

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462138

研究課題名(和文) 肺癌の血液中マイクロRNA解析による新規バイオマーカー開発

研究課題名(英文) New biomarker development by the microRNA analysis with blood sample of the lung cancer patients

研究代表者

大平 達夫 (Ohira, Tatsuo)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：40317847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAは、タンパク質をコードしない小さなRNAで、肺癌のバイオマーカーとして有効かを検討する研究である。約900のマイクロRNAを網羅的に解析した。その後、統合解析を行い、特異的なマイクロRNAを検出した。その結果、5種類のマイクロRNAの上昇および5種類の低下を検出した。この結果を基に、血液での検出が可能かどうか、バイオマーカーとしての可能性について検討を開始した。血液中の変異検出率を規定する因子は、腫瘍の体積であった。血液中での腫瘍由来の遺伝子解析では、手術の対象となるような早期の肺癌では、検出が困難であることが示された。マイクロRNAは、早期の症例でも有効が研究を継続中である。

研究成果の概要(英文)：The microRNA is the small RNA molecules which does not encode protein. The object of this study is to examine whether microRNA is effective as biomarker of the lung cancer. I analyzed approximately 900 microRNA comprehensively. Then, I analyzed specific microRNA. As a result, I detected a decrease of five kinds of microRNA and five kinds of increase. Based on this result, I started examination about possibility as the biomarker whether the detection with the blood was possible. As a result of having searched the clinicopathologic factor which prescribed a variation rate of detection in blood, the result that the volume of tumor was related to was provided. By the gene analysis derived from a tumor in the blood, it was shown by the early lung cancer that became a target of the operation that the detection was difficult. I continue study about biomarker for lung cancer with microRNA.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 バイオマーカー マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩により、発癌過程が遺伝子の異常による細胞内シグナル伝達系や細胞周期調節に関与する分子機能の破綻として認識されるに至った。発癌に深く関与する癌遺伝子、癌抑制遺伝子を数多くの遺伝子の中から選別し、この発現の有無により診断、治療の個別化をはかることはポストゲノムの大きな課題の一つである。肺癌の中でも腺癌では、EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子など最も大切な遺伝子異常が解明されつつある。また近い将来に遺伝子解析を肺癌の臨床情報として還元するならば、しかるべき遺伝子の異常の有無を血液など非侵襲的に採取しうる検体を用いて解析しうる事が必須となる。ホルマリン処理した豊富な臨床情報を含む検体からバイオマーカーを検索し、その後、低侵襲で採取可能な血液でバイオマーカーの有用性を検証する。今まで、西村客員教授と共同でホルマリン処理した検体よりマイクロダイセクションを行い、プロテオーム解析を用いて新しいバイオマーカーをタンパク解析で発見してきた。しかし、血液への応用が困難であった。本実験では、マイクロ RNA に着目した。マイクロ RNA は、タンパク質をコードしない小さな RNA 分子であり、発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっていると考えられ、最近では癌との関連が報告されている。マイクロ RNA は、小さな RNA 分子であるため、ホルマリン固定の影響が小さいと考えられた。また、血液中で分解されると考えられてきたが、マイクロ RNA は、血液中で安定しておりバイオマーカーとして期待される。

## 2. 研究の目的

1980 年代以降は、癌は日本人の死因の第一位であり、現在も増加傾向を示しており、その対策は必須である。年間 30 万人以上の日本人が癌で命を落としていて、中でも最も多い肺癌は 7 万人以上が命を落とす原因となって

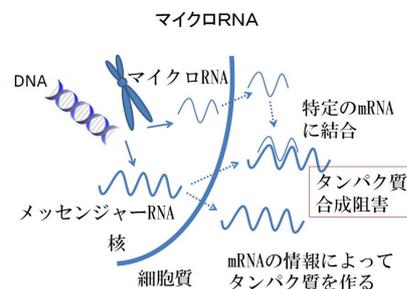
いて、治療戦略の改善が必須である。肺癌の治療成績向上のためには、肺癌の早期発見あるいは効果的な治療を行うためのバイオマーカー検索が効果的であると期待される。本研究は、マイクロ RNA (miRNA) に着目し、新しいバイオマーカーを探索する。本実験は血液中でも安定していることが解ったマイクロ RNA をバイオマーカーとして、より効率的な治療を行う斬新な研究である。

## 3. 研究の方法

東京医科大学病院で手術を行った肺癌患者のホルマリン固定標本を用いて肺癌の早期発見のためのバイオマーカーに用いることが可能なマイクロ RNA を検出する。豊富な臨床情報を有するホルマリン固定標本から RNA を抽出して、マイクロ RNA プロファイルを検証し早期肺癌のバイオマーカーを検証する。ホルマリン固定標本からのマイクロ RNA の検出は可能であることを実証する。この手法を用いてバイオマーカーとなるマイクロ RNA を同定し、次に血液でも同様な結果が検出可能かどうかを検証し、血液での応用を検討する。

## 4. 研究成果

(1) マイクロ RNA は、タンパク質をコードしない小さな RNA で、肺癌のバイオマーカーとして有効かを検討する研究である。マイクロ RNA は、発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっていると考えられ、最近では癌との関連が報告されている。

