

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09660

研究課題名(和文) 機能性RNAネットワーク解析に基づく治療抵抗性小細胞肺癌の革新的治療法開発

研究課題名(英文) Development of innovative therapy for treatment-resistant small cell lung cancer based on functional RNA network analysis

研究代表者

隈元 朋洋 (KUMAMOTO, TOMOHIRO)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教

研究者番号：20622517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：化学療法または化学放射線療法後に治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌に対する治療効果は限定的である。小細胞肺癌に対して有効性が証明されている分子標的薬剤は現時点で存在しない。そのため、小細胞肺癌に対する治療において、治療抵抗性の克服は非常に大きな課題である。今回我々は剖検検体を用いて、治療抵抗性に至った小細胞肺癌のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。マイクロRNAを起点とした解析から、miR-30a-3pおよびその標的遺伝子であるDONSONは、治療抵抗性に至った小細胞肺癌の病勢において重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法または化学放射線療法後に治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌に対する治療効果は限定的である。小細胞肺癌に対して有効性が証明され、適応がある分子標的薬剤は存在しない。本研究では、小細胞肺癌の剖検検体から、治療抵抗性に至った小細胞肺癌のマイクロRNA発現プロファイルを作成し、マイクロRNAを起点とした解析を行った。同様の研究を継続していくことにより、治療抵抗性に至った小細胞肺癌について、新規の治療標的が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic efficacy of small cell lung cancer (SCLC) that has acquired treatment resistance after chemotherapy or chemoradiotherapy is limited. There are currently no molecular targeted drugs which were proven efficacy for SCLC. Therefore, overcoming the treatment resistance is a very big challenge in the treatment of SCLC.

In this study, we prepared a microRNA expression profile of treatment-resistant SCLC using autopsy samples. microRNA-based approach for SCLC showed that miR-30a-3p/DONSON axis plays pivotal roles in the pathogenesis of treatment-resistant SCLC.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：治療抵抗性 小細胞肺癌 マイクロRNA DONSON

