

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08656

研究課題名(和文) 機能性RNA統合理解に基づく間質性肺炎合併肺癌の分子経路探索と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Exploration of molecular pathways for lung cancer with interstitial pneumonia and development of new treatments based on understanding of functional RNA integration

研究代表者

眞田 宏樹 (Sanada, Hiroki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：10837777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：間質性肺炎合併肺癌(肺扁平上皮癌)のマイクロRNA発現プロファイルから、miR-150-3p(パッセンジャー鎖)の発現抑制を認めた。The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベース解析から、LUSQ患者組織におけるmiR-150-3pの発現抑制を確認した。miR-150-3pを癌細胞株に核酸導入する事により、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。この事から、miR-150-3pは、肺扁平上皮癌における癌抑制型マイクロRNAである事を証明した。miR-150-3pが制御する分子ネットワークを探索した結果、細胞周期に関わる遺伝子を制御している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は最も致命的な癌の一つであり、2020年には約7万5千人の患者がこの病気で死亡した。特に間質性肺炎を合併した肺癌患者の治療選択は限定的であり、患者の予後は極めて不良である。現在、間質性肺炎合併肺癌患者に対する有効な治療法は存在しない。

本研究では、間質性肺炎合併肺癌(肺扁平上皮癌)において、miR-150-3pが癌抑制型マイクロRNAであることを明らかにした。疾患の原因について、癌抑制型マイクロRNAの一つが明らかになったことは、治療法の開発に向けた基礎研究としての学術的・社会的に重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the microRNA expression signature of lung cancer combined with interstitial lung disease (lung squamous cell carcinoma: LUSQ) revealed that expression of miR-150-3p was significantly reduced in cancer tissues. The downregulation of miR-150-3p in LUSQ tissues was confirmed by data in The Cancer Genome Atlas (TCGA). The ectopic expression of miR-150-3p attenuated cancer cell aggressive features, e.g., cell cycle arrest, migration and invasive abilities. Our target search strategy successfully identified a total of 49 putative targets that were listed as subjects of miR-150-3p regulation in LUSQ cells. Interestingly, among these targets, 17 genes were categorized as related to the "cell cycle" based on Gene Ontology (GO) classification.

研究分野：肺癌

キーワード：マイクロRNA 間質性合併肺癌 扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は最も致命的な癌の一つであり、2020年には男女合わせて約7万5千人の死亡数が報告されている。日常診療において、間質性肺炎の経過観察中に、肺癌を発症する症例が少なからず存在する。そのため、両疾患に共通する分子経路の存在が強く示唆されているが、その詳細は依然不明である。肺癌に対する新規治療薬が相次いで登場し効果を上げているが、間質性肺炎合併肺癌患者に対する有効な治療法は存在しない。本疾患の原因を探索し、治療法の開発に向けた基礎研究は急務である。

ヒトゲノムプロジェクトの研究成果として、ヒトゲノム中には、蛋白をコードしないRNA分子が存在し、実際に細胞内で機能している事が判明した。このようなRNA分子は機能性RNAと呼ばれ、現在、機能性RNA分子に対する研究が世界規模で行われている。マイクロRNAは、機能性RNAの1種であり、19~23塩基程度の1本鎖RNA分子である。マイクロRNAの特徴は、1種類のマイクロRNAが、極めて多くの蛋白コード遺伝子の発現を制御している事である。そのため、マイクロRNAの発現異常が、細胞内の分子ネットワークの破綻を誘発し、ヒト疾患の原因となっている事が明らかとなった。

肺癌においても、マイクロRNAの発現異常が、肺癌細胞の増殖や転移、薬剤耐性に関与する事が数多く報告されている。しかしながら、間質性肺炎合併肺癌患者を対象としたマイクロRNA研究は十分に行われていない。

2. 研究の目的

間質性肺炎合併肺癌の分子機序は未だ明らかになっていない。本研究では、マイクロRNAを起点として、間質性肺炎合併肺癌の病態に関与する遺伝子を探索する事である。

- (1) マイクロRNA発現プロファイルから、病変組織で発現が抑制されているマイクロRNAを探索し、その機能を明らかにする。
- (2) マイクロRNAが制御する遺伝子を探索し、その機能を明らかにする。

