

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670423

研究課題名(和文)ハイスループットスクリーニングを用いた小細胞肺癌の新規診断法と治療法開発

研究課題名(英文)Study of novel diagnostic tests and treatment of small cell lung cancer.

研究代表者

下條 正仁(Shimojo, Masahito)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90591925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌のなかで悪性度が高い小細胞肺癌(SCLC)は効果的な早期診断法及び治療法が必要とされている。最近、SCLC特異的スプライシングアクティベーターnSR100(Srrm4)の発現上昇が腫瘍形成に著しく関与しているデータを報告した。本研究では、nSR100発現に関与すると推測されるmiRNAに関して患者血液中の発現を解析した結果、SCLC特異的miRNAを見出した。さらに、複数の化合物を添加後、SCLC細胞内のnSR100発現を解析した結果、nSR100発現に影響する化合物に関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung cancer (SCLC) is a highly malignant form of cancer, which originates from primitive neuroendocrine cells in the lung. Most recently, nSR100 (SRRM4) was highly expressed in SCLC cells correlating with enhancing tumorigenicity and resistance to apoptosis. Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway induced nSR100 expression, whereas the specific MEK/ERK inhibitor inhibited nSR100 expression. In this study, we analyzed miRNAs relating nSR100 expression in serum from several patients and nSR100 expression in SCLC cells treated with several compounds including pathway specific inhibitors.

研究分野：分子生物学

キーワード：小細胞肺癌

1. 研究開始当初の背景

現代社会の死因のトップである「癌」の発症機序と治療法は確立しておらず、早期診断・有効な治療法が重要である。肺癌は小細胞肺癌 (SCLC) と非小細胞肺癌 (NSCLC) とに分類される。NSCLC は診断後外科的手術が可能である場合が多いが、SCLC は外科的手術が不可能で化学療法が主である。ほとんどの SCLC には傍腫瘍神経症候群 (PNS) が伴い、患者の血清・髄液に特徴的な自己抗体が検出される。PNS は自己免疫疾患が原因と考えられ、抗原の過剰発現、免疫寛容の破綻から自己反応性リンパ球の活性化を伴い、抗体が産生される。PNS では、異常な神経症状が急速に進行し身体的に高度の機能障害を生じる。SCLC の約 80% 以上の例で、神経異常症状と抗体の検出が腫瘍発見の数か月から数年先行しており、抗体の検出が SCLC の診断法として考えられている。SCLC は化学療法耐性となることから効果的な早期診断法及び治療法が必要とされている。

2. 研究の目的

癌の中で死亡率が最も高い肺がんの小細胞肺癌 (SCLC) の新規治療法と診断法を開発する。最近、研究代表者は SCLC 特異的のスーパーインアクティベーター nSR100 (Srrm4) の発現上昇と転写抑制因子 REST アイソフォーム (sREST) の発現が腫瘍形成に著しく関与しているという興味深い新しいデータを報告した (Shimojo et al. Mol Cancer Res 11:1258, 2013)。nSR100 の発現は細胞外マトリクスで促進され、腫瘍形成を著しく高めたことから、nSR100 を治療ターゲットとした新規抗腫瘍治療薬の開発が考えられる。今回、新規治療薬となる分子の探索、さらに、SCLC 特異的に発現する miRNA (網羅的 miRNA アレイにて発見済み) をターゲットに新規診断法開発にむけた研究を行う。

3. 研究の方法

(1) SCLC 患者血液中の nSR100 及び miRNA の発現解析

すでに入手している SCLC 患者と健常者の血液を用いて、miRNA の発現解析を行った。血清中の miRNA は total RNA として miRNeasy (Qiagen) により抽出する。miRNA の解析は RT-PCR を用いた方法で行った。

(2) SCLC 細胞およびその他細胞を培養し、培地中に複数の化合物を添加後、細胞を回収し、細胞内の nSR100 発現の解析を行った。さらに、細胞のアポトーシスに関して細胞数を分析し、各化合物の抗腫瘍効果について解析を行った。

