

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592061

研究課題名(和文) 肺癌におけるマイクロRNA発現異常の同定と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Detection of aberrant expression of microRNAs and development of new diagnostics and treatment in lung cancer

研究代表者

三好 新一郎(Miyoshi, Shinichiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00190827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌において発現が低下しているマイクロRNAとして、miR-34b/cおよびmiR-200cを同定した。miR-34b/cは、小細胞癌においてメチル化による発現の低下がより高頻度に認められた。悪性胸膜中皮腫細胞株を用いたマウスモデルにおいて、miR-34b/cの導入により抗腫瘍効果を認めた。miR-200cは、EGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞株では発現が保たれていたが、それらの細胞株からEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性株を作成した際にその発現低下が確認され、またその耐性株では上皮間葉移行を認めた。この耐性株にmiR-200cを導入することで上皮間葉移行が解除されることも確認した。

研究成果の概要(英文)：We detected that expression of miR-34b/c and miR-200c was inhibited in lung cancer. miR-34b/c was more frequently inhibited by methylation in small cell lung cancer. We detected that induction of miR-34b/c showed anti-tumor effect in malignant pleural mesothelioma in vivo. As for miR-200c, its expression was maintained in EGFR-mutant lung cancer cell lines and it was inhibited in EGFR-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI). In addition, epithelial to mesenchymal transition (EMT) was observed in that TKI-resistant cell line. We also confirmed that induction of miR-200c to the TKI-resistant cell line resulted in the termination of EMT.

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：原発性肺癌 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍においてマイクロ RNA (以下、miRNA) の異常が注目されている。miRNA は RNA 干渉により複数のタンパク質の発現を抑制するが、種々の癌腫でその異常が報告されている。

(2) 原発性肺癌は様々な病態の解明や新しい治療法の研究が行われているにもかかわらず、癌による死因の第一位である。肺癌に対する確固とした治療は未だ確立されておらず、さらなる病態の解明・新しい治療法の確立が急がれる。

2. 研究の目的

(1) 原発性肺癌における miRNA 異常を解析し、原発性肺癌の病態の解明を目指す。

(2) invitro, invivo の実験を通して、miRNA 異常に着目した新しい治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 種々の悪性腫瘍でその発現異常が報告されている miRNA について、原発性肺癌細胞株および臨床検体でその発現状態を解析する。発現低下が認められる miRNA があれば、発現低下の原因としてメチル化を認めるか解析し、メチル化が認められた場合は、脱メチル化処理により、その miRNA の発現が回復するか検討する。

(2) 高頻度に発現低下が認められる miRNA が明らかになった場合は、その miRNA の発現ベクターを作成して原発性肺癌細胞株に導入し、細胞周期・アポトーシス・浸潤能を中心に、flow cytometry 法・invasion アッセイを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 肺癌において発現が低下しているマイクロ RNA として、miR-34b/c および miR-200c を同定した。miR-34b/c は、メチル化により発現が低下しており、非小細胞肺癌と比較して小細胞肺癌においてより高頻度に認められた。また、脱メチル化によりその発現は回復した。miR-34b/c を小細胞肺癌細胞株に導入することにより、細胞増殖、遊走能、浸潤能が抑制された (図 1、図 2)。

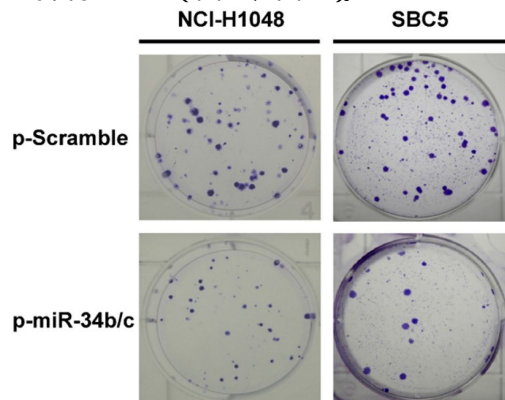


図 1 miR-34b/c による細胞増殖抑制

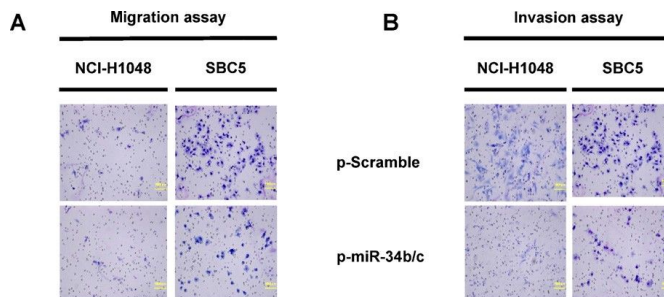


図 2 miR-34b/c による遊走能・浸潤能の抑制

(2) miR-200c は、EGFR 遺伝子変異を有する原発性肺癌細胞株ではその発現は保たれていたが、それらの細胞株の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性株を作成した際にその発現低下が確認され (図 3)、その耐性株では上皮間葉移行を認めた。さらに、上記耐性株に miR-200c を導入することで上皮間葉移行が解除されることも確認した。

