

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10271

研究課題名(和文) miR-143に着目した肺癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Research and development of a new therapy for lung carcinoma focused on miR-143.

研究代表者

松林 純 (Matsubayashi, Jun)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00338790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子異常を有する肺腺癌に焦点を絞り、KRASを標的とするmiRNAを応用した新規治療法の開発が目的である。miRNAのデータベースより、KRASの3'-UTR領域に強く相互作用する可能性があるmiRNAの候補を探索し、miR-143を含む4種類のmiRNAを選び、KRAS変異ヒト肺腺がん細胞に導入し、細胞増殖実験を行った。個々のmiRNAを導入しても、KRASや細胞増殖に有意な影響はなかった。一方、4種類のmiRNA mimicsの導入により、24時間後にKRAS遺伝子の抑制が認められた。以上より、複数のmiRNAの作用により、ヒト肺腺がん細胞におけるKRAS発現の抑制が示された。

研究成果の概要(英文)：In our study, we focused on lung adenocarcinoma with the KRAS mutation to identify a new therapy for KRAS-mutated lung adenocarcinoma using miRNA to target KRAS. We examined the miRNAs correlated to the 3'-untranslated region of KRAS from the miRNA database. Among these miRNAs, we focused on four in particular, including miR-143. We analyzed the expressions of KRAS and these miRNAs in a human adenocarcinoma cell line by transfection of each of the four miRNAs mimics. Although the expression of KRAS in the lung adenocarcinoma cell line was not knocked down by transfection of any of these mimics, the expression was knocked down by transfection of a mixture of the four mimics.

研究分野：病理学

キーワード：肺腺癌 miRNA KRAS

### 1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌には従来の治療に抵抗性を示す予後不良な症例が多く、その病態の解明および新規治療法の確立が急がれる。EGFR や ALK 遺伝子に変異のある症例に対しては、新規の分子標的治療法が開発され、従来の化学療法と比較して著効例が多い。しかしながら、原発性肺腺癌において、遺伝子異常の頻度が比較的高い KRAS に対しては、分子標的治療法は確立していない。一方で、これまで我々は原発性肺癌の画像を含む臨床像と病理像の対比を含み、臨床病理学的な研究を行い、肺癌の病態の解明に寄与してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、KRAS 遺伝子異常をきたす原発性肺腺癌に焦点を絞り、KRAS を標的とする miRNA を応用した、新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

肺癌外科材料や動物を用いた研究を行う前に、ヒト肺腺癌細胞を用いた生化学的実験を行った。ヒト肺腺癌細胞における、miR-143 による KRAS への影響を調べるために必要な条件検討を行った。はじめに KRAS 発現量を qPCR により求める条件検討をするとともに、real time 定量的 PCR を用いた KRAS 変異型の簡易検出方法の確立を行った。また、miRNA による KRAS の活性化や不活性化を検出するために、下流経路である Raf、MEK、ERK の活性化をウエスタンブロット解析により検出する条件検討を行い、これらの分子の活性化を検出する条件を最適化した。さらに miRNA のデータベースを検索し、miR-143 以外の miRNA で KRAS の 3'-UTR 領域に相互作用する可能性がある miRNA の候補を探した。

データベースの検索結果をもとに、KRAS の 3'-UTR 領域に相互作用する可能性がある miRNA の候補のうち、miR143 を含む 4 種類の miRNA に着目して、ヒト肺がん細胞を用いた生化学的

な実験を行った。具体的には、KRAS 変異を有するヒト肺腺がん細胞である A549 細胞 (KRAS の配列 12 残基目に変異あり Gly Ser) と KRAS 変異のない A549-1 細胞に、miR143 を含む 4 種類の miRNA mimic を Lipofectamine RNAiMAX でトランスフェクションし、24 時間後と 48 時間後に全 RNA を抽出した。全 RNA を逆転写して cDNA を調製した後、この cDNA を鋳型 DNA として、KRAS、Cyclin D1、Cyclin D2、Cyclin D3、Cyclin E1、Ki-67、p21 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で解析した。さらに 96 穴プレートに細胞を 500 ~ 1000/well ずつ播種し、miRNA mimic をトランスフェクションして、7 日目まで経時的に細胞数を定量し、miRNA が細胞増殖へ与える影響を調べた。細胞数の定量は Cell Counting Kit-8 を用いた。

肺癌外科材料を用いた研究に先駆けて、当院呼吸器外科で切除された肺癌手術検体について、肺腺癌の病変の局在 (中枢型・末梢型)、大きさ、組織亜型、分化度、血管侵襲、リンパ管侵襲、胸膜浸潤、肺内転移、胸膜播種、病理病期を主体として、データベースを作成した。特に、病理組織診断については、予後などの臨床病理学的な要素を加味して作成した。

