

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19458

研究課題名(和文) 肺線維症・肺癌に共通する機能性RNA分子ネットワークの探索と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the common RNA networks in lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis for the new strategy of the diseases.

研究代表者

俣木 浩子(MATAKI, Hiroko)

鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号：60750750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症は高頻度に肺癌を合併するが、その治療法は限定されており、早期発見、新規治療の開発が望まれている。本研究では、microRNA(miRNA)に着目し、両疾患の病態に關与する分子ネットワークの探索を行った。肺癌合併特発性肺線維症の臨床検体でmiRNAの発現を解析したところ、線維化部位、肺癌部位のmiRNA-29a(miR-29a)の発現が低下していた。miR-29aは肺癌細胞株、肺線維芽細胞株の増殖、遊走を抑制した。さらに、ゲノム科学的手法によりmiR-29aはLOXL2、SERPINH1を抑制することを明らかにした。両分子は本病態の解明に關与する重要な糸口となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is frequently associated with lung cancer. However, the curative treatment has not been developed for the disease. We investigated novel RNA networks mediated by miRNAs, and identified the molecular targets involved in the pathology of the disease.

We confirmed the downregulation of miR-29a in clinical specimens of IPF and lung cancer. Restoration of miR-29a suppressed cancer cell aggressiveness and fibroblast migration. A combination of gene expression data and in silico analysis showed that lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and serpin peptidase inhibitor clade H, member 1 (SERPINH1) were direct targets of miR-29a, suggesting that these genes are involved in the pathogenesis of these two diseases.

研究分野：肺癌

キーワード：microRNA 肺癌 特発性肺線維症

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性炎症性肺疾患である特発性肺線維症は高頻度に肺癌を合併する。慢性炎症の分子シグナルが癌を誘発する可能性があるが、肺の線維化から癌化への移行機序は明らかではない。肺線維症を併発した肺癌の治療は限定されており、早期発見、新規治療の開発に繋がる両者の病態解明が望まれている。

(2) 近年、蛋白をコードしない microRNA (miRNA) の存在が明らかとなった。miRNA は、数多くの蛋白コード遺伝子を制御しており、miRNA 発現の変化は様々な疾患に関与している。申請者らは、肺癌の miRNA 解析から、「癌抑制性 miRNA」の探索と、miRNA が制御する機能性 RNA (蛋白コード遺伝子、非コード遺伝子) 分子ネットワークの探索を行ってきた。

近年の研究において、肺癌の癌抑制性 miRNA の中より細胞外マトリックスに関連する遺伝子群を制御する miRNA があることが明らかになった。さらに、これら「癌抑制性 miRNA」は、特発性肺線維症の病変部においても発現抑制されていることが判明し、両者の病態に関わる分子ネットワークの存在が示唆されている。

2. 研究の目的

肺癌「癌抑制性 miRNA」と肺癌合併肺線維症における miRNA 発現プロファイルを起点として、特発性肺線維症・肺癌に共通する機能性 RNA 分子探索し、両者の病態に関わる分子経路を明らかにする。