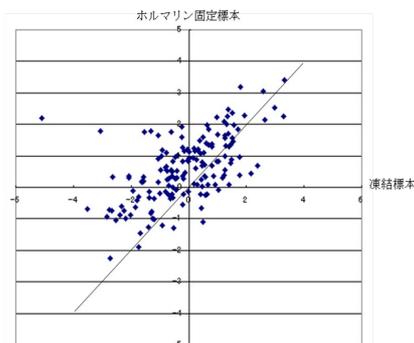


マイクロRNAは、18-25塩基からなる低分子non-coding RNAの一種であり、遺伝子の転写制御に関与する

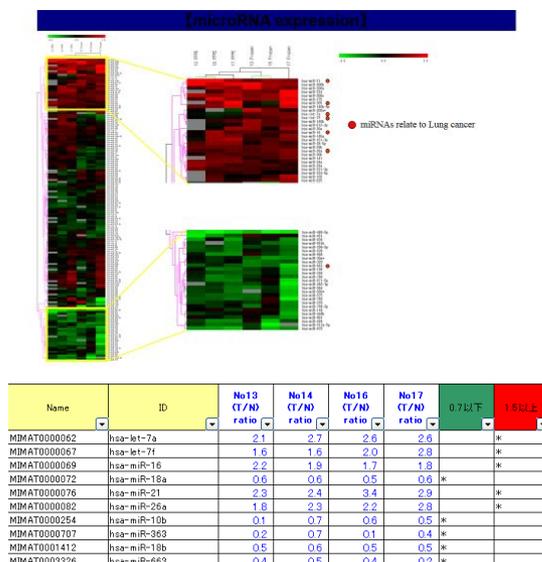
(2) 我々は、今までにホルマリン固定標本を

用いてプロテオーム解析を行う方法を確立してきた。ホルマリン固定標本で解析が可能であれば、臨床経過を解析することが容易となるためにバイオマーカー研究では有用な方法となる。ホルマリン固定標本を用いて、マイクロRNAを検出することが可能であるかどうかを検討するために、手術時に採取した凍結標本とホルマリン固定を行った標本でマイクロRNAの解析結果を比較したところ、良好な相関が得られた。

マイクロRNAの凍結標本とホルマリン固定標本での相関



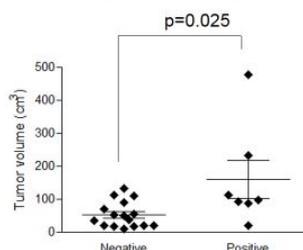
(3)肺癌手術標本のホルマリン固定標本で解析が可能であることが示されたため、ホルマリン固定標本を用いて、約 900 のマイクロRNAを網羅的に解析した。図のようなクラスター解析を行い、統合解析を行って、特異的なマイクロRNAを検出した。その結果、表のように5種類のマイクロRNAの上昇および5種類の低下を検出した。



(4) この結果を基に、血液での検出が可能

かどうか、バイオマーカーとしての可能性について検討を開始した。血液中の変異検出率を規定する因子は、腫瘍の体積であった。血液中での腫瘍由来の遺伝子解析では、手術の対象となるような早期の肺癌では、検出が困難であることが示された。

cfDNA 遺伝子変異と臨床背景 (Tumor volume)



血液内の遺伝子変異検出感度は、腫瘍量に相関した。

(5) 現在も、マイクロRNAは、早期の症例でも有効か研究を継続中である。肺癌治療成績を向上するようなバイオマーカー探索研究を今後も継続する予定である。

### 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 9 件)

Makino Y, Yoon JH, Bae E, Kato M, Miyazawa K, Ohira T, Ikeda N, Kuroda M, Mamura M. Repression of Smad3 by Stat3 and c-Ski/SnoN induces gefitinib resistance in lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Mar 4;484(2):269-277. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.093. (査読あり)

Ohira T, Sakai K, Matsubayashi J, Kajiwara N, Kakihana M, Hagiwara M, Hibi M, Yoshida K, Maeda J, Ohtani K, Nagao T, Nishio K, Ikeda N. Tumor volume determines the feasibility of cell-free DNA sequencing for mutation detection in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2016 Nov;107(11):1660-1666. doi: 10.1111/cas.13068. (査読あり)

Kudo Y, Matsubayashi J, Saji H, Akata S, Shimada Y, Kato Y, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Nagao T, Ikeda N. Association between high-resolution computed tomography findings and the IASLC/ATS/ERS classification of small lung adenocarcinomas in Japanese patients.