4. 研究成果

これまでの研究で SCLC 特異的と推察される

nSR100 の発現に影響する miRNA-X1, X2, X3, X4 に関して qRT-PCR にて解析を行った。サンプル間で変動することのない miRNA として添加した既知量の miRNA に対するそれぞれの miRNA の定量を行った。その結果、SCLC 患者由来の血液中には、その他の癌患者より高濃度の miRNA-X1, X2, X3, X4 を検出した (図 1)。

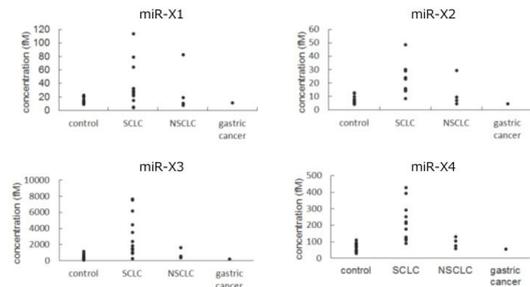


図 1 血液中の miR-X1 ~ X4 の定量解析
小細胞肺癌 (SCLC) 及び非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者、胃がん患者及び健常者血液中の miR-X1 ~ X4 の定量を行った。

その中で、もっとも高濃度で検出された miRNA-X3 に関して、種々の癌患者を含む血液サンプルを増やして解析を行ったところ、多くの SCLC 患者には、他の患者とは優位に異なる高濃度の miRNA-X3 が含まれることが示唆された。その中で、これまでの診断結果と照らし合わせて、腫瘍の進行度と比較して優位にその量が増加していることも示唆された (図 2)。

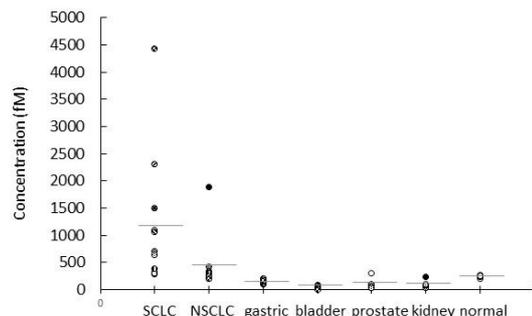


図 2 癌患者血液中の miR-X3 の定量解析
小細胞肺癌 (SCLC)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、肝臓癌患者及び健常者血液中の miR-X3 の定量解析を行った。

これまでの研究から nSR100 発現は、MEK/ERK と PI3K/Akt/mTOR 系の両方でコントロールされていることが示唆されている。これらの系を特異的にコントロールする物質をスクリーニングすることが新たな新規腫瘍薬を発見することができる考えた。そこで、培養細胞を用いて、種々の特異的インヒビターとなる化合物を添加して、nSR100 発現を解析した。今回用いた一例の化合物を示す (図 3 (B))。

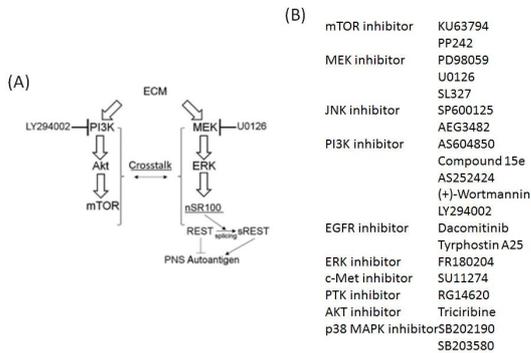


図3 nSR100 の発現に関与していると考えられるパスウェイ (A)
(Mol Cancer Res. 11(10):1258, 2013)
(B) 実験で使用した化合物のうちパスウェイに影響する阻害剤の一部リスト

複数の化合物を用いて、添加する濃度による N417 の細胞死数を比較検討した。U0126 を添加した場合、48 時間後に細胞死を起こす細胞数は、その濃度依存的であった。(図 4)