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

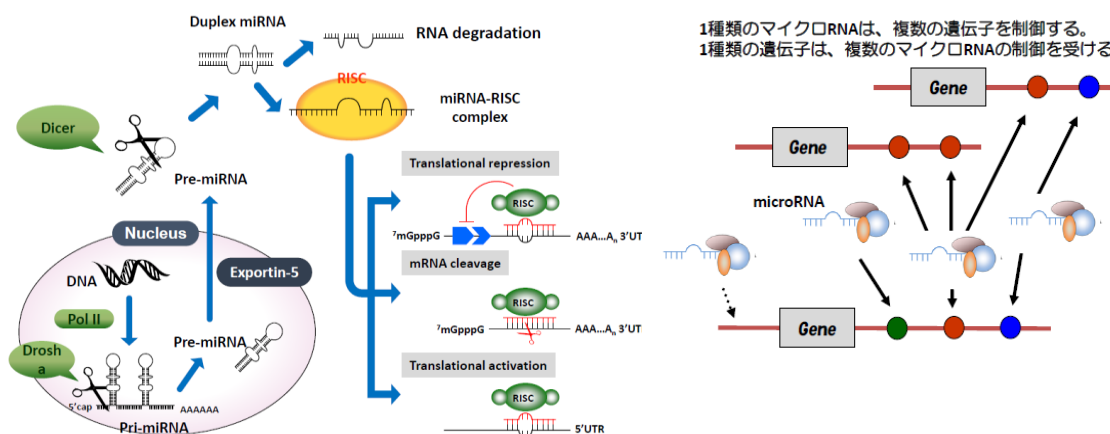
(1-1) 治療抵抗性小細胞肺癌の臨床的背景

小細胞肺癌は、肺癌全体の 15%~20% を占める癌であるが、癌細胞の増殖能と転移能は驚くほど高く、初診時に外科的治療が適応となる症例は極めて稀である。切除不能症例に対して化学療法あるいは化学放射線療法が検討されるが、初回の治療反応性は良好である。しかしながら、治療反応性が良好の症例においても、ほぼ全ての症例で再発がみられる。初回治療反応が良好であり、治療終了後 60~90 日以上経過して再発を認めた **sensitive relapse** は、再発時の治療反応が良く生存期間が長い事が報告されている。一方、治療終了後 60~90 日未満の再発である **refractory relapse** に対する有効な治療法は少なく、患者の予後は極めて厳しい。9 つの臨床試験の解析から、日本人の **refractory relapse** に対する **amrubicin** 単剤の効果は奏効率 38%、1 年生存率 34% と報告されており、満足できる治療ではない。近年、開発が相次いでいる分子標的治療薬についても、現時点では小細胞肺癌に対して有効性が証明され、適応がある薬剤は存在しない。また、免疫チェックポイント阻害薬である **atezolizumab** を含む化学療法についても、化学療法歴のない進展型小細胞肺癌患者に対する有効性が示されているが、再発症例についてガイドラインで推奨されている治療法は存在しない。

本疾患の新規治療法の開発には、治療抵抗に至った癌細胞内で起こっている変化を、最新のゲノム科学的手法で解析する必要がある。しかしながら、小細胞肺癌の再発部位や遠隔転移部位の検体を得る事は困難であり、本疾患のゲノム解析は十分に行われていない現状がある。

(1-2) マイクロ RNA 研究の背景

ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒト細胞中には極めて多くの蛋白に翻訳されない RNA 分子が転写されている事が明らかとなった。これらの RNA 分子は、RNA 分子のまま、生体内で様々な機能を有している事が解明されている (機能性 RNA)。機能性 RNA の 1 種であるマイクロ RNA は、僅か 19~22 塩基の低分子 RNA である。この RNA 分子は、最終的に 1 本鎖の RNA 分子として機能し、蛋白コード遺伝子の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御に関連している。マイクロ RNA の生物学的な特徴として、1 種類のマイクロ RNA は、数十~数百種類の蛋白コード遺伝子の発現を制御しているため、細胞内ではマイクロ RNA-機能性 RNA の極めて複雑な分子ネットワークが形成されている。ヒトゲノム中の 60% の蛋白コード遺伝子は、マイクロ RNA による発現制御を受けている。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、細胞内の RNA 分子ネットワークの破綻を引き起こし、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している。癌研究におけるマイクロ RNA の研究が進んでおり、癌細胞で発現異常を認めるマイクロ RNA を指標にした解析が相次いで報告されている。



2. 研究の目的

本研究の目的は、小細胞肺癌の治療抵抗性に関わる分子や分子経路を、マイクロ RNA を起点として明らかにし、更に増殖や転移を抑制する治療戦略を考案することである。

3. 研究の方法

化学療法後に治療抵抗性に至った小細胞肺癌の臨床検体から全 RNA を抽出し、治療抵抗性・小細胞肺癌マイクロ RNA 発現プロファイルを作成する。最近の我々の研究において、マイクロ RNA のガイド鎖だけでなく、パッセンジャー鎖も癌細胞において癌抑制的、もしくは癌促進的に機能していることを明らかにしてきた。本研究では、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖の双方で発現が抑制されているマイクロ RNA に焦点を当てた。プロファイルに基づき、双方の strand で発現が抑制されているマイクロ RNA を選出し、機能解析を施行する。更に、機能が明らかになったマイクロ RNA を起点として、小細胞肺癌細胞の機能性 RNA ネットワークの探索を行う。これらの研究から、治療抵抗性・小細胞肺癌において活性化している分子経路を見出す。

① 治療抵抗性に至った小細胞肺癌の臨床検体から抽出した全 RNA の網羅的解析を行い、治療

- 抵抗性に至った小細胞肺癌のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成する。
- ② 癌部で双方の strand の発現が抑制されているマイクロ RNA を選出し、マイクロ RNA を核酸導入した小細胞肺癌の細胞株 (SBC-3 および H82) で、機能解析を行う。
 - ③ マイクロ RNA を核酸導入した小細胞肺癌の細胞株を用いて網羅的解析を行い、治療抵抗性に至った小細胞肺癌において、マイクロ RNA に制御され、癌促進に関連する機能性 RNA ネットワークを探索する。
 - ④ 候補に挙げられた遺伝子の siRNA を小細胞肺癌の細胞株に核酸導入し、機能解析を行う。
 - ⑤ マイクロ RNA が制御する標的分子について免疫染色にて癌部における蛋白発現を確認する。