3. 研究の方法

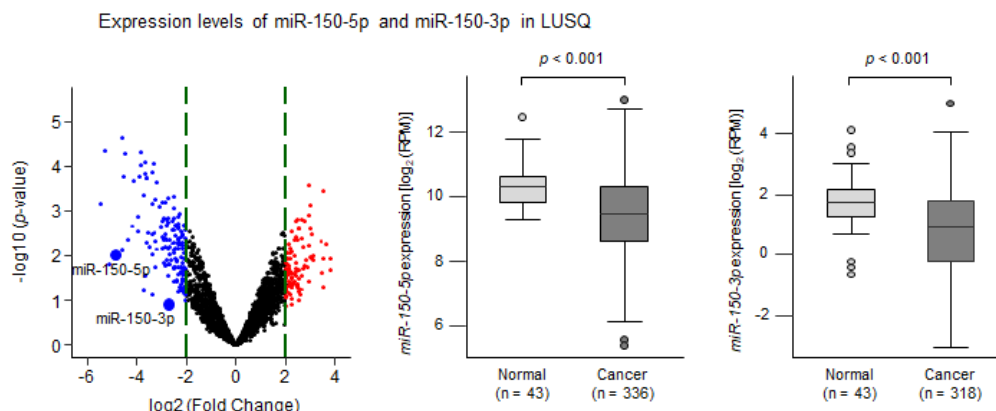
- (1) マイクロRNAおよび標的遺伝子の発現は、The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベースを用いて解析した。
- (2) マイクロRNAが結合する可能性のある遺伝子について、TargetScan database (release 7.2)と、遺伝子発現データ (GSE163187, GSE19188)を組み合わせ探索した。
- (3) マイクロRNAおよび標的遺伝子の機能解析は、肺扁平上皮癌(以下、LUSQ)細胞株に、マイクロRNAまたはsiRNA (small interfering RNA)を核酸導入し、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を検討した。

4. 研究成果

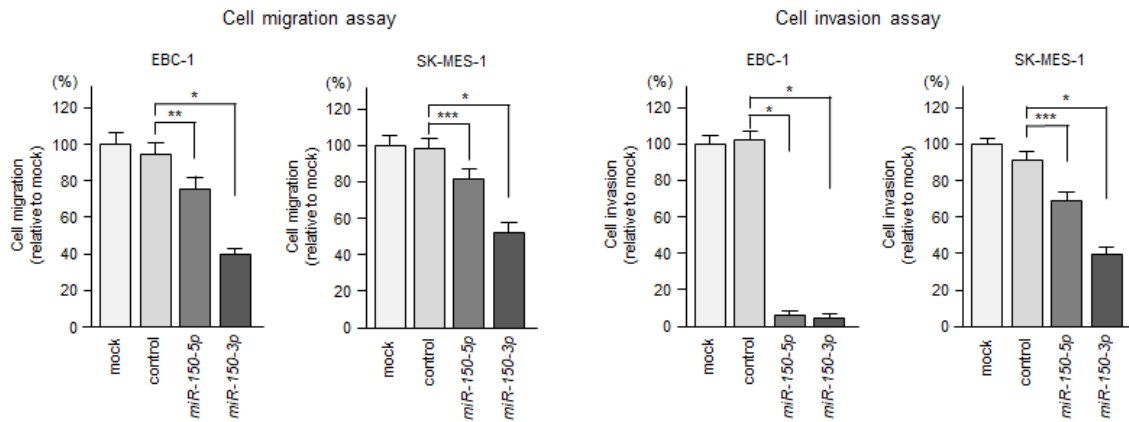
- (1) 肺扁平上皮癌組織におけるmiR-150-3pの機能解析

マイクロRNA発現プロファイルの解析から、pre-miR-150から派生するmiR-150-5p(ガイド鎖)とmiR-150-3p(パッセンジャー鎖)の発現低下を認めた。TCGA-LUSQデータベース解析から、miR-150-5pおよびmiR-150-3pの発現は、LUSQ組織で発現抑制されている事を確認した。

次に、miR-150-5pおよびmiR-150-3pをLUSQ細胞(EBC-1およびSK-MES-1)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った。miR-150-5pおよびmiR-150-3pの核酸導入により、癌細胞の遊走能と浸潤能は著しく抑制された。特に、miR-150-3pの癌抑制効果が顕著であった。以上の結果から、両方のマイクロRNAが、LUSQ細胞における癌抑制型マイクロRNAである事を明らかにした。一般的に、マイクロRNAのパッセンジャー鎖は、細胞質で分解されて機能を有しないとされている。本研究から、パッセンジャー鎖であるmiR-150-3pが、LUSQ細胞で癌抑制型マイクロRNAとして機能している事が明らかとなった。



