

令和元年6月11日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16052

研究課題名(和文) 特発性肺線維症・肺癌に共通する機能性RNA分子ネットワークの探索

研究課題名(英文) Identification of microRNA-mediated molecular pathways in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

上川路 和人(Kazuto, Kamikawaji)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80633396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器疾患の臨床において、肺癌合併特発性肺線維症の予後は極めて不良であり、現在においても、有効な治療法は存在しない。肺線維症の経過観察中に肺癌を発症する症例が、少なからず存在する事から、両疾患に共通する分子経路が存在する事が示唆される。本研究において、肺癌の癌抑制性マイクロRNAの中にECMに関連する遺伝子群を制御するマイクロRNAがあることを明らかにした。さらにこれらの癌抑制性マイクロRNAは肺線維症においても発現が抑制されており、線維化から癌化への移行に関わるマイクロRNAである事が示唆された。マイクロRNAが制御する機能性RNAネットワーク解析は、本疾患の病態の解明に有効な戦略である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器内科の日常診療において、線維症の経過観察中に肺癌を発症する症例が、少なからず存在する。肺線維症を合併した肺癌の治療は限定されており、その生命予後は極めて不良である。本疾患の早期発見、新規治療開発に繋がる両者の病態解明が望まれている。本研究では、特発性肺線維症および肺癌に共通する機能性RNAを探索し、両者の病態に関わる分子経路の一端を明らかにした。この事は、本研究戦略の有効性を示しており、本研究の継続は、肺癌合併特発性肺線維症の新規治療法の開発へ向けて重要な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive lung disease that is refractory to treatment and carries a high mortality rate. IPF is frequently associated with lung cancer. Identification of molecular targets involved in both diseases may elucidate novel molecular mechanisms contributing to their pathology. Function of microRNA (miRNA) is a fine-tuner that expression of protein coding/noncoding RNAs by repressing translation or cleaving RNA transcripts in a sequence-dependent manner. A single miRNA may regulate a vast number of protein-coding and noncoding RNA transcripts. In human disease cells, aberrantly expressed miRNAs trigger the failure of orderly and controlled RNA networks. Analyses of miRNA expression profiles showed that some miRNAs were downregulated in IPF and lung cancer. Novel miRNA-based approaches for lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis can be used to identify potential targets for the development of new therapeutic strategies.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：microRNA 肺癌 特発性肺線維症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