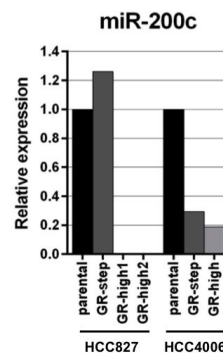


図 3 耐性株における miR-200c の発現低下

(3) 悪性胸膜中皮腫細胞株を用いたマウスモデルにおいて、miR-34b/c の導入により抗腫瘍効果を認めた (図 4)。今後、原発性肺癌細胞株を用いたマウスモデルにおいても、抗腫瘍効果を検討する予定である。

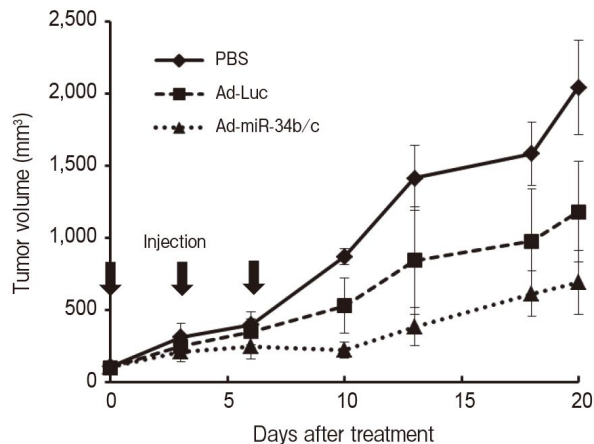


図 4 マウスモデルにおける miR-34b/c の抗腫瘍効果

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)

Ueno T, Toyooka S, Fukazawa T, Kubo T, Soh J, Asano H, Muraoka T, Tanaka N, Maki Y, Shien K, Furukawa M, Sakaguchi M, Yamamoto H, Tsukuda K, Miyoshi S. Preclinical evaluation of microRNA-34b/c delivery for malignant pleural mesothelioma. Acta Med Okayama 2014;68(1):23-26. 査読有
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553485>

Muraoka T, Soh J, Toyooka S, Aoe K, Fujimoto N, Hashida S, Maki Y, Tanaka N, Shien K, Furukawa M, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, Kishimoto T, Otsuki T, Miyoshi S. The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma. Lung Cancer 2013;82(3):485-490. 査読有
doi: 10.1016/j.lungcan.2013.09.017

Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, Hashida S, Maki Y, Ichihara E, Asano H, Tsukuda K, Takigawa N, Kiura K, Gazdar AF, Lam WL, Miyoshi S. Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. Cancer Res. 2013;73(10):3051-61. 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.

Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Ueno T, Yamamoto H, Asano H, Otsuki T, Miyoshi S. Downregulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. Oncology Reports 2013;29(6):2169-74. 査読有
doi: 10.3892/or.2013.2351.

Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Yamamoto H, Maki Y, Muraoka T, Shien K, Furukawa M, Ueno T, Asano H, Tsukuda K, Aoe K, Miyoshi S. Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2012;76(1):32-8. 査読有
doi: 10.1016/j.lungcan.2011.10.002.

〔学会発表〕(計 3件)

Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Thu KL, Hashida S, Maki Y, Ichihara E, Asano H, Tsukuda K, Takigawa N, Kiura K, Gazdar AF, Lam WL, Miyoshi S. Acquisition of stem cell-like properties during acquired resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. AACR Annual Meeting 2013 2013年4月9日 Washington DC, USA

Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Ueno T, Asano H, Otsuki T, Miyoshi S. Down-regulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. 103rd AACR Annual Meeting 2012年04月01日 Chicago, USA

田中則光、豊岡伸一、宗淳一、浅野博昭、佃和憲、三好新一郎 小細胞肺癌における microRNA-34b/c のメチル化とその役割 日本癌治療学会総会 2011年10月27日～29日、名古屋

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nigeka-okayama-u.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 新一郎 (MIYOSHI SHINICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00190827

(2) 研究分担者

豊岡 伸一 (TOYOOKA SHINICHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30397880

宗 淳一 (SOH JUNICHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90559890

佃 和憲 (TSUKUDA KAZUNORI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：20346430

浅野 博昭 (ASANO HIROAKI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：70534775

(3) 連携研究者

該当無し