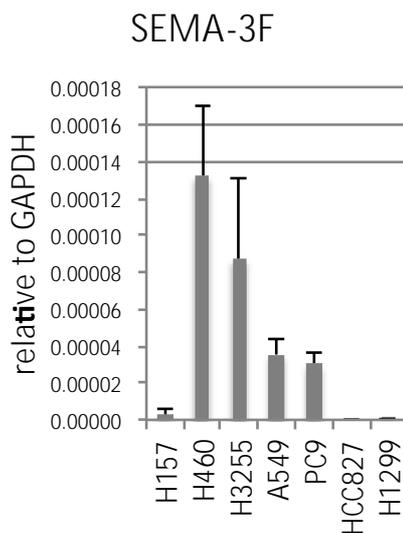


図 2 疑似マイクロ RNA (miR-566) の肺癌細胞株 NCI-H460 への導入の効果。試薬のみ(左)や GFP: 陰性コントロール(中)と比較しても、miR-566(右)においても増殖抑制効果を認めなかった。

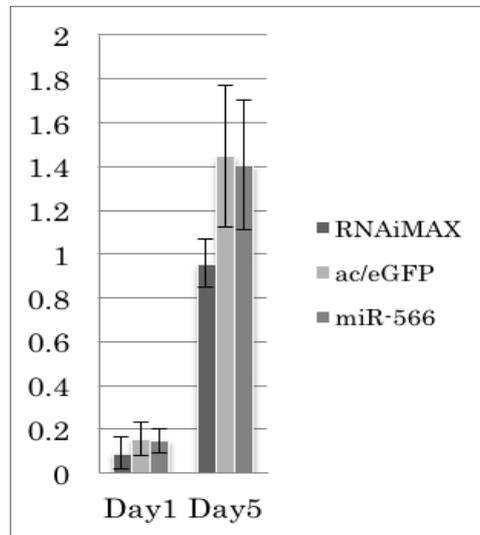


図 3 疑似マイクロ RNA (miR-127) の NCI-H157 への導入による細胞増殖抑制効果。10nM の miR-127 and ac/eGFP (陰性コントロール) を細胞株に導入後、WST-1 により細胞増殖を評価した。H-1975 においても同様な抑制効果を認めた (data not shown)

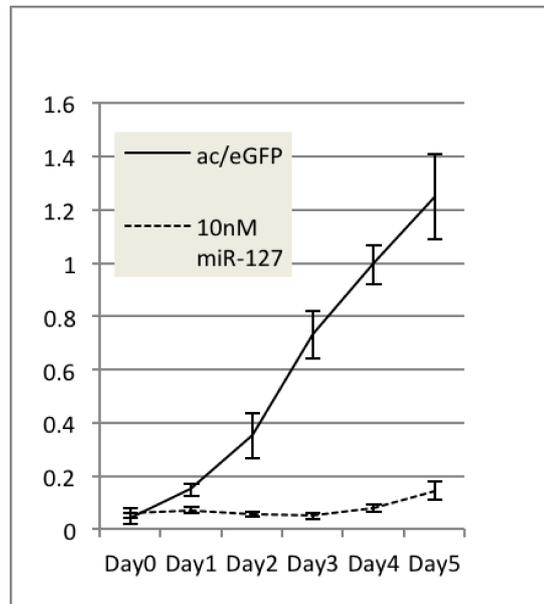
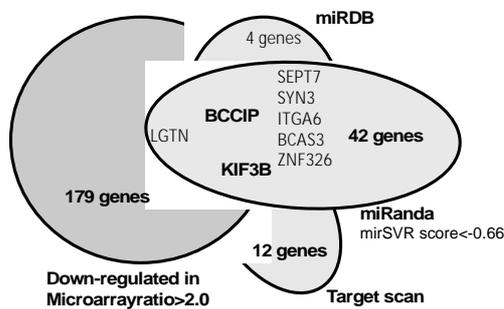


図 4 公開されている 3 つのマイクロ RNA データベースおよび疑似マイクロ RNA (miR-127) の肺癌細胞株への導入による遺伝子発現の変化 (mRNA のマクロアレイ解析) による miR-127 の標的となる候補遺伝子



(3) まとめ

この研究により、肺癌で中程度の欠失領域でゲノム刷り込みを受けている遺伝子のある第14番染色体短腕(14q32)領域に存在するmiR-127が、肺癌細胞株において、発現が低下しており、その発現を回復させると、細胞増殖抑制を認めた。さらに、miR-127により発現が抑制されている遺伝子をノックダウンすることにより、同様に細胞株の増殖抑制を認めた。以上より、miR-127がこの領域の欠失の標的である可能性が示唆され、このマイクロRNAによる肺癌治療の可能性が示唆された。遺伝子多型が、このマイクロRNA内に存在していないので、アリルを区別が困難であり、ゲノム刷り込みがこのマイクロRNAに生じているか不明である。しかしながら、仮にmiR-127がゲノム刷り込みにより、片方のアリルのみから発現しているならば、そのアリルの欠失のみで、著名な発現低下が生じる可能性があると思われる。同時に、変異やDNAのメチル化によるこのマイクロRNAの不活性化の可能性もあり、さらなる検討が必要であると思われる。

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5件)

Yoshida K, Sato M, Hase T, Elshazley M, Yamashita R, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Nakamura S, Kondo M, Girard L, Minna JD, Hasegawa Y. TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival. *Cancer Sci*. 104:171-7, 2013 査読有

Watanabe N, Taniguchi H, Kondoh Y, Kimura T, Kataoka K, Nishiyama O, Kondo M, Hasegawa Y. Efficacy of Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiration*. 85:326-31, 2013 査読有

Tamura M, Kondo M, Horio M, Ando M, Saito H, Yamamoto M, Horio Y, Hasegawa Y. Genetic polymorphisms of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters (ABCG2, ABCB1) and gefitinib

toxicity. *Nagoya J Med Sci* 74:133-40, 2012 査読有

Elshazley M, Sato M, Hase T, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 131:2820-31, 2012 査読有

Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y. Transient but Not Stable ZEB1 Knockdown Dramatically Inhibits Growth of Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Ann Surg Oncol* 19:634-45, 2012

〔学会発表〕(計3件)

丸山 英一、各務 智弘、梶川 茂久、山下良、佐藤光夫、近藤征史、長谷川好規
非小細胞肺癌におけるmiR-127の機能解析
第54回呼吸器学会 大阪 2014年4月25日

山下良、佐藤光夫、Momen Elshazley、長谷川哲成、丸山英一、梶川茂久、各務智彦、近藤征史、長谷川好規
時計遺伝子Bmal1ノックダウンはアポトーシスと細胞老化を介して肺癌細胞の増殖を抑制する
第54回日本肺癌学会 東京 千代田区 2013年11月21日

Yoshida K, Sato M, Hase T, Elshazley M, Yamashita R, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Nakamura S, Kondo M, Girard L, Minna JD, Hasegawa Y. Silencing TIMELESS induces growth suppression, apoptosis and enhanced cytotoxicity of cisplatin in H157 lung cancer cell lines
2012年アメリカ癌学会 米国 シカゴ 2012年4月4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 征史 (KONDO, MASASHI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：00378077

(2) 研究分担者

佐藤 光夫 (SATO, MITSUO)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70467281

(3) 連携研究者 なし