- (2) 肺扁平上皮癌においてmiR-150-3pが制御する分子経路の探索



マイクロ RNA の生物学的特性は、1 種類のマイクロ RNA が極めて多くの (数十 ~ 数百) 遺伝子の発現を負に制御している事である。本研究では、パッセンジャー鎖である miR-150-3p が制御する遺伝子の探索と、これら遺伝子が関わる分子ネットワークの探索を行った。標的遺伝子の探索は、以下の 3 つのカテゴリーを満たす遺伝子について解析した。(1) 遺伝子の 3' UTR 領域に miR-150-3p が結合する配列を有する。(2) LUSQ 臨床検体において癌部で正常組織と比べ発現が上昇している遺伝子。(3) miR-150-3p を LUSQ 細胞である EBC-1 に核酸導入した際に、発現が世癖されて遺伝子。解析の結果、(1)-(3) を満たす遺伝子として、49 種類の遺伝子が明らかとなった。

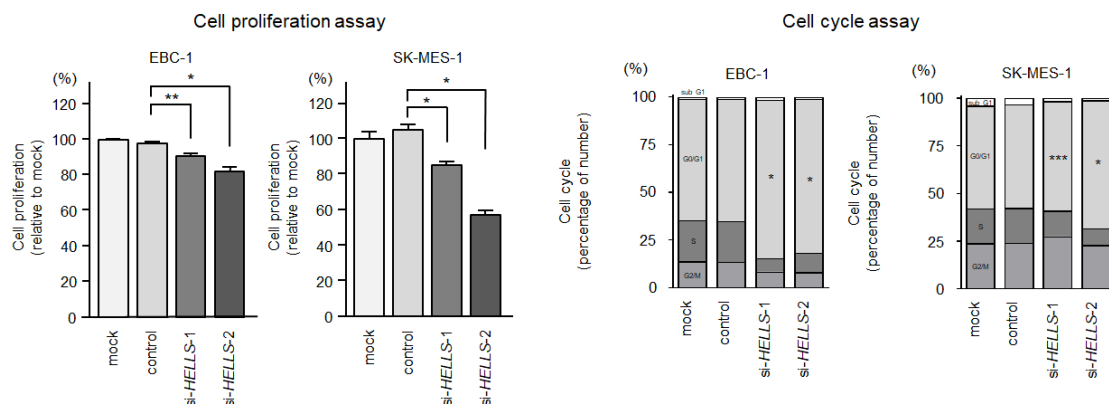
次に、これら遺伝子を、GeneOntology データベースによって機能分類したところ、17 種の遺伝子は、細胞周期に関連している事が明らかとなった。この事から、miR-150-3p は、LUSQ 細胞において、細胞周期関連遺伝子を制御している癌抑制型マイクロ RNA である事が明らかとなった。

Description	Annotation	Number of Genes	p-Value	Genes
cell cycle	GO:0007049	17	9.64×10^{-12}	<i>CENPA, CIT, CCNE1, CCNE2, TIMELESS, BUB1, MCM4, HELLS, SKA3, CDCA2, FANCD2, NUF2, E2F2, SUV39H2, CASC5, ZWILCH, CKAP2</i>
cell division	GO:0051301	12	1.36×10^{-8}	<i>CENPA, CIT, CCNE1, CCNE2, TIMELESS, BUB1, HELLS, SKA3, CDCA2, NUF2, CASC5, ZWILCH</i>
chromosome segregation	GO:0007059	5	0.000241047	<i>BUB1, SKA3, CDCA2, NUF2, CASC5</i>
chromatin organization	GO:0006325	7	0.00128717	<i>HIST1H3B, HIST1H3H, PRKAA2, EZH2, CBX2, SUV39H2, ATAD2</i>
DNA replication initiation	GO:0006270	3	0.00275067	<i>CCNE1, CCNE2, MCM4</i>
homologous chromosome pairing at meiosis	GO:0007129	3	0.0027733	<i>CCNE1, CCNE2, FANCD2</i>
CENP-A containing nucleosome assembly	GO:0034080	3	0.00566854	<i>CENPA, CENPO, CASC5</i>
negative regulation of gene expression, epigenetic	GO:0045814	3	0.00814561	<i>HIST1H3B, HIST1H3H, EZH2</i>
mitotic cytokinesis	GO:0000281	3	0.00864655	<i>CENPA, CIT, CKAP2</i>
regulation of gene silencing	GO:0060968	2	0.00873016	<i>HIST1H3B, HIST1H3H</i>

