

## 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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590874

研究課題名（和文） 非喫煙者肺がんにおける発癌分子機構の解明とその制御

研究課題名（英文） Molecular Characteristics and Regulations Associated with Lung Carcinogenesis in Never-Smoker

研究代表者

岡野 哲也（OKANO TETSUYA）

埼玉医科大学・医学部 ・ 講師

研究者番号：00339376

研究成果の概要（和文）：

非喫煙者肺がん発生におけるmiRNAの果たす役割とEGFR遺伝子変異によるmiRNAの発現制御機構を明らかにするため、特に発癌との関連が示唆される因子についての機能解析とmiR-21とEGFRシグナルとの調整機構を解析した。非喫煙者の中で特異的に発現の低下が示されたmiR-138についてターゲット遺伝子候補の*hTERT*と負の相関が示され、発癌のメカニズムに関わっている可能性が示された。また、miR-21は、Akt、STAT3などのEGFR下流のシグナル因子とは別に調整に関わり、非喫煙者肺がんに対する新しい治療法開発をもたらし糸口となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Lung cancers in never-smokers have unique miRNA expression profiles as a novel molecular characteristic. MiR-21 is a downstream effector of the activated EGFR signaling pathway and can be a therapeutic target in lung cancers with and without *EGFR* mutations. MiR-138 on 3p21.33, a chromosomal region carrying a long-sought lung cancer suppressor gene, is downregulated in never-smoker cases. There is an inverse correlation between miR-138 and *hTERT* in never-smoker lung cancers. These miRNAs may play an oncogenic role in lung carcinogenesis and miR-21 is novel molecular targets in treatment of lung cancers in never-smokers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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，非喫煙者肺がん，プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんの原因としては、環境・職業的要因、宿主側因子などいくつかの危険因子が考えられている。この中で最大の原因が喫煙である。喫煙者が肺がんになる危険率は非喫煙者の 10～20 倍程度高いと言われており、肺が

ん罹患率の中で、男性では 70.4%，女性では 26.3% が本人の喫煙に起因して発症していると推定されている。これらのことより、女性では多く肺がん患者が喫煙と因果関係が少ないということが推測され、分子生物学的特徴や臨床像は、喫煙者の肺がんとは明らか

に異なっていると考えられる。miRNA (microRNA)は 18~25 塩基からなる低分子量 RNA であり、いわゆる non-coding RNA の一種である。近年、miRNA の発現異常が、肺癌を含む様々ながん種で報告されている。さらに Oncomir と呼ばれるような発がんに関連する miRNAs や癌抑制的に働く miRNAs の詳細が明らかにされようとしている。これらをターゲットとしたがん診断や治療への応用が考えられている。これまでに肺癌と miRNA 発現解析の結果で非喫煙者、または、喫煙者肺癌に関連したそれぞれの miRNA の発現異常が明らかとなり、より一層、肺癌の病態理解が可能になったと考えられた。さらに、この解析で miR-138 は、非喫煙者の中で特異的に発現低下が示された。miR-138 の locus は 3p21.33 に局在しており、同部位は肺癌の癌抑制遺伝子候補の存在部位として重要であると考えられている。また、我々の研究報告では、EGFR 遺伝子変異の症例と野生型の症例での比較解析で最も発現上昇を認めた miR-21 を Knockdown することで EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (EGFR-TKI) AG1478 との相乗効果が示された。

## 2. 研究の目的

本研究では、非喫煙者肺癌発生における miRNA の果たす役割を解明するため、(1)非喫煙者肺癌の miRNA の発現プロファイル解析で、特に発癌との関連が示唆される因子について *in vitro* で機能解析を行う。

(2)非喫煙者肺癌に頻度が多いとされている EGFR 遺伝子変異が果たす miRNA の発現制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ターゲット遺伝子の検索

非喫煙者肺癌の miRNA プロファイルの中で優位に発現の変動が認められた miRNAs につて 3 つ (TargetScan, Microcosm, PicTar-Vert) のデータベースからターゲットとなり得る遺伝子を検討する。

### (2) *hTERT* 遺伝子発現への miR-138 発現変動の影響の解析

肺癌細胞株を用いて miR-138、*hTERT* 遺伝子の発現解析

TaqMan Human MicroRNA Assay kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて各肺癌細胞から Total RNA 抽出をして microRNA の RT 反応を行い、PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) を使用して定量的 RT-PCR 法にて発現解析を行った。内部標準として RNU6B (#4373381, Applied Biosystems) を使用した。Precursor miR-138 の mutation 解析

miR-138 の局在部位は 3p21.33 であり、同部位は、肺癌で多くの遺伝子異常の報告があるため、DNA PCR 法と Direct sequence 法を用いて遺伝子変異解析を行った。

miR-138 Knockdown と Overexpression による *hTERT* 遺伝子の発現変動解析

miR-138 siRNA または、pre-miR-138 の transfection を行い、miR-138 発現を調整した。各トランスフェクション細胞から Total RNA 抽出後に microRNA の RT 反応を施行し、各サンプルを定量的 RT-PCR 法にて解析した。