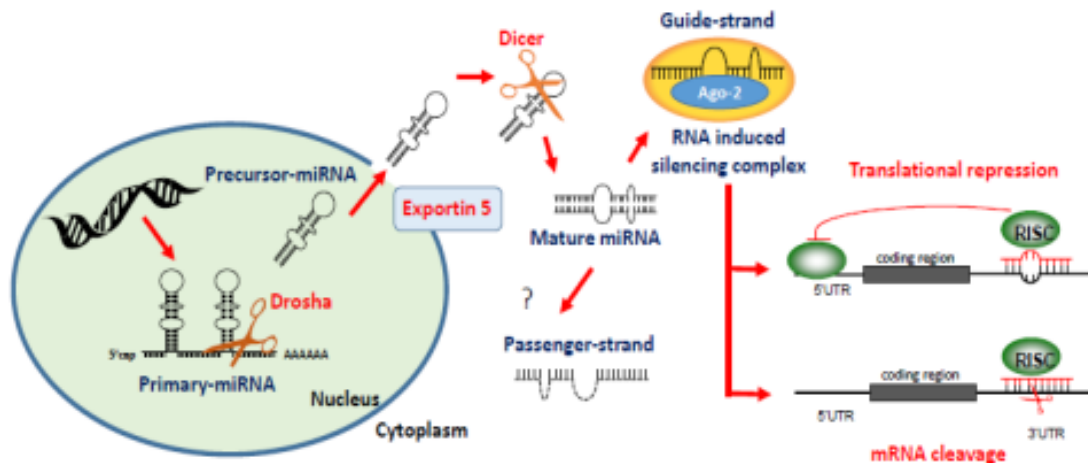
### (1) 肺癌合併特発性肺線維症の臨床的背景

特発性間質性肺炎の中で、特発性肺線維症は最も頻度の高い疾患である。しかしながら、現在においても、その原因の詳細は不明である。肺胞上皮細胞に生じた様々な障害に対する過剰な修復により、肺の異常な線維化が亢進し、肺のコンプライアンス低下のために拘束性障害が起こるとされている。肺の線維化の過程において、Transforming growth factor beta ( $TGF-\beta$ ) は、重要な働きをしている事が報告されている。 $TGF-\beta$  の刺激により、肺上皮細胞は、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を誘発し、線維芽細胞や筋線維芽細胞への形質転換する事が知られている。

特発性肺線維症の予後は極めて不良であり、診断時からの平均余命は5年とされている。予後不良の原因の一つが、肺癌の合併である。事実、特発性肺線維症は肺癌の合併率が高い事が報告されている。これらの事実は、肺線維症と肺癌には、共通する分子メカニズムが存在する事を示唆している。臨床的には、肺癌の治療（放射線・化学療法）により、特発性肺線維症の悪化がもたらされるため、通常のレジメに沿った治療が行えない問題がある。

### (2) マイクロ RNA 研究の背景

ヒトゲノム中には蛋白をコードしない RNA 分子が多数存在し、実際に転写されている事が判明した。その中で、僅か 19 塩基~22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子は、マイクロ RNA と呼ばれる。1 種類のマイクロ RNA は、配列依存的に数百~数千種の機能性 RNA の発現を制御している事から、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% のタンパクコード遺伝子は、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 の発現異常が細胞内の機能性 RNA 分子ネットワークの破綻を引き起こし、ヒト疾患の発症・進展に関わる事が明らかとなってきた。癌を含むヒト疾患においてマイクロ RNA の発現異常が相次いで報告されている。



## 2. 研究の目的

- (1) 肺癌と肺癌合併肺線維症におけるマイクロ RNA 発現プロファイルを基に、両疾患で発現変動を認めるマイクロ RNA を探索すること
- (2) マイクロ RNA の機能解析から、両疾患に関与するマイクロ RNA を選別すること
- (3) マイクロ RNA を起点として、特発性肺線維症・肺癌の両病変部位で共通する機能性 RNA (蛋白コード遺伝子、蛋白非コード遺伝子) を探索し、両者の病態に関わる分子経路を明らかにすること

## 3. 研究の方法

- (1) 特発性肺線維症および肺癌の病変部位で発現異常を認めるマイクロ RNA を選別する。
- (2) 選択したマイクロ RNA の発現について、定量 PCR 法を用いて確認する。
- (3) 候補となるマイクロ RNA について、細胞株に核酸導入し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について検討を行う。
- (4) マイクロ RNA を核酸導入した細胞の網羅的な発現解析を行い、マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワークを探索する。
- (5) マイクロ RNA が制御する標的分子について、肺癌および肺癌合併肺線維症組織における発現を確認する。また、標的分子の発現について、TCGA データベースを用いて、臨床病理学的な解析を行う。
- (6) マイクロ RNA が制御する標的分子について、臨床検体での発現を確認する。

## 4. 研究成果

- (1) 特発性肺線維症および肺癌の病変部位で発現異常を認めるマイクロ RNA の選択

これまで公表されている特発性肺線維症および肺癌の論文から、両疾患において発現変動す

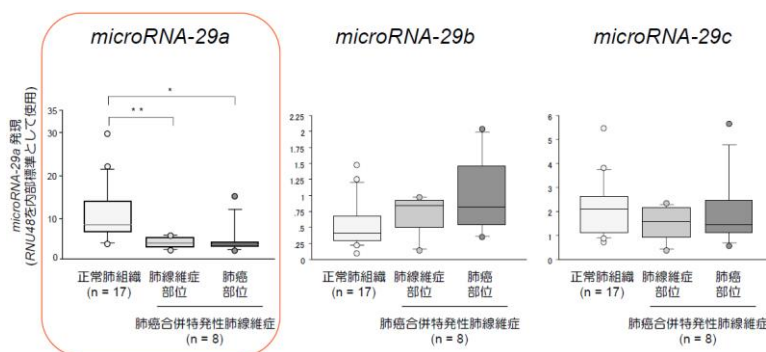
るマイクロ RNA をリストアップした。その結果、*miR-29a/b/c*、*miR-30e-5p*、*miR-101-3p*、*miR-26a-5p* の発現が、特発性肺線維症および肺癌の病変部位で抑制されている事が明らかとなった。

No. of studies	hsa-mature sequence		Stem-loop sequence	Locus	Clustered miRNA (within 10 Kbp)
	IPF	NSCLC			
4	1	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-29c	1q32.2	hsa-mir-29b-2/hsa-mir-29c
4	1	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30b	8q24.22	hsa-mir-30d/hsa-mir-30b
4	1	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-30e-5p	1p34.2	hsa-mir-30e/hsa-mir-30c-1
3	3	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30a	6q13	-
3	2	hsa-miR-101-3p	hsa-mir-101-1 hsa-mir-101-2	1p31.3 9p24.1	hsa-mir-101-1/hsa-mir-3671
3	1	hsa-miR-130a-3p	hsa-mir-130a	11q12.1	-
3	1	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29b-1 hsa-miR-29b-2	7q32.3 1q32.2	hsa-mir-29b-1/hsa-mir-29a hsa-mir-29b-2/hsa-mir-29c
2	2	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-143	5q32	hsa-mir-143 chr5/hsa-mir-145
2	2	hsa-miR-26a-5p	hsa-mir-26a-1 hsa-mir-26a-2	3p22.2 12q14.1	-
2	1	hsa-miR-140-5p	miR-140-5p	16q22.1	-
2	1	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-29a	7q32.3	hsa-mir-29b-1 chr7/hsa-mir-29a
2	1	hsa-miR-30d-5p	hsa-mir-30d	8q24.22	hsa-mir-30d/hsa-mir-30b
2	1	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-32	9q31.3	-
2	1	hsa-miR-320a	hsa-miR-320a	8p21.3	-
1	4	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-126	9q34.3	-
1	2	hsa-miR-138-5p	hsa-miR-138-1 hsa-miR-138-2	3p21.32 16q13	-
1	1	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7a-1 hsa-let-7a-2 hsa-let-7a-3	9q22.32 11q24.1 22q13.31	hsa-let-7a-1/hsa-let-7f-1/hsa-let-7d hsa-mir-100/hsa-let-7a-2 hsa-let-7a-3/hsa-mir-4763/hsa-let-7b
1	1	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-181c	19p13.13	hsa-mir-181c/hsa-mir-181d
1	1	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-186	1p31.1	-
1	1	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-191	3p21.31	hsa-mir-191/hsa-mir-425
1	1	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-26b	2q35	-
1	1	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-27b	9q22.32	hsa-mir-23b/hsa-mir-27b/hsa-mir-3074/ hsa-mir-24-1
1	1	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-497	17p13.1	hsa-mir-497/hsa-mir-195

これらのマイクロ RNA の中で、我々は、*miR-29a/b/c* が肺扁平上皮癌を含めた複数の癌腫で発現が低下していることを報告してきた。*miR-29a/b/c* は、細胞外マトリックスを制御することにより、抗腫瘍効果を有することが報告されている。また、細胞外マトリックスの過剰増生は、正常組織を破壊し、線維化を増悪することがわかっている。そこで、今回、我々は、細胞外マトリックスが腫瘍および線維化に共通して関与していることに着目し、肺癌および特発性肺線維症に対する *miR-29a/b/c* およびその標的遺伝子による制御について検討した。

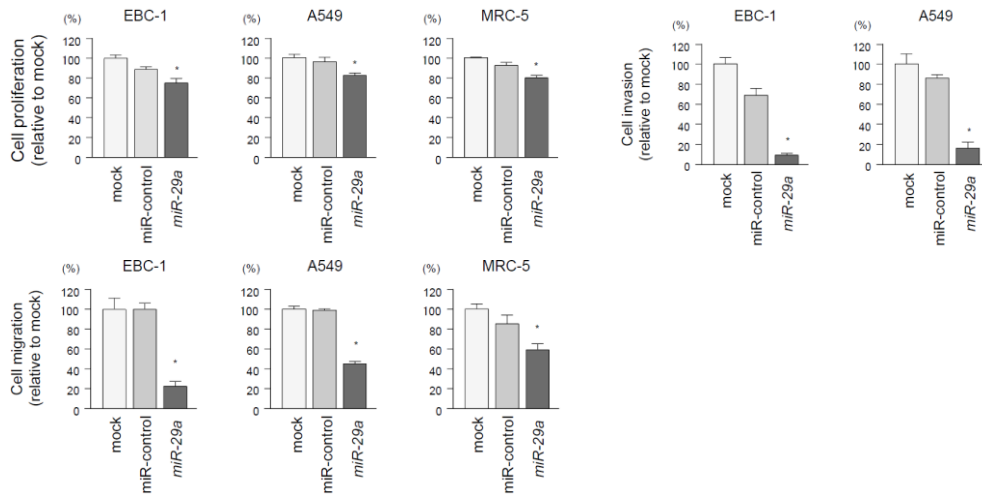
### (2) 特発性肺線維症および肺癌の病変部位における *miRNA-29a/b/c* の発現

肺癌合併特発性肺線維症における *miR-29a/b/c* の発現を RT-PCR 法により解析したところ、肺癌部位 (n = 8 : 肺腺癌 n = 4, 肺扁平上皮癌 n = 4)、特発性肺線維症部位 (n = 8) および肺癌細胞株、肺線維芽細胞株では、正常肺組織 (n = 17) と比較し、*miR-29a* は有意な発現の低下を認めた (\*P < 0.05, \*\*P < 0.005)。一方で、*miR-29b/c* の発現には有意な差はみられなかった。そのため、*miR-29a* による制御について、その後の検討を行うこととした。



### (3) *miRNA-29a* による機能解析

*miR-29a* を EBC-1 細胞、A549 細胞、MRC-5 細胞に遺伝子導入し機能解析をおこなった。XTT assay では *miR-29a* 導入細胞とコントロール細胞を比較し、*miR-29a* の有意な増殖抑制効果を確認した (\*P < 0.05)。同様に wound healing assay では遊走能 (\*P < 0.05) を抑制した。肺癌細胞株における invasion assay では浸潤能 (\*P < 0.05) を抑制しており、*miR-29a* はいくつかの遺伝子を標的とすることにより、重要な腫瘍・線維化抑制機能をもつと考えられる。



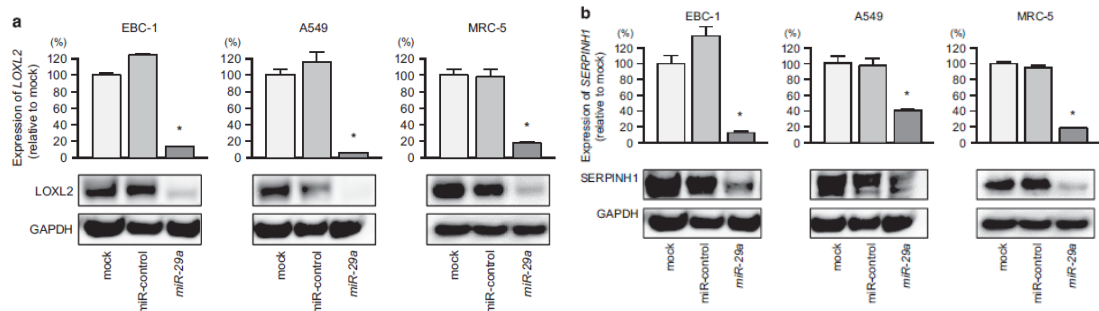
#### (4) *miR-29a* が制御する機能性 RNA ネットワークの解析

公共の data base を利用した *in silico* 解析と *miR-29a* 導入細胞を用いたマイクロアレイ解析によって、*miR-29a* が制御する標的遺伝子を検討し、下記の 24 候補遺伝子を同定した。候補遺伝子の中で、細胞外マトリックスに関連している遺伝子に着目し、*LOXL2* および *SERPINH1* を標的遺伝子とした。

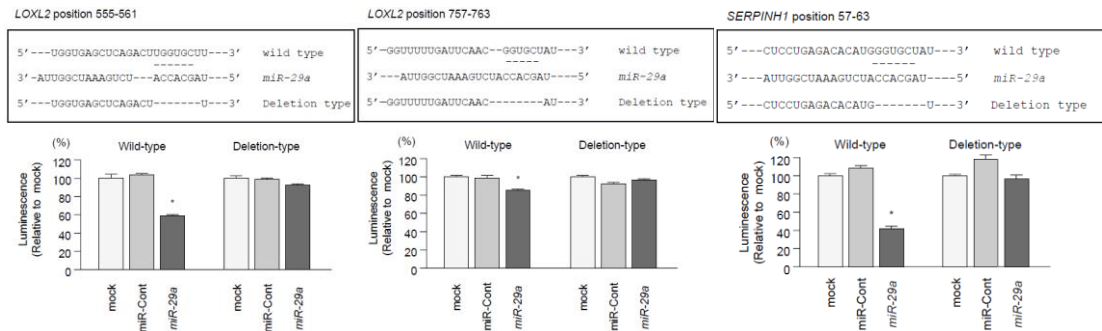
Entrez gene ID	Gene symbol	Description	<i>miR-29a</i> transfectant Log2 ratio			<i>miR-29a</i> conserved site	<i>miR-29a</i> poorly conserved site	GSE 19188 (fold-change)
			EBC-1	A549	MRC-5			
4017	<i>LOXL2</i>	lysyl oxidase-like 2	-4.05	-3.35	-1.93	1	1	2.56
871	<i>SERPINH1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	-2.57	-1.35	-1.90	1	0	1.78
57761	<i>TRIB3</i>	tribbles homolog 3 (Drosophila)	-2.40	-3.43	-1.84	0	1	1.72
55920	<i>RCC2</i>	regulator of chromosome condensation 2	-2.11	-2.05	-1.24	1	0	1.86
140576	<i>S100A16</i>	S100 calcium binding protein A16	-2.10	-1.65	-1.61	0	2	1.30
51129	<i>ANGPTL4</i>	angiopoietin-like 4	-2.03	-1.46	-1.39	0	1	1.69
83986	<i>ITFG3</i>	integrin alpha FG-GAP repeat containing 3	-1.85	-2.24	-1.51	0	1	1.21
642	<i>BLMH</i>	bleomycin hydrolase	-1.85	-2.76	-1.32	1	0	1.53
8140	<i>SLC7A5</i>	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5	-1.71	-1.40	-2.49	0	1	2.64
51256	<i>TBC1D7</i>	TBC1 domain family, member 7	-1.67	-2.11	-1.36	1	0	2.01
114904	<i>C1QTNF6</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	-1.52	-1.88	-1.00	2	2	1.76
3915	<i>LAMC1</i>	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	-1.49	-1.08	-1.27	1	0	1.61
4605	<i>MYBL2</i>	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	-1.42	-1.22	-1.95	1	0	8.02
58505	<i>OSTC</i>	oligosaccharyltransferase complex subunit	-1.35	-2.28	-1.15	1	0	1.54
4150	<i>MAZ</i>	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	-1.35	-1.11	-1.25	1	0	1.51
6611	<i>SMS</i>	spermine synthase	-1.34	-1.58	-1.28	0	1	1.56
80727	<i>TTYH3</i>	teewty homolog 3 (Drosophila)	-1.31	-1.25	-1.22	0	1	1.60
388969	<i>C2orf68</i>	chromosome 2 open reading frame 68	-1.31	-2.40	-1.23	0	2	1.30
79017	<i>GGCT</i>	gamma-glutamylcyclotransferase	-1.23	-1.39	-1.29	1	0	2.46
9871	<i>SEC24D</i>	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	-1.23	-3.73	-1.03	0	1	1.37
84733	<i>CBX2</i>	chromobox homolog 2	-1.21	-1.10	-1.18	1	0	3.97
26521	<i>TIMM8B</i>	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)	-1.12	-1.51	-1.65	1	0	2.17
1021	<i>CDK6</i>	cyclin-dependent kinase 6	-1.11	-2.01	-1.06	3	0	1.73
5480	<i>PPIC</i>	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	-1.07	-2.05	-1.42	1	0	1.14