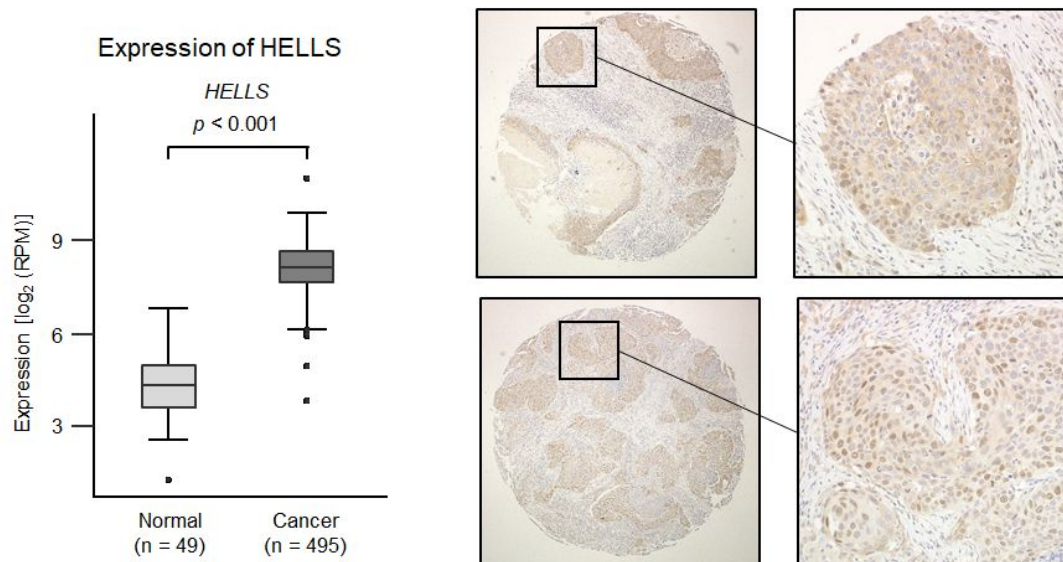
(3) HELLS (helicase, lymphoid specific) の機能解析

細胞周期に関連する 17 遺伝子の中で、殆ど解析されていない HELLS (helicase lymphoid specific) に着目し、HELLS の LUSQ 細胞における機能解析を行った。siRNA (small interfering RNA) により、HELLS の発現をノックダウンし、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能について検討を行った。その結果、siRNA 導入により、LUSQ 細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。

TCGA 解析および免疫組織染色から、HELLS は LUSQ 組織で高発現している事を確認した。以上



の結果から、HELLS は LUSQ 細胞において癌促進型遺伝子として機能している事を明らかにした。



(4) 研究のまとめ

間質性肺炎合併肺癌（肺扁平上皮癌）のマイクロ RNA 発現プロファイルから、miR-150-3p の発現抑制を認めた。TCGA データベース解析から、LUSQ 臨床検体における miR-150-3p の発現抑制を確認した。miR-150-3p の機能解析から、LUSQ 細胞における癌抑制型マイクロ RNA であることを明らかにした。miR-150-3p が制御する分子を探索した結果、細胞周期に関わる遺伝子群を制御している事が明らかになった。この中で、HELLS は、miR-150-3p により直接制御される、癌促進型遺伝子である事が判明した。マイクロ RNA を起点とした解析から、間質性肺炎合併肺癌の病態に関与している可能性がある遺伝子を探索する事が可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuno Keiko, Tanigawa Kengo, Misono Shunsuke, Suetsugu Takayuki, Sanada Hiroki, Uchida Akifumi, Kawano Minami, Machida Kentaro, Asai Shunichi, Moriya Shogo, Inoue Hiromasa, Seki Naohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of Oncogenic Targets by Tumor-Suppressive miR-150-3p in Lung Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1883 ~ 1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9121883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0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・特任准教授 (17701)	

	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
研究協力者	谷川 健悟 (Tanigawa Kengo)		
研究協力者	美園 俊祐 (Misono Shunsuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------