Lung Cancer. 2015 Oct;90(1):47-54. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.07.007. (査読あり)

Shimada Y, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Survival outcomes for oligometastasis in resected non-small cell lung cancer. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2015 Oct;23(8):937-44. doi: 10.1177/0218492315596463. (査読あり)

Kato Y, Nakamura H, Tojo H, Nomura M, Nagao T, Kawamura T, Kodama T, Ohira T, Ikeda N, Fehniger T, Marko-Varga G, Nishimura T, Kato H. A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-types. Clin Transl Med. 2015 Dec;4(1):64. doi:10.1186/s40169-015-0064-3. (査読あり)

Kudo Y, Shimada Y, Saji H, Kato Y, Yoshida K, Matsubayashi J, Nagase S, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Nagao T, Ikeda N. Prognostic Factors for Survival After Recurrence in Patients With Completely Resected Lung Adenocarcinoma: Important Roles of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status and the Current Staging System. Clin Lung Cancer. 2015 Nov;16(6):e213-21. doi: 10.1016/j.clcc.2015.04.005. (査読あり)

Shimada Y, Saji H, Otani K, Maehara S, Maeda J, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Akata S, Ikeda N. Survival of a surgical series of lung cancer patients with synchronous multiple ground-glass opacities, and the management of their residual lesions. Lung Cancer. 2015 May;88(2):174-80. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.02.016. (査読あり)

Oikawa T, Ohira T, Matsubayashi J, Konaka C, Ikeda N. Factors Influencing the Diagnostic Accuracy of Identifying the Histologic Type of Non--Small-Lung Cancer With Small Samples. Clin Lung Cancer. 2015 Sep;16(5):374-8. doi:10.1016/j.clcc.2015.03.007. (査読あり)

Oikawa T, Ohira T, Otani K, Hagiwara M, Konaka C, Ikeda N. Clinical usefulness of gefitinib for non-small-cell lung cancer with a double epidermal growth factor receptor mutation. Mol Clin Oncol. 2015 Mar;3(2):329-333. Epub 2014 Nov 10.

(査読あり)

[学会発表](計12件)

Ohira T, Matsubayashi J, Maehara S, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Okano T, Kajiwara N, Nagao T, Ikeda N Liquid based cytology (LBC) specimens were useful for EGFR mutation test. 18<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2017.10, Yokohama, Japan

Ohira T, Sakai K, Maehara S, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Okano T, Kajiwara N, Nishio K, Ikeda N The Feasibility of Cell-Free DNA Sequencing for Mutation Detection in Non-small Cell Lung Cancer was Determined by Tumor Volume, 17<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2016.12, Vienna, Austria

Ohira T, Matsubayashi J, Otani K, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ikeda N The specimen sampling and handling for tailor maid treatment of the lung cancer, the 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology, 2016.05, Yokohama, Japan

Ohira T, Otani K, Kataba H, Maehara S, Shimada Y, Maeda J, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ikeda N. Clinicopathological and biological characteristics of young age non-small cell lung cancer, 16<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer 2015.09, Denver, USA

Ohira T, Oikawa T, Otani K, Yoshida K, Kato Y, Maeda J, Hagiwara M, Nagase S, Kakihana M, Kajiwara N, Ikeda N Histological diagnosis of lung cancer using small biopsy, 18<sup>th</sup> WCBIP/WCBBE World Congress, 2014, Kyoto, Japan

大平 達夫、濱中和嘉子、松浦 久美、今井 健太郎、前原 幸夫、前田 純一、吉田 浩一、萩原 優、垣花 昌俊、梶原 直央、池田 徳彦 肺癌に対する網羅的遺伝子解析 第117回日本外科学会定期学術集会、2017 横浜

大平 達夫、坂井 和子、前原 幸夫、前田 純一、吉田 浩一、萩原 優、垣花 昌俊、岡野 哲也、松林 純、梶原 直央、長尾 俊孝、西尾 和人、池田 徳彦 肺癌手術患者に対するリキッドバイオプシーの有用性と限界 第57回日本肺癌学会学術集会、2016、福岡

大平 達夫、今井 健太郎、前原 幸夫、大谷 圭志、前田 純一、吉田 浩一、萩原

優、垣花 昌俊、岡野 哲也、梶原 直央、池田 徳彦 呼吸器内視鏡検査で得られた細胞診検体を用いた遺伝子解析の有用性 第 39 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、2016、名古屋

大平 達夫、今井 健太郎、前原 幸夫、大谷 圭志、前田 純一、吉田 浩一、萩原 優、垣花 昌俊、梶原 直央、池田 徳彦 分子生物学研究が呼吸器外科の治療にもたらすもの 第 33 回日本呼吸器外科学会総会、2016、京都

大平 達夫 東京医科大学における肺癌診療・研究の現状、第 4 回医薬工大学包括連携推進シンポジウム、2015、東京

大平 達夫、片場 寛明、大谷 圭志、前田純一、吉田 浩一、加藤 靖文、萩原 優、垣花 昌俊、長瀬 清亮、梶原 直央、池田 徳彦 肺癌薬物療法のための呼吸器内視鏡検査の重要性 第 38 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、2015、東京

大平 達夫、及川 武史、山口 学、加藤 靖文、前田 純一、吉田 浩一、萩原 優、垣花 昌俊、梶原 直央、筒井 英光、池田 徳彦 肺癌治療成績向上のためのバイオマーカー研究、第 10 回日本臨床プロテオーム研究会、2014、東京

〔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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

大平 達夫(OHIRA, Tatsuo)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40317847

(2) 研究分担者

池田 徳彦(IKEDA, Norihiko)  
東京医科大学・医学部・主任教授  
研究者番号：70246205

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )