

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591008

研究課題名（和文） 肺癌に対するマイクロ RNA を用いた薬剤感受性予測と治療法の開発

研究課題名（英文） Prediction of drug sensitivity and development of a therapeutic strategy by microRNAs in lung cancer

研究代表者

清家 正博 (SEIKE MASAHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30366687

研究成果の概要（和文）：

肺癌の薬剤効果に関わるマイクロ RNA (miRNA) を明らかにし、肺癌の新たな治療法を開発することを目的に研究を遂行した。まず肺癌細胞株 30 株に対する網羅的 miRNA 発現解析を行い、9 種類の抗癌剤感受性に関わる 4 個の miRNA (miR-21, miR-31, miR-193b, miR-365) を同定した。次に新規分子標的薬剤である Enzastaurin に関し、miR-21 が JAK/STAT 経路活性化により発現制御を受け薬剤効果に関与することを明らかにした。最後に miR-23a/24/27 cluster と上皮間葉移行 (EMT) の関係について検討し、miR-23a が E-cadherin を標的因子として TGFβ 誘導 EMT を制御し、EGFR-TKI 耐性を導くことを明らかにした。これら薬剤感受性 miRNA の制御は肺癌の新たな治療戦略の 1 つになり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We tried to identify microRNAs (miRNAs) associated with drug sensitivity of lung cancer and establish a new therapeutic strategy in lung cancer. First, we analyzed miRNA expression profiles of 30 lung cancer cell lines using Taqman MicroRNA Arrays. Four miRNAs (miR-21, miR-31, miR-193b and miR-365) were common miRNAs correlated with the sensitivity of lung cancer to nine anticancer drugs. Next, we analyzed the antitumor effects of enzastaurin in 22 lung cancer cell lines. To identify miRNA associated with this sensitivity, we conducted a miRNA expression profiling study on the same set of cell lines. We found that miR-21 affects the response to enzastaurin through the JAK/STAT signaling pathway in lung cancer. Finally, we analyzed miR-23a/24/27a expression in 10 non-small cell cancer cell lines by real-time PCR analysis. Correlation between expression of these miRNAs and epithelial-mesenchymal transition (EMT) was evaluated. We found that miR-23a regulated TGF-β-induced EMT by targeting E-cadherin and contributed to EGFR-TKI resistance of lung cancer cells. These miRNAs associated with drug sensitivity may be useful as new therapeutic targets in lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：マイクロ RNA、肺癌、薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロ RNA (miRNA) は約 22 塩基配列からなる低分子 RNA の一種で、転写後修飾調節機構を有し、癌抑制遺伝子や癌遺伝子発現をコントロールし、癌の腫瘍形成や薬剤耐性等のプロセスにおいて重要な役割を担うことが報告されている。

(2) 我々はこれまでに肺癌手術組織を用いた網羅的 miRNA 発現プロファイリングにて、肺腺癌患者の予後と相関する 2 つの miRNA (let7a, miR-155) の同定に成功し、miRNA 発現異常が、肺癌の診断や予後因子になることを見出した。次なる研究戦略として求められることは、薬剤感受性や治療戦略に関わる miRNA の意義についてである。

(3) 肺癌においては、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 感受性に関わる EGFR 遺伝子変異の発見など薬剤感受性に関わる分子生物学的意義が明らかになってきた。癌抑制遺伝子や癌遺伝子の発現とリンクする miRNA の薬剤感受性への意義を明らかにすることは、肺癌の個別化医療や新規治療法の開発にも繋がる研究である。

2. 研究の目的

(1) 肺癌に対する薬剤感受性 miRNA の同定と miRNA を用いた感受性予測法の構築

(2) miRNA を用いた肺癌新規治療法の開発

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株 30 株パネルを用いた miRNA array による網羅的発現解析

(2) 肺癌細胞株 30 株パネルを用いたトランスク립トームおよびプロテオーム解析。

(3) 薬剤感受性予測モデルの構築。

(4) Tissue array と臨床サンプルを用いた薬剤感受性 miRNA と感受性予測法の検証。

(5) 肺癌細胞株を用いた miRNA 導入および抑制による新規治療法の開発および動物モデルでバリデーション。

4. 研究成果

(1) 肺癌細胞株 30 株に対する 8 種類の殺細胞性抗癌剤と gefitinib の薬剤感受性試験と miRNA 発現解析を行い、各薬剤感受性 miRNA を探索した (図 1)。この中から 9 種類の抗癌剤感受性に共通に関わる 4 個の miRNA (miR-21, miR-31, miR-193b, miR-365) と各薬剤効果に関わる miRNA を明らかにした (図 2)。現在これらの薬剤感受性 miRNA を用いた殺細胞性抗癌剤の効果増強に向けた機能解析を行っている。これにより、既知の肺癌の殺細胞性抗癌剤を用いた新たな治療戦略の構築を目指している。