4. 研究成果

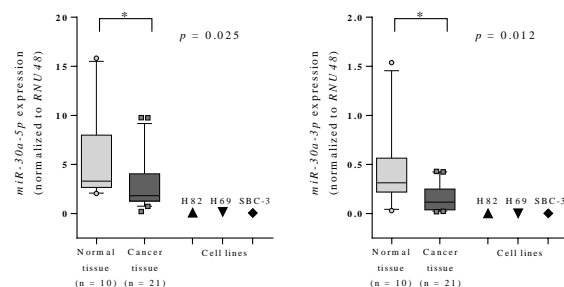
(4-1) 治療抵抗性に至った小細胞肺癌のマイクロ RNA 発現プロファイルの作成

治療抵抗性に至った小細胞肺癌として、化学療法後に再発し、肺癌の進行により死亡した小細胞肺癌 3 症例の剖検検体 (正常肺、原発巣、肝転移、リンパ節転移) を用いた。剖検検体から全 RNA を抽出し、癌 vs 非癌で網羅的解析を行った。このうち、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖の双方で発現が抑制されている microRNA-30a-5p (以下 miR-30a-5p: ガイド鎖)、microRNA-30a-3p (以下 miR-30a-3p: パッセンジャー鎖) に焦点を当てた。

miRNA	miRBase accession No.	logFC	logCPM	PValue	FDR
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	-4.60947	5.464929	6.06E-05	0.019512
hsa-miR-4529-5p	MIMAT0019236	-3.96184	1.976329	1.76E-05	0.011361
hsa-miR-218-1-3p	MIMAT0004565	-3.26739	3.935699	1.58E-05	0.011361
hsa-miR-223-5p	MIMAT0004570	-3.09662	2.875787	5.98E-05	0.019512
hsa-miR-29c-5p	MIMAT0004673	-2.95622	6.938944	0.000135	0.029084
hsa-miR-4529-3p	MIMAT0019068	-2.88865	1.405781	0.004831	0.180239
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	-2.70377	11.47824	0.001288	0.124712
hsa-miR-100-3p	MIMAT0004512	-2.59014	3.595278	0.00044	0.087165
hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	-2.36062	5.797823	0.031947	0.424285
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	-2.25661	15.38075	0.008852	0.24257
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	-2.1452	11.75638	0.002046	0.13512
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-2.12927	7.505559	0.003442	0.152879
hsa-miR-145-3p	MIMAT0004601	-2.01476	6.670917	0.005194	0.183301
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	-1.93732	13.44148	0.025279	0.3679
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	-1.6648	8.711332	0.01798	0.321637
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-1.60488	8.76296	0.013826	0.28956
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	-1.55809	4.680306	0.027251	0.383603
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	-1.48648	8.452628	0.03324	0.424285
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	-1.46221	13.06834	0.020556	0.337613
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	-1.32654	9.447933	0.014875	0.292499

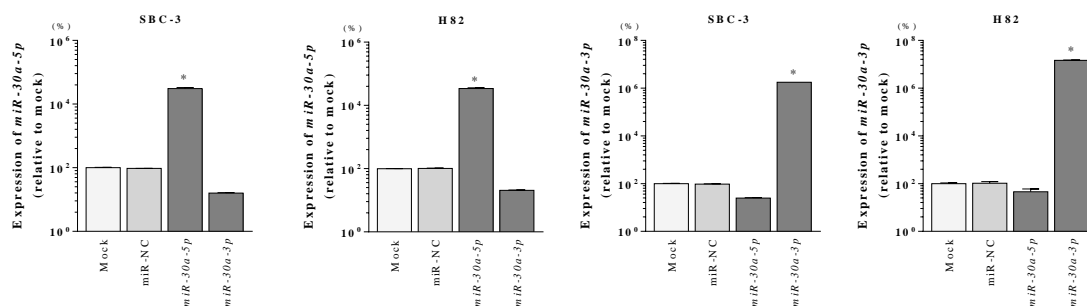
(4-2) 小細胞肺癌の臨床検体における miR-30a-5p/3p 発現の確認