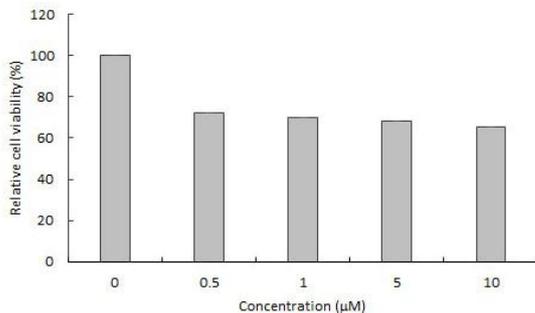


図4 N417 細胞の阻害剤添加後の細胞死
N417 細胞に各濃度の U0126 を添加後、48 時間後の細胞数を WST-8 により解析を行った。

nSR100 の発現に影響すると考えられる様々な化合物を添加後、N417 細胞内の nSR100 発現を解析した(図 5)。その結果、U0126 は抑制していたが、LY294002 は促進していた。また、U0126 は Camptothecin (CPT) を用いても、同時添加することで nSR100 発現をさらに促進していた。結果として、これらの系を同時に抑える化合物を用いることが重要であると考えられた。

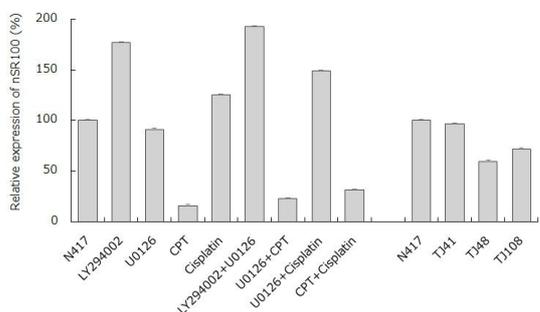


図5 各化合物を N417 細胞に添加後、48 時間後の nSR100 発現を解析した。

nSR100 発現に影響する化合物を網羅的に解析するため、図 3 に示したパスウェイに影響すると推測される化合物 (B) を N417 の培地中に添加 48 時間後、nSR100 発現の解析を行った。その結果、nSR100 発現を抑制するものと促進するものがあり、MEK 及び PI3K パスウェイに影響する化合物は、nSR100 発現に重要で抗腫瘍効果を期待できるが、さらに詳細な検討が必要であることが示唆された。

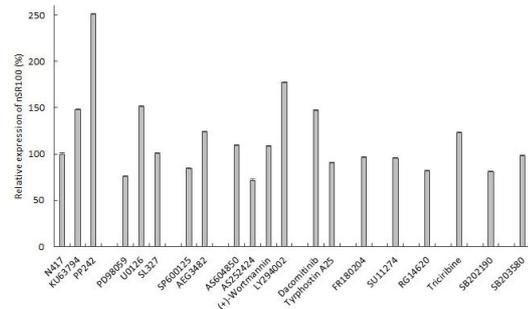


図6 様々な化合物を N417 細胞に添加後、nSR100 発現を解析した。図 3 (B) に示した様々な化合物を培地に添加 48 時間後、nSR100 発現を解析した。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 4 件)

1. Shimojo M. Shudo Y.
Selective siRNA-mediated suppression of nSR100 (SRRM4) induces the cell death of small cell lung cancer
第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸国際会議場) 2015 年 12 月 1-4 日

2. Shimojo M. Shudo Y. Ito S.
Selective siRNA-mediated suppression of nSR100 (SRRM4) induces the cell death of small cell lung cancer.
45th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Chicago, IL, Oct. 17-21, 2015)

3. Shimojo M. Shudo Y. Ikeda M. Kobashi T. Ito S.
Identification of small cell lung cancer (SCLC)-specific miRNAs in blood as a tumor marker for the detection of SCLC.
第 37 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 2014 年 11 月 25-27 日

4. Shimojo M. Shudo Y. Ito S.
Identification of small cell lung cancer (SCLC)-specific miRNAs in blood as a tumor marker for the detection of SCLC.
44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Washington, DC, Nov. 15-19, 2014)

6. 研究組織

(1)研究代表者

下條 正仁 (SHIMOJO, Masahito)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90591925

(3)連携研究者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：80201325

野村 昌作 (NOMURA, Shosaku)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：20218358

倉田 宝保 (KURATA, Takayasu)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：40340781