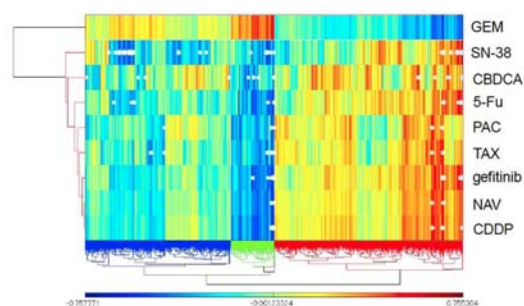


図 1 肺癌細胞株の薬剤感受性 miRNA クラスタリング

	CDDP	CBDCA	DTX	PAC	NAV	GEM	SN-38	5-FU	gefitinib
miR-31	-0.74	-0.64	-0.55	-0.47	-0.67	0.70	-0.55	-0.65	-0.67
miR-193	-0.67	-0.18	-0.59	-0.33	-0.64	0.64	-0.69	-0.62	-0.67
miR-21	-0.56	-0.39	-0.48	-0.30	-0.56	0.59	-0.48	-0.64	-0.66
miR-365	-0.49	-0.13	-0.41	-0.25	-0.43	0.53	-0.49	-0.59	-0.63

図 2 抗癌剤感受性に関わる miRNA

(2) 肺癌の新規分子標的薬剤である PKC β 阻害剤 (Enzastaurin) は、臨床応用に向けた臨床試験が進行中であるが、薬剤効果に関わるバイオマーカーの同定が求められている。今回 22 の肺癌細胞株を用いた網羅的遺伝子および miRNA 発現解析を行い、Enzastaurin 薬剤効果を予測可能な Eight gene signature を構築した。さらに肺癌の Enzastaurin 感受性においては、JAK1 の活性化および miR-21 が JAK/STAT 経路によって直接に発現制御を受け、薬剤効果に重要な役割を果たしていることを明らかにした (図 2)。以上より JAK1 および miR-21 の発現レベルは肺癌の Enzastaurin 治療効果予測バイオマーカーであり、JAK/STAT3/miR-21 経路が活性化された肺癌患者では Enzastaurin による治療が有効であると考えられた。今回の結果をもとに、JAK1 または miR-21 の発現を基にした Enzastaurin の個別化治療への臨床応用を考えている。

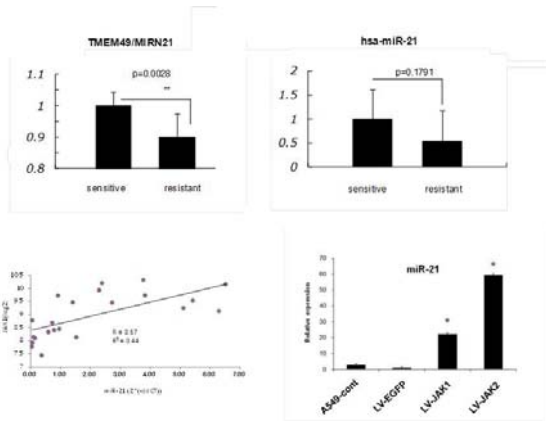


図3 miR-21はJAK/STAT経路活性化により発現誘導されEnzastaurin感受性に関与する

(3) 近年上皮間葉移行 (EMT) が悪性腫瘍の浸潤や転移に関わることが明らかになった。肺癌においても、EMTが薬剤耐性に関係すると報告され、EGFR変異陽性肺癌のキードラッグであるEGFR-TKI (Gefitinib)の耐性メカニズムの1つと報告されている。今回miR-23a/24/27 clusterに注目し、10の肺癌細胞株を用いて、EMTおよびgefitinib耐性に関わるmiRNAについて研究を行った。まず、miR-23aがE-cadherinを標的因子として肺癌細胞のTGFβ誘導のEMTに関与することを明らかにした(図3)。さらに肺癌細胞株にレンチウイルスを用いてmiR-23aを安定発現させることでGefitinib耐性を導くことを見出し(図4)、miR-23aがGefitinib耐性克服に向けての新たな治療標的に成り得る可能性を見出した。