### 4. 研究成果

miRNA のデータベースを検索し、miR-143 以外の miRNA で KRAS の 3'-UTR 領域に相互作用する可能性がある miRNA の候補の探索の結果、KRAS の 3'-UTR と良い相補性を示す 61 種類の miRNA の候補及び 257 種の相互作用する可能性がある miRNA の候補を見出すことができた。これらの候補のうち相補性が高く、相互作用する可能性が高い miRNA がいくつかみられたが、これまでに KRAS 発現を抑制することが報告されている miRNA とは必ずしも一致していなかった。このことは、これまで報告にあった miRNA 以外にも、KRAS とより強く相互作用する効果的な miRNA が存在する可能性を示すものと判断した。

KRAS変異を有するヒト肺腺がん細胞である A549細胞を用いて、4種類のmiRNA mimicをトランスフェクションして、細胞増殖に与える影響についての実験結果は、いずれのmiRNAをトランスフェクションしても、明らかな増殖速度とKRASへの影響は認められなかった。1種類のmiRNAのみ、顕著な増殖抑制が認められたが、KRAS発現はわずかに抑制されていた程度で顕著ではなかった。また、いずれのmiRNAをトランスフェクションしても、Cyclin D1、Cyclin D2、Cyclin D3、Cyclin E1、Ki-67、p21遺伝子の発現量に有意な変化は認められなかった。

一方で、4種類のmiRNA mimics をトランスフェクションした時は、KRAS遺伝子の抑制が認められ、p21遺伝子の上昇とKi-67の減少が認められた。以上の結果から複数のmiRNAを作用させることにより、KRAS発現を抑制すると共に細胞増殖に影響がある可能性が示唆された。

肺癌外科材料を用いた研究に先駆けて、当院呼吸器外科で切除された肺癌手術検体について、肺腺癌の病変の局在（中枢型・末梢型）、大きさ、組織亜型、分化度、血管侵襲、リンパ管侵襲、胸膜浸潤、肺内転移、胸膜播種、病理病期を主体として、データベースを作成した。特に、病理組織診断については、予後などの臨床病理学的な要素が加味されている2015年に刊行された新WHO分類第4版及びそれに準拠して作成された肺癌取り扱い規約第8版に基づいて、過去10年に遡り、再度診断した。今後は、4種類のmiRNAを用いた肺がん細胞を用いた実験をさらに進めるとともに、肺癌切除材料でのKRASやKRASとの関連の強いmiRNAの発現量を検索したい。さらに、将来的には動物実験にも発展させたい。

##### 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7件）

Shigefuku S, Kudo Y, Yunaiyama D, Matsubayashi J, Park J, Nagao T, Shimada Y, Saji H, Hagiwara M, Okano T, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Prognostic factors for surgically resected non-small cell lung cancer with cavity formation, Journal of Thoracic Disease、査読あり、10巻、2018、973-983  
DOI: 10.21037/jtd.2018.01.61.

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 Science、査読あり、106、2018、1660-1666  
DOI: 10.1111/cas.13068.

Shimada Y, Saji H, Kato Y, Kudo Y, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Matsubayashi J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. The Frequency and Prognostic Impact of Pathological Microscopic Vascular Invasion According to Tumor Size in Non-Small Cell Lung Cancer. Chest、査読あり、2016、149、775-785  
DOI: 10.1378/chest.15-0559.

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, Clinical Lung Cancer、査読あり、16、2015、374-378  
DOI: 10.1016/j.clcc.2015.03.007.

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. *Clinical Lung Cancer*, 査読あり、  
16、2015、e213-221  
DOI: 10.1016/j.clcc.2015.04.005.

Saji H, Matsubayashi J, Akata S, Shimada Y,  
Kato Y, Kudo Y, Nagao T, Park J, Kakihana  
M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N.  
Correlation between whole tumor size and  
solid component size on high-resolution  
computed tomography in the prediction of  
the degree of pathologic malignancy and the  
prognostic outcome in primary lung  
adenocarcinoma. *Acta Radiologica*, 査読あり、  
56、2015、1187-1195  
DOI: doi: 10.1177/0284185114554823.

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*, 査読あり、90、2015、47-54  
DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.07.007.

〔学会発表〕(計14件)

坂井和子、西尾和人、大平達夫、松林純、  
梶原直央、垣花昌俊、萩原優、吉田浩一、  
前田純一、大谷圭志、池田徳彦、長尾俊孝。  
比較的早期の肺癌患者由来 cell free DNA  
の体細胞遺伝子変異検出率の臨床病理学的  
規定因子の検討。日本肺癌学会学術集会、  
2017年10月、横浜

前田純一、濱中和嘉子、吉田浩一、垣花昌  
俊、梶原直央、大平達夫、三宅真司、松林  
純、長尾俊孝、池田徳彦。肺がんの新分類  
と予後 肺がん新分類と予後 臨床データ  
の比較と応用。日本臨床細胞学会。2017年  
5月、大阪

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。Liquid Biopsy 効率的な遺伝子  
診断を目指して 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。日  
本肺癌学会学術集会、2016年12月、福岡

眞田知英、朴辰浩、齋藤和博、徳植公一、  
池田徳彦、松林純、長尾俊孝。肺多形癌の  
CT形態の検討。第59回日本肺癌学会学術  
集会、2016年12月、福岡

田中健彦、吉田浩一、工藤勇人、朴辰浩、  
松林純、牧野洋二郎、荒牧直、萩原優、岡  
野哲也、垣花昌俊、梶原直央、大平達夫、  
池田徳彦。すりガラス成分を有する肺腺癌  
における3D-CT画像と組織学的脈管侵襲の  
関係。日本呼吸器外科学会。2016年5月、  
福岡

江里口大介、大谷圭志、工藤勇人、松林純、  
萩原優、岡野哲也、垣花昌俊、梶原直央、  
大平達夫、池田徳彦。浸潤性粘液産生性腺  
癌における術後再発の検討。日本呼吸器外  
科学会。2016年5月、福岡

三宅真司、松林純、前田純一、垣花昌俊、  
大平達夫、池田徳彦、長尾俊孝。肺腺癌に  
おけるWHO新分類に基づいた細胞像。日本  
臨床細胞学会秋期大会。2015年11月、名  
古屋

荒牧直, 嶋田善久, 松林純, 川本雅司, 朴辰浩, 吉村明修, 赤田壮一, 長尾俊孝, 徳植公一, 池田徳彦. 間質性肺炎合併肺癌における画像所見及び臨床像と病理所見の整合性に関する検討. 日本肺癌学会学術集会, 2015年11月, 横浜

江里口大介, 工藤勇人, 嶋田善久, 松林純, 山田隆文, 朴辰浩, 大澤潤一郎, 加藤靖文, 垣花昌俊, 前田純一, 吉田浩一, 萩原優, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 浸潤性粘液産生性腺癌切除例のCT所見とその特徴. 日本肺癌学会学術集会, 2015年11月, 横浜

垣花昌俊, 名和公敏, 前田純一, 吉田浩一, 萩原優, 長瀬清亮, 加藤靖文, 松林純, 梶原直央, 大平達夫, 長尾俊孝, 池田徳彦. 開胸時胸腔細胞診陽性症例の臨床病理学的検討. 日本肺癌学会学術集会, 2015年11月, 横浜

工藤勇人, 松林純, 赤田壮一, 嶋田善久, 雨宮亮介, 加藤靖文, 垣花昌俊, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 小型肺腺癌におけるHRCT所見とIASLC/ATS/ERS分類を用いた臨床病理学的因子の関係. 日本肺癌学会学術集会, 2015年11月, 横浜

Kudo Y, Shimada Y, Amemiya R, Maeda J, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Matsubayashi J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Impact of lymph node involvement on survival in patients with completely resected pulmonary squamous cell carcinoma. 16th World Conference on Lung Cancer. 2015年9月, Denver, USA

Kudo Y, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K,

Matsubayashi J, Nagase S, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Nagao T, Ikeda N. The 61st Annual Congress of International College of Surgeons Japan Section. 2015年6月, Tokyo

Kudo Y, Matsubayashi J, Shimada Y, Akata S, Kato Y, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Nagao T, Ikeda N. Correlation between high-resolution computed tomography findings and IASLC/ATS/ERS classification of small lung adenocarcinomas in Japanese patients. 2015 The American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting. 2015年6月, Chicago, USA

〔図書〕(計 1件)  
松林純他、金原出版、細胞診ガイドライン 4 呼吸器・胸腺・体腔液・リンパ節、2015年、264ページ  
〔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  
松林 純 (MATSUBAYASHI, Jun)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00338790

(2)研究分担者

大平 達夫 (OHIRA, Tatsuo)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：4 0 3 1 7 8 4 7

池田 徳彦 (IKEDA, Norihiko)  
東京医科大学・医学部・主任教授  
研究者番号：7 0 2 4 6 2 0 5

高梨 正勝 (TAKANASHI, Masakatsu)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：8 0 3 1 2 0 0 7

岩館 寛大 (IWADATE, Hiromoto)  
山陽小野田市立山口理科大学・工学部・准  
教授  
研究者番号：7 0 2 7 9 1 0 7

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )