

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08527

研究課題名(和文) LncRNAを介した間質性肺炎合併肺癌の発症・進展機構解明とバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Elucidation of the lncRNA-mediated mechanism underlying the onset and progression of lung cancer associated with interstitial pneumonia and development of biomarkers

研究代表者

小山 信之 (Koyama, Nobuyuki)

東京医科大学・医学部・兼任教授

研究者番号：30353460

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)：外科切除された間質性肺炎合併非小細胞肺癌3例の癌組織と癌周囲間質性肺炎組織、間質性肺炎非合併非小細胞肺癌4例の癌組織と癌周囲正常肺組織からtotal RNAを抽出し、RNA-seq解析を行った。正常肺、間質性肺炎非合併肺癌と比較して、間質性肺炎合併肺癌および間質性肺炎では392の長鎖非コードRNA(lncRNA)、マイクロRNA、mRNAが共通して有意に発現変化していた。間質性肺炎と肺癌の共通発症・進展機構に対する鍵となりうる96遺伝子に注目して機能解析を進め、さらに患者血液中のエクソソームにおける17のlncRNA発現解析から、間質性肺炎合併非小細胞肺癌に対するバイオマーカーを同定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定した間質性肺炎合併非小細胞肺癌の間質性肺炎と肺癌で共通に発現変化を示す長鎖非コードRNA(lncRNA)群は、間質性肺炎合併非小細胞肺癌特有の発症・進展に関与すると考えられ、lncRNAの機能解析から間質性肺炎合併非小細胞肺癌の新規発症・進展機構の解明が可能となる。さらに、間質性肺炎合併肺癌患者末梢血液中エクソソームにおけるlncRNA発現解析結果から構築しているlncRNAセットは、間質性肺炎合併非小細胞肺癌の発症等を予測する因子となり得る。本研究の成果は、早期診断、治療が困難な間質性肺炎合併非小細胞肺癌に対する新たな治療薬及び低侵襲なバイオマーカーの開発へ結びつくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We extracted total RNA from lung cancer and surrounding interstitial pneumonia tissues of three patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) with interstitial pneumonia and lung cancer and surrounding normal lung tissues of four patients with NSCLC without interstitial pneumonia after surgical resection. In RNA-seq analysis using the total RNAs, both lung cancer and surrounding interstitial pneumonia in NSCLC with interstitial pneumonia showed concordant and significant differences in 392 long non-coding RNA (lncRNA), microRNA, and mRNA expression levels compared with lung cancer and surrounding normal lung in NSCLC without interstitial pneumonia. Among the genes exhibiting differential expression, we focused on 96 RNAs as novel clues for a similar pathogenic mechanism of lung cancer and interstitial pneumonia. Of the RNAs, 17 lncRNAs were employed for expression analysis in exosomes to establish a biomarker for the pathogenesis and progression of NSCLC with interstitial pneumonia.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：非小細胞肺癌 間質性肺炎 lncRNA RNA-seq Exosome

1. 研究開始当初の背景

予後不良な呼吸器疾患である肺癌と間質性肺炎は高率に合併することが知られているが、我々は以前、間質性肺炎と肺癌の病態に高い類似性があり、共通の発症・進展機構が存在する可能性があることを報告している。間質性肺炎合併肺癌は既存の間質性肺炎病変に発症することが多く、間質性肺炎非合併肺癌よりも診断が難しい。また、肺癌に対する治療により致死的な間質性肺炎急性増悪が惹起される危険性があり、間質性肺炎患者における肺癌に対する最適な診断マーカー、安全かつ有効な治療法が望まれている。そのためには、間質性肺炎合併肺癌の病態を明らかにする必要があるが、その解明は進んでいない。

間質性肺炎、肺癌に関する我々の研究の中で、短鎖非コード RNA であるマイクロ RNA (以下 miRNA) が上皮間葉転換 (以下 EMT) の制御を介し、肺癌の転移・浸潤を規定していることを明らかにした。EMT は間質性肺炎の線維化にも関与していることが知られており、miRNA を介した EMT の制御が両疾患に共通した発症・進展機構の一つとなっている可能性が考えられる。さらに我々は、間質性肺炎合併肺癌の間質性肺炎病変と肺癌病変でのみ発現低下が見られた miRNA を複数同定し、miRNA が EMT および細胞増殖を抑制することを確認してきた。

一方、非コード RNA には 200 塩基以上の長鎖非コード RNA (以下 lncRNA) があり、エフェクターとなる miRNA の発現を lncRNA が非コード RNA ネットワークの上流で制御しており、非コード RNA を介したエピジェネティクスに必要な分子と考えられている。しかし、lncRNA は間質性肺炎、肺癌の病態へ個々に関与している報告はあるものの、両疾患の病態に共通して関与している lncRNA は不明である。また、lncRNA は細胞外小胞内のエクソソームにおいて発現していることが知られており、バイオマーカーとしての可能性が期待されているが、間質性肺炎合併肺癌に関する報告はない。

以上から、間質性肺炎合併肺癌の病態を解明するには、間質性肺炎と肺癌に共通の発症・進展機構を規定している lncRNA を同定し、非コード RNA ネットワークを介したエピジェネティクスを明らかにする必要があると思われる。さらに、間質性肺炎合併肺癌患者の末梢血中エクソソームにおいて同定した lncRNA の発現レベルを解析することにより、lncRNA 発現が間質性肺炎患者における肺癌の発症や肺癌治療効果、治療に伴う間質性肺炎急性増悪などに対するバイオマーカーとなる可能性を探索することで、エクソソーム解析による lncRNA 発現の臨床応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、間質性肺炎と肺癌に共通の lncRNA を介した発症・進展機構を同定することにより、間質性肺炎合併肺癌の新たな病態を解明するとともに、バイオマーカー開発の基盤を構築することを目的とした。

まず、次世代シーケンサーによる RNA シーケンス (以下 RNA-Seq) 解析を用いて、間質性肺炎合併肺癌患者の間質性肺炎と肺癌の各病変で共通かつ特徴的な発現変化を示す lncRNA 群を同定する。次に、データベース等を用いて同定した lncRNA 群から非コード RNA ネットワークを予測するとともに、lncRNA に対する機能解析として lncRNA の発現を制御して標的 miRNA、mRNA の発現の変化を確認し、lncRNA と相互作用する蛋白質の同定を試みる。さらに、同定した lncRNA 群の末梢血中エクソソームにおける発現を定量し、間質性肺炎合併肺癌患者でのみ特徴的な発現変化を示す lncRNA 群を見出し、バイオマーカーとしての lncRNA セットを構築する。本研究で

は、分子病態に関する情報が乏しい間質性肺炎合併肺癌を対象に、可能な限り解析に関するノイズを減少させるため、ゲノムのバックグラウンドが共通である同一症例における間質性肺炎と肺癌の病変を同時に解析する。また、lncRNA の機能は多岐にわたっており複雑で不明な点が多く、これまでに間質性肺炎合併肺癌に関する報告はなかった。本研究において、間質性肺炎合併肺癌の病態を規定する lncRNA 群と非コード RNA ネットワークが同定されることで、「Unmet medical needs」である間質性肺炎合併肺癌の新たな診断、治療に対する基盤の構築へとつながることが期待される。

以上から、本研究では間質性肺炎合併肺癌の間質性肺炎と肺癌の各病変に共通の発症・進展機構を規定する lncRNA 群と非コード RNA ネットワークを同定し、lncRNA の機能を解析すること、間質性肺炎合併肺癌の非侵襲的な診断・治療マーカーとして、lncRNA の臨床応用へ向けた開発基盤を構築することを目的とした。

3 . 研究の方法

臨床検体を用いた RNA-Seq 解析から、目的の lncRNA 群の同定を試みた。本研究を埼玉医科大学総合医療センター研究倫理委員会へ申請、承認後、患者同意が得られた間質性肺炎合併肺癌 4 例と間質性肺炎非合併肺癌 6 例を対象とした。間質性肺炎合併肺癌の同一症例から切除された肺癌組織と周囲の間質性肺炎組織、間質性肺炎非合併肺癌 4 例の同一症例から切除された肺癌組織と周囲の正常肺組織より各々 total RNA を抽出した。間質性肺炎は特発性肺線維症 (IPF)、肺癌は I 期非小細胞肺癌を対象とした。RNA-Seq 解析から、間質性肺炎合併肺癌の間質性肺炎組織と肺癌組織でのみ共通に発現が変化していた lncRNA 群を検出することとした。検出した lncRNA 群に関しては、データベースを用いて標的となる miRNA、mRNA 等の RNA 群、相互作用する蛋白質を予測、同定して、間質性肺炎合併肺癌の病態に関与する非コード RNA ネットワークの解明へつなげることにした。

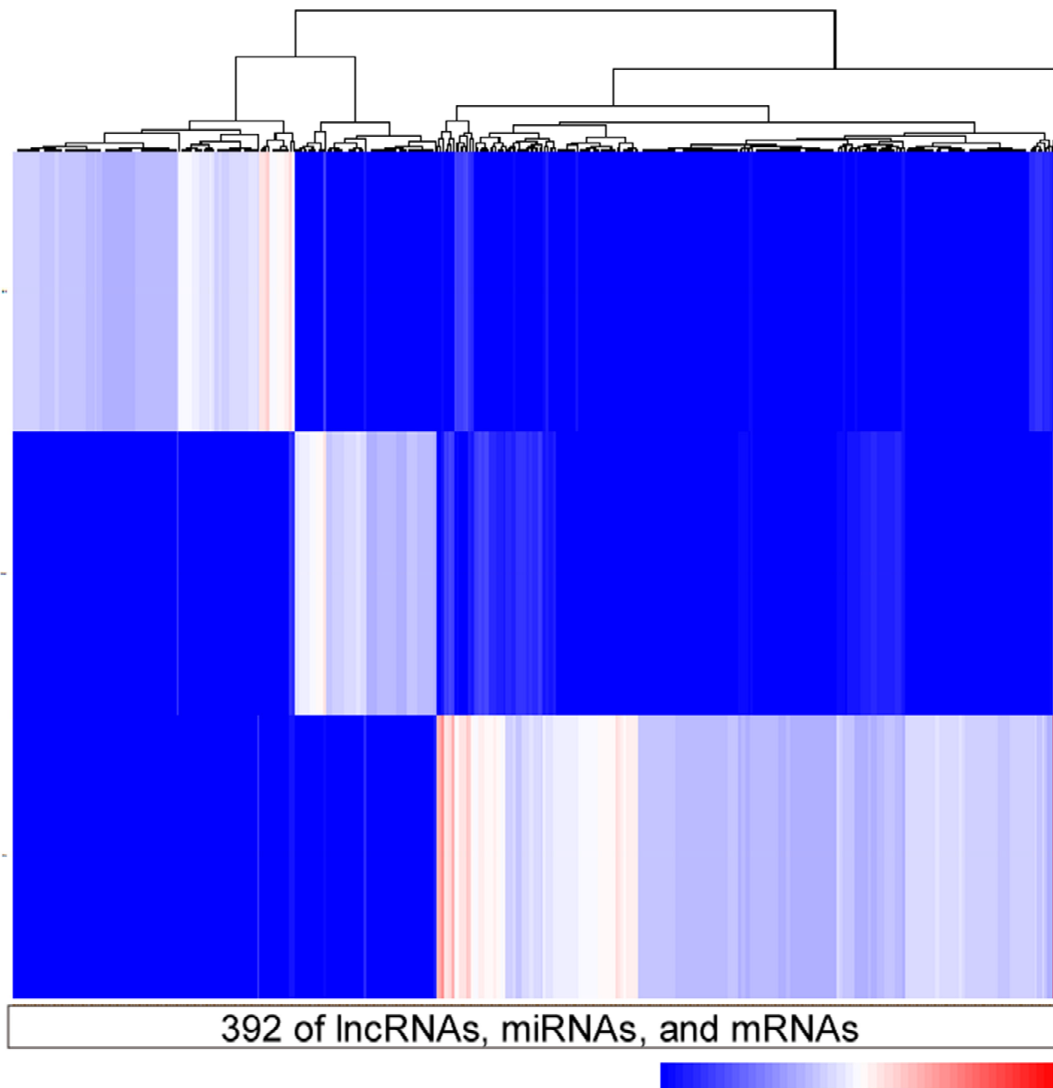
さらに、間質性肺炎合併肺癌、間質性肺炎非合併肺癌、肺癌非合併間質性肺炎の患者を対象として、各群 10 例の末梢血を採取し、エクソソーム解析として末梢血からエクソソームを単離・精製して total RNA を抽出後、定量的 RT-PCR を用いて検出した lncRNA を含む複数の lncRNA 発現レベルを解析することとした。その結果から、間質性肺炎合併肺癌患者のみに発現変化の見える lncRNA 群を特定して、セット化をめざすことにした。

4 . 研究成果

同意を取得した間質性肺炎合併非小細胞肺癌 4 例および間質性肺炎非合併非小細胞肺癌 6 例の外科切除検体から、間質性肺炎合併非小細胞肺癌の癌組織および癌周囲の間質性肺炎組織、間質性肺炎非合併非小細胞肺癌の癌組織および癌周囲肺組織を採取した。各組織より抽出した total RNA の Quality check、臨床病理学的情報特徴の調整等を行い、最終的に間質性肺炎合併非小細胞肺癌 3 例、間質性肺炎非合併非小細胞肺癌 4 例の検体から採取した total RNA を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。

RNA-seq 解析にて得られた結果から、間質性肺炎合併肺癌組織および間質性肺炎組織におけるデータを正常肺組織、間質性肺炎非合併肺癌組織と比較したところ、特徴的な発現パターン、ピークが認められた (図 1)。抽出されたデータを、研究協力者であるかずさ DNA 研究所平川英樹博士の協力のもと解析したところ、正常肺組織、間質性肺炎非合併肺癌組織と比較して、間質性肺炎合併肺癌組織および間質性肺炎組織で 392 の lncRNA、miRNA、mRNA において、共通して有意に発現が変化していた (図 2)。その後、間質性肺炎と肺癌の共通発症・進展機構に関わって

図2 間質性肺炎合併肺癌の間質性肺炎組織と肺癌組織における遺伝子発現クラスタリング



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	石川 雄一 (Ishikawa Yuichi) (80222975)		
研究協力者	古川 欣也 (Furukawa Kinya) (20246292)		
研究協力者	平川 英樹 (Hirakawa Hideki) (80372746)		
研究協力者	大沼 文恵 (Onuma Fumie)		

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
---------	---------