#### (5) *miRNA-29a* による標的遺伝子 (*LOXL2*, *SERPINH1*) の発現制御

EBC-1 細胞、A549 細胞、MRC-5 細胞に *miR-29a* を遺伝子導入し、mRNA レベル (RT-PCR 法、\* $P < 0.001$ )、蛋白レベル (Western blotting) で *LOXL2* および *SERPINH1* の発現抑制を確認した。

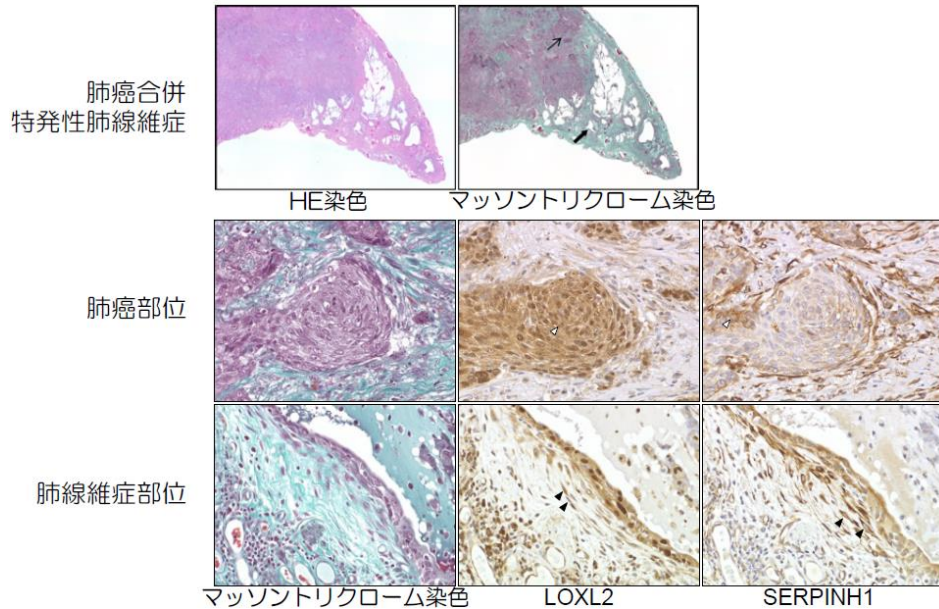


さらに、*LOXL2* および *SERPIN1* と *miR-29a* とのそれぞれの予測結合配列を含む vector と、予測結合配列を変化させたコントロール vector とを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイでは、コントロール vector を遺伝子導入した A549 細胞と比較してルシフェラーゼ活性が有意に低下していた (\* $P < 0.001$ )。このことから *miR-29a* は *LOXL2* および *SERPIN1* の 3' -UTR における特定の配列に直接作用し、その発現を抑制していることが示唆された。



#### (6) 臨床検体における標的遺伝子 (*LOXL2*, *SERPIN1*) の発現

肺癌合併特発性肺線維症症例の臨床検体において、*LOXL2* および *SERPIN1* の発現を免疫染色にて検討した。*LOXL2* および *SERPIN1* はともに、肺癌細胞および線維芽細胞に高発現していた。



今回の研究から、*miR-29a* およびその標的遺伝子 (*LOXL2*, *SERPIN1*) は、肺癌と特発性肺線維症の病勢に共通して関与する重要なネットワークであることが示唆された。肺癌合併特発性肺線維症の予後は極めて不良であり、現在においても、有効な治療法は存在しない。本研究による知見は、難治性の肺癌合併特発性肺線維症の病態解明および新規治療の開発に寄与するものと期待する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

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. (査読有), 62(7), 2017, 671-678.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。