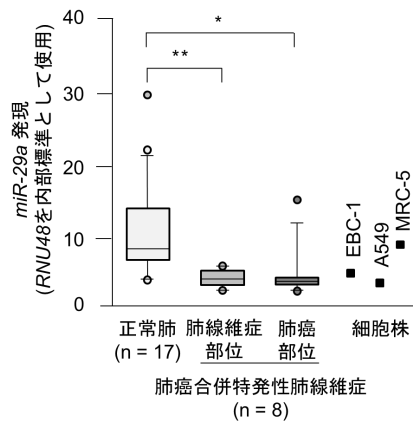
3. 研究の方法

(1) 肺癌合併肺線維症の線維化病変・癌部より抽出した RNA より線維化病変・癌部で共通して発現が変動している miRNA を探索し、機能解析を行う。

(2) さらに、疾患に関与する miRNA については、ゲノム科学的手法により、miRNA が制御する分子経路を明らかにする。

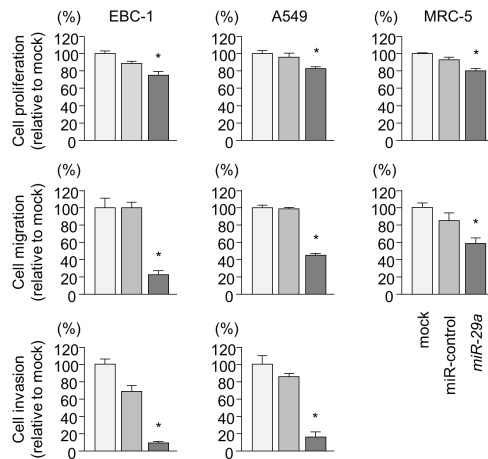
4. 研究成果

(1) 肺癌合併特発性肺線維症 8 検体、正常肺 17 検体から RNA を抽出し、qRT-PCR 法で miRNA の発現を解析した。その結果、正常肺組織と比較して、線維化部位、肺癌部位における *microRNA-29a* (*miR-29a*) の発現低下を確認した。



臨床検体及び細胞株における *miR-29a* の発現解析

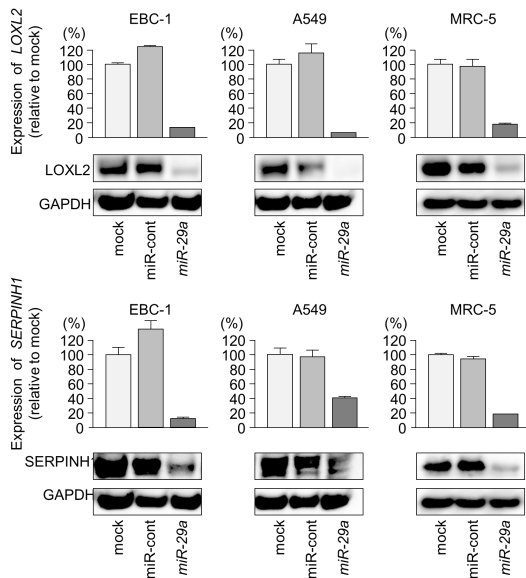
(2) 肺扁平上皮癌細胞株 (EBC-1)、肺腺癌細胞株 (A549) および肺線維芽細胞株 (MRC-5) に *miR-29a* を導入し機能解析を行った。*miR-29a* の核酸導入により、肺癌細胞 (EBC-1、A549) の増殖、遊走、浸潤および肺線維芽細胞 (MRC-5) の増殖および遊走が抑制された。さらに、*miR-29a* 阻害薬の核酸導入により、肺癌細胞の増殖、遊走、浸潤が亢進した。以上の結果より *miR-29a* は肺癌細胞、肺線維芽細胞に対し病態進行に関与する重要な miRNA であることが示唆された。



miR-29a 導入細胞の機能解析

(3) 公共のデータベース (TargetScan、Gene Expression Omnibus) と *miR-29a* 導入細胞の遺伝子発現データ (マイクロアレイ解析) を統合し、*miR-29a* の標的遺伝子として *LOXL2* と *SERPINH1* を選出した。

(4) 細胞株に *miR-29a* を導入し qRT-PCR 法で *LOXL2* と *SERPINH1* の発現を確認したところ、両者の発現が低下した。また、*miR-29a* 阻害薬を導入したところ、両者の発現が亢進した。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより *miR-29a* は *LOXL2* と *SERPINH1* を直接制御することを明らかにした。



miR-29a 導入細胞における LOXL2、SERPINH1 の発現解析

(5) LOXL2、SERPINH1 は、肺癌合併特発性肺線維症臨床検体の肺線維症部位と肺癌部位で高発現していることを免疫組織化学的検討で確認した。

LOXL2 は lysyl oxidase family に属す酵素であり、組織の維持と恒常性に関与する。細胞外マトリックスの構成成分であるコラーゲンとエラスチンの架橋反応を触媒する酵素として知られており、細胞内では遺伝子の発現制御にも関わる重要な分子である。LOXL2 は転写因子である Snail を安定化し E-Cadherin の発現を抑制する。またヒストン H3K4 のトリメチル化状態の脱アミノ化反応を制御することによっても E-cadherin 発現を抑制し、上皮間葉転換にも関わることが報告されている。以上のように LOXL2 はさまざまな分子との相互作用を介して、線維化の促進や癌の悪性化に重要な役割を持つことが示唆される。また、SERPINH1 はコラーゲンに特異性を持った分子シャペロンで異常コラーゲンによる凝集体形成を阻害する。正常組織だけではなく、コラーゲンの異常蓄積が引き起こされる種々の線維化疾患の進展や悪性疾患との関連も報告されている。LOXL2 と SERPINH1 は線維化の促進や悪性疾患に関与との関連が報告されている重要な細胞外マトリックス分子であり、特発性肺線維症と肺癌の両病態の進展に深く関与している可能性を示した。

この様に、特発性肺線維症・肺癌に特徴的な miRNA を起点として、これら疾患で活性化している分子経路を探索することは、病態解明に関わる重要な早期発見や新規治療薬に繋がるものと考えられる。

< 引用文献 >

Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by antitumor microRNA-29a in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis.

Kamikawaji K, Seki N, Watanabe M, Mataka H, Kumamoto T, Takagi K, Mizuno K, Inoue H. J Hum Genet. 2016 Dec;61(12):985-993.

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) すべて査読有

Mizuno K, Mataka H, Seki N, Kumamoto T, Kamikawaji K, Inoue H.

MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis.

J Hum Genet. 2017;62(1):57-65.

doi: 10.1038/jhg.

Mizuno K, Mataka H, Arai T, Okato A, Kamikawaji K, Kumamoto T, Hiraki T, Hatanaka K, Inoue H, Seki N.

The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes.

J Hum Genet. 2017;62(7):671-678.

doi: 10.1038/jhg.

Mataka H, Seki N, Mizuno K, Nohata N, Kamikawaji K, Kumamoto T, Koshizuka K, Goto Y, Inoue H.

Dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p) coordinately targeted MTDH in lung squamous cell carcinoma.

Oncotarget. 2016;7(44):72084-72098.

doi: 10.18632/oncotarget.

Kamikawaji K, Seki N, Watanabe M, Mataka H, Kumamoto T, Takagi K, Mizuno K, Inoue H.

Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by antitumor microRNA-29a in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis.

J Hum Genet. 2016 Dec;61(12):985-993.

doi: 10.1038/jhg.

Kumamoto T, Seki N, Mataka H, Mizuno K, Kamikawaji K, Samukawa T, Koshizuka K, Goto Y, Inoue H.

Regulation of TPD52 by antitumor microRNA-218 suppresses cancer cell migration and invasion in lung squamous cell carcinoma.

Int J Oncol. 2016;49(5):1870-1880.

doi: 10.3892/ijo.

〔学会発表〕(計 3 件)

俣木浩子

Downregulation of the microRNA-1/133a cluster enhances cancer cell migration and invasion in lung-squamous cell carcinoma via regulation of Coronin1C

日本人類遺伝学会第 62 回大会、2017 年

俣木浩子

Tumor-suppressive microRNAs modulate oncogenic signaling pathways in lung squamous cell carcinoma

American Thoracic Society、2016 年

俣木浩子

肺扁平上皮癌における腫瘍抑制性 microRNA-145-5p/3p に関する検討

第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016 年

〔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

俣木 浩子 (Mataki Hiroko)

鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号：60750750

(2)研究分担者

(3)連携研究者

関 直彦 (Seki Naohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

(4)研究協力者

井上 博雅 (Hiromasa Inoue)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30264039

水野 圭子 (Keiko Mizuno)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50531414

隈元 朋洋 (Kumamoto Tomohiro)

鹿児島大学・附属病院・特任助教

研究者番号：20622517

上川路 和人 (Kamikawaji Kazuto)

鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号：80633396