小細胞肺癌の臨床検体から抽出した全 RNA を用いて qRT-PCR を行い、癌部および小細胞肺癌の細胞株において、miR-30a-5p/3p の発現が低下していることを確認した。



(4-3) RNA 誘導サイレンシング複合体への miR-30a-5p/3p の取り込み

Ago2 を標的とする抗体を用いて免疫沈降法を行い、miRNA-30a-5p/3p が RNA 誘導サイレンシング複合体に取り込まれることを確認した。

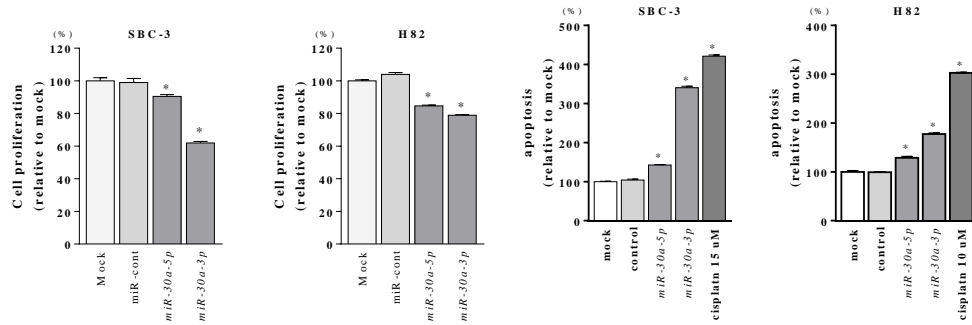


(4-4) miR-30a-5p/-3p の機能解析

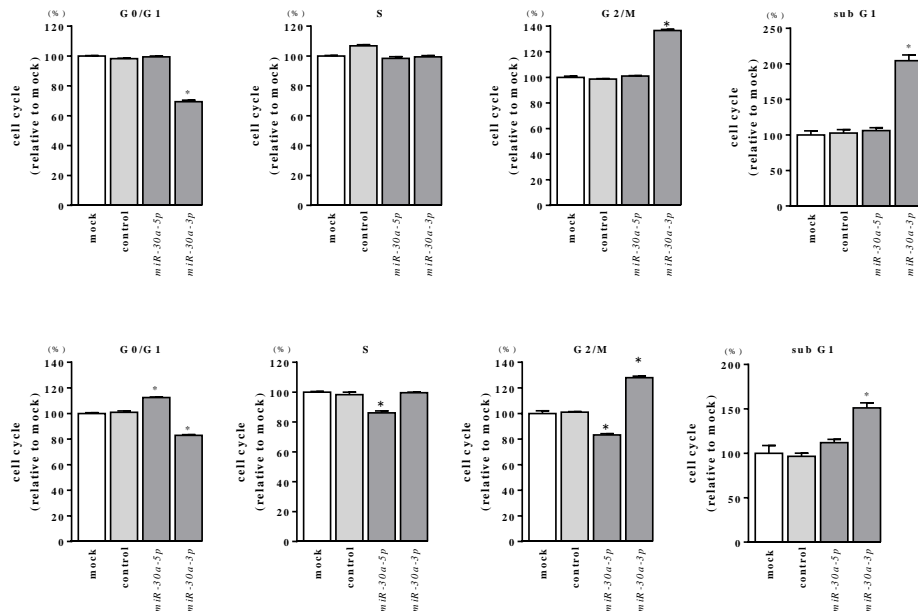
miR-30a-5p/-3p を核酸導入した小細胞肺癌の細胞株を用いて、XTT assay、apoptosis assay、cell cycle assay を行い、特に miR-30a-3p を拡散導入した細胞株において、細胞増殖およびアポトーシスは抑制され、G2/M 期で細胞周期をとめていることを確認した。そのため、miR-30a-3p について更なる検討を行うこととした。

[XTT assay]

[Apoptosis assay]



[Cell cycle assay (上段/下段 : SBC-3/H82)]



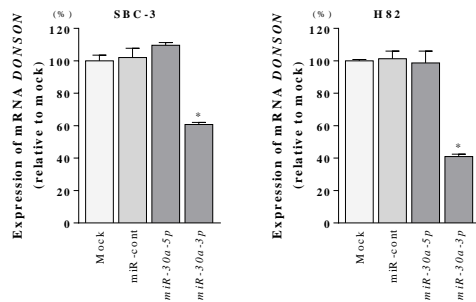
(4-5) miR-30a-3p が制御する RNA ネットワークの探索

miR-30a-3p を核酸導入した SBC-3 から全 RNA を抽出し、miR-30a-3p vs mock で網羅的解析を行った。このうち、他部位の癌において癌促進作用が示されている downstream neighbor of SON (DONSON) に着目した。

Target gene	Repressi	Gene no.	3P-seq	Total si	8mer si	7mer-n	7mer-A	6mer si	Repressi	Cumula	Total ci	Aggreg	[(2) SBC 30a MO	sek ALL Fold Cha	
NOL4	ENST000	nucleolar	12	2	0	1	1	1	0	hsa-miR- ζ	-0.07	-0.07	N/A	-0.5964422	4.0584574
GNGT1	ENST000	guanine nu	5	3	1	1	0	1	0	hsa-miR- ζ	-0.77	-0.77	N/A	-1.0533572	3.999456923
RGS17	ENST000	regulator c	11	1	1	0	0	0	1	hsa-miR- ζ	-0.02	-0.03	N/A	-0.7935434	3.45924572
OIP5	ENST000	Opa intere	178	2	0	0	0	2	1	hsa-miR- ζ	-0.24	-0.24	N/A	-0.78998334	3.30922286
CNTNAP2	ENST000	contactin	29	1	0	0	0	1	2	hsa-miR- ζ	-0.06	-0.06	N/A	-1.5012078	3.151693785
HOXB8	ENST000	homeobox	9	1	0	0	0	1	0	hsa-miR- ζ	-0.01	-0.01	N/A	-0.9640622	3.02659543
CXXC4	ENST000	CXXC ring	121	2	0	1	1	0	0	hsa-miR- ζ	-0.06	-0.08	N/A	-0.5963269	2.7183493
RBFOX1	ENST000	RNA bindi	5	1	0	0	0	1	1	hsa-miR- ζ	0	-0.09	N/A	-0.6234554	2.70520584
STXBPSL	ENST000	syntaxin b	19	1	0	1	0	0	5	hsa-miR- ζ	-0.02	-0.02	N/A	-0.81205463	2.54876107
DONSON	ENST000	downstrea	103	1	0	1	0	0	1	hsa-miR- ζ	-0.18	-0.18	N/A	-0.7080032	2.51924878
MYBL1	ENST000	v-myb avi	53	1	1	0	0	0	1	hsa-miR- ζ	-0.23	-0.23	N/A	-0.83871984	2.51814953
PSIP1	ENST000	PC4 and ξ	377	1	1	0	0	0	1	hsa-miR- ζ	-0.35	-0.41	N/A	-0.74259186	2.500660014
WASF1	ENST000	WAS prot	55	2	0	1	1	0	0	hsa-miR- ζ	-0.16	-0.16	N/A	-0.5196418	2.37937122
SCN2A	ENST000	sodium ch	7	1	0	0	0	1	0	hsa-miR- ζ	-0.04	-0.06	N/A	-0.62587374	2.25496808
HFM1	ENST000	HFM1, AT	6	1	0	0	0	1	0	hsa-miR- ζ	-0.11	-0.11	N/A	-1.7766532	2.24816659
ST6GAL2	ENST000	ST6 beta-	5	1	0	1	0	0	0	hsa-miR- ζ	-0.04	-0.04	N/A	-0.73805416	2.21503295
ADD2	ENST000	adducin 2	59	3	0	1	2	0	2	hsa-miR- ζ	-0.02	-0.04	N/A	-1.4493396	2.199455255
POTED	ENST000	POTE ank	5	2	0	0	2	0	4	hsa-miR- ζ	0	-0.04	N/A	-1.412251	2.1773568
SLC16A1	ENST000	solute car	707	4	0	0	0	4	1	hsa-miR- ζ	-0.09	-0.18	N/A	-0.5390634	2.15913169
TET1	ENST000	tet methyl	5	1	0	1	0	0	0	hsa-miR- ζ	-0.02	-0.02	N/A	-0.65803444	2.13171072
ELOVL4	ENST000	ELOVL fa	129	2	0	1	1	0	0	hsa-miR- ζ	-0.04	-0.04	N/A	-0.7461395	2.108099065
UNG	ENST000	uracil-DN	2812	2	1	1	0	0	0	hsa-miR- ζ	-0.35	-0.35	N/A	-0.5748977	2.100130589
MYT1	ENST000	myelin tra	12	1	0	0	0	1	1	hsa-miR- ζ	-0.01	-0.01	N/A	-0.76146317	2.07110748
CNKSR3	ENST000	CNKSR fa	567	7	2	2	2	3	2	hsa-miR- ζ	-0.05	-0.17	N/A	-0.5374665	2.02336782
CNTNAP5	ENST000	contactin	5	1	0	0	1	0	1	hsa-miR- ζ	0	-0.02	N/A	-1.1368839	2.02235683

(4-8) miR-30a-3p による DONSON の制御

miR-30a-3p を核酸導入した小細胞肺癌細胞株から全 RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。miR-30a-3p を核酸導入した細胞株由来の RNA において、DONSON の発現抑制を確認した。

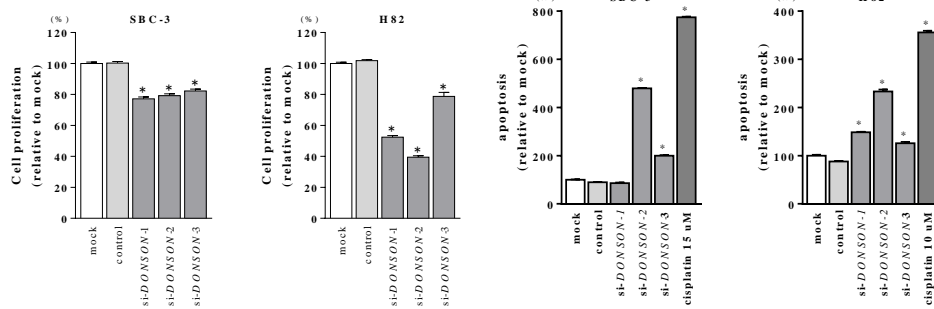


(4-8) DONSON の機能解析

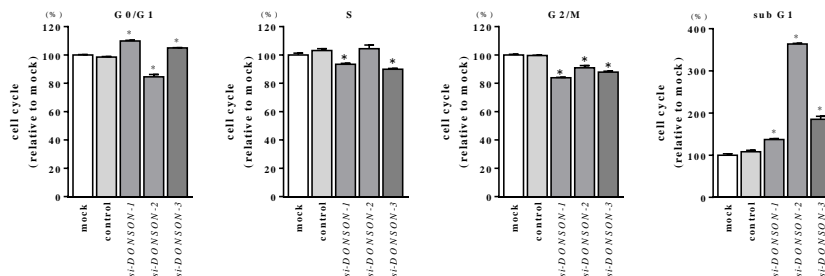
siRNA を核酸導入した細胞株を用いて DONSON の機能解析を行った。DONSON の silencing により、細胞増殖、アポトーシスが抑制され、G0/G1・G2/M 期で細胞周期をとめていることを確認した。

[XTT assay]

[Apoptosis assay]



[Cell cycle assay (SBC-3)]



(4-7) 臨床検体における DONSON の免疫染色

小細胞肺癌の臨床検体を用いた免疫染色により、癌部における DONSON の高発現を確認した。

今回の研究から、miR-30a-3p およびその標的遺伝子である DONSON は、治療抵抗性に至った小細胞肺癌の病勢に関連する重要なマイクロ RNA-機能性 RNA の分子ネットワークであることが示唆された。治療抵抗性に至った小細胞肺癌の予後は極めて不良であり、有効な治療法は少ない。本研究による知見から、治療抵抗性に至った小細胞肺癌の病態解明および新規治療標的の開発に寄与するものと期待する。今後、更なる検討を行い、論文投稿の予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関 直彦 (Seki Naohiko) (50345013)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	水野 圭子 (Mizuno Keiko) (50531414)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教 (17701)	
研究分担者	上川路 和人 (Kamikawaji Kazuto) (80633396)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	