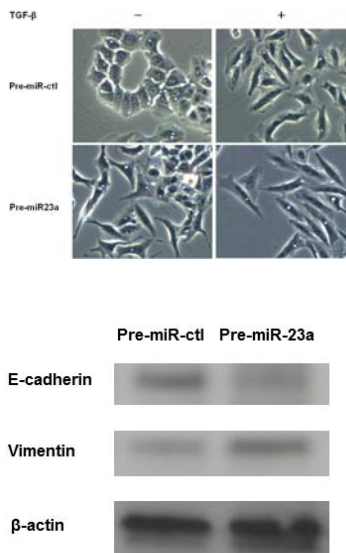


図3 miR-23aはE-cadherinを標的因子としてEMTを誘導する

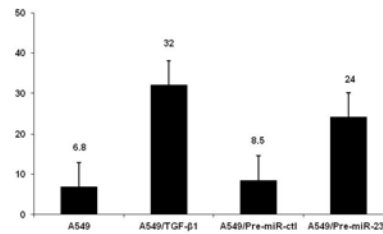
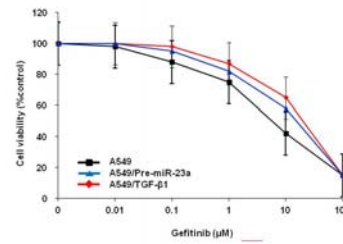


図4 miR-23a過剰発現はgefitinib耐性を誘導する

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3件)

- ① Mengru C, Seike M, Soeno C, Mizutani H, Kitamura K, Minegishi Y, Noro R, Yoshimura A, Gemma A.
MiR-23a regulates TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells. (査読有)
Int J Oncol. 2012. in press.
- ② Shimokawa T, Seike M, Soeno C, Uesaka H, Miyanaga A, Mizutani H, Kitamura K, Minegishi Y, Noro R, Okano T, Yoshimura A, Gemma A.
Enzastaurin has anti-tumour effects in lung cancers with overexpressed JAK pathway molecules. (査読有)
Br J Cancer. 2012;106, 867-875.
doi: 10.1038/bjc.2012.7.
- ③ Mizutani H, Okano T, Minegishi Y, Matsuda K, Sudoh J, Kitamura K, Noro R, Soeno C, Yoshimura A, Seike M, Gemma A.
HSP27 modulates epithelial to mesenchymal transition of lung cancer cells in a Smad-independent manner.
Oncology Letter. (査読有)
2010;1:1011-1016
doi: 10.3892/ol.2010.190

[学会発表] (計10件)

- ① 清家正博、野呂林太郎、峯岸裕司、添野千絵、吉村明修、弦間昭彦、miR-23aはSmad依存的にTGFβ誘導上皮間葉移行(EMT)を制

御する、第70回日本癌学会総会、2011年10月3日、名古屋。

② 清家正博、肺癌の個別化治療とトランスレーショナルリサーチの現状、日本医科大学オーダーマイド医療講演会、2011年9月12日、東京。

③ 清家正博、肺癌の発生と薬剤感受性に関するmiR-21の意義、第20回日本癌病態治療研究会、2011年6月17日、東京。

④ 清家正博、岡野哲也、添野千絵、峯岸裕司、野呂林太郎、吉村明修、弦間昭彦、肺がん細胞の薬剤感受性に関するマイクロRNA発現プロファイル、第69回日本癌学会総会、2010年10月24日、大阪。

⑤ 清家正博、肺癌のEGFR-TKI感受性に関するmicroRNA研究、第5回肺癌分子病態研究会、2010年9月11日、東京。

⑥ Seike M, Smimokawa T, Soeno C, Okano T, Minegishi Y, Yoshimura A and Gemma A. Gene expression profiles in lung cancer cells cooperated with drug sensitivity to PKC inhibitor enzastaurin. 101st AACR Annual Meeting, 2010年4月6日, Washington DC.

⑦ Seike M, Noro R, Soeno C, Shimokawa T, Miyanaga A, Yoshimura A and Gemma A. MicroRNA expression profiles modulate the drug sensitivity of lung cancer cells. 100th AACR Annual Meeting, 2009年4月19日, Denver.

⑧ 清家正博、岡野哲也、吉村明修、弦間昭彦、非喫煙者肺癌およびEGFR-TKI感受性に関するmiR-21の役割、第50回日本肺癌学会総会、2009年11月13日。

⑨ 清家正博、肺癌の診断および治療戦略におけるmiRNA研究、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム、2009年11月7日、東京。

⑩ 清家正博、岡野哲也、吉村明修、弦間昭彦、非喫煙者肺癌およびEGFR-TKI感受性に関するmiR-21の役割、第68回日本癌学会総会、2009年10月2日。

〔図書〕(計1件)

① 清家正博、弦間昭彦、抗癌剤の効果予測因子としてのバイオマーカー、科学評論社、

呼吸器内科, 17(3):234-240, 2010年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清家正博 (SEIKE MASAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30366687

(2) 研究分担者

弦間昭彦 (GEMMA AKIHIKO)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20234651

(3) 連携研究者

峯岸裕司 (MINEGISHI YUJI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80386234