### (3) miR-21 と EGFR シグナルとの調整機構の解明

EGFR のリガンドである EGF によって miR-21 の発現が亢進され、さらに EGFR-TKI (AG1478) 暴露でその発現を抑制することが示された。EGFR シグナルとの調整機構を解明するために下流のシグナル因子 (Akt, STAT3 など) との関連を検討した。

miR-21 の Knockdown と Overexpression による p-Akt, p-STAT3 の発現変動解析

miR-21 siRNA または、pre-miR-21 の transfection を行い、miR-21 発現を調整した。各トランスフェクション細胞からタンパク質を抽出後に Western blot 法にてタンパク質発現解析を行った。

Akt, STAT3 の Knockdown による miR-21 の発現変動

Akt, STAT3 siRNA の transfection を行い、Total RNA を抽出後に microRNA の RT 反応、定量的 RT-PCR 法にて miR-21 発現解析して、その変動を調べた。

### (4) EGFR 遺伝子変異に関する網羅的タンパク質発現解析

EGFR 遺伝子変異を伴う肺癌細胞株 (PC9) と野生型 (A549) を用いて蛍光 2 次元電気泳動法により優位に変動するタンパク質プロファイルを検討する。

各肺癌細胞株からタンパク質を抽出して、サンプル調整、蛍光ラベル標識後に 2D-DIGE による電気泳動を行った。得られたタンパク質プロファイルから統計学的解析を行い、有意な発現差を認めるタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

非喫煙者肺癌症例で特異的な miRNA の発現変化を示した miR-138 の標的遺伝子候補をデータベース (TargetScan, Microcosm, PicTar-Vert) から選択し、検討を行った。それらの結果から肺癌を含む様々ながん種の発癌・腫瘍増殖に関与している human telomerase reverse transcriptase gene

(*hTERT*)がターゲット遺伝子候補としてあげられた。定量的RT-PCR法にて7つの肺がん細胞株を用いてmiR-138と*hTERT*遺伝子の発現解析を行った。

miR-138の発現調節を行った機能解析では、miR-138の発現をoverexpressionすることで*hTERT*遺伝子の発現を負に調整し(図1A,B) siRNAを用いたKnockdownでは*hTERT*遺伝子発現が亢進することを見出した(図2A,B)。

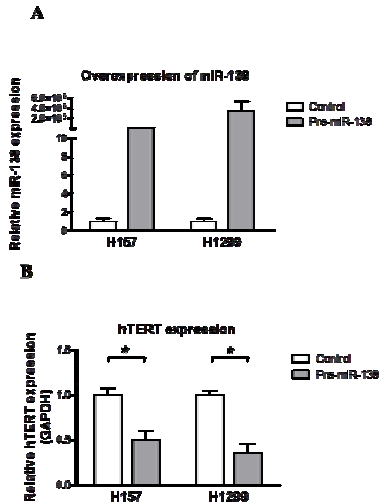


図1 (A) 肺がん細胞株(H157,H1299)においてpre-miR-138の導入を行い、miR-138の過剰発現を行った。(B) miR-138の過剰発現を行うことで*hTERT*遺伝子発現が抑制された。

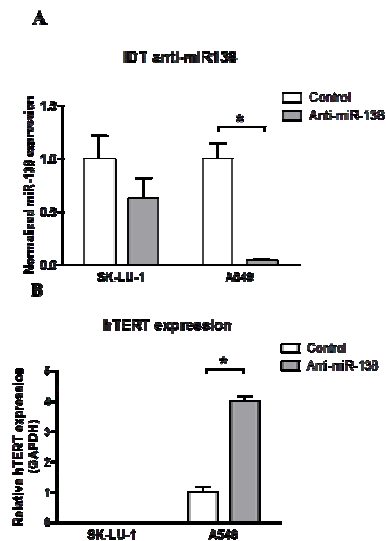


図2 (A) 肺がん細胞株(A549)においてmiR-138 siRNAを用いてmiR-138のKnockdownを行った。(B) miR-138のKnockdownを行うことで*hTERT*遺伝子発現が亢進された。

また、miR-138の局在部位は3p21.33であり、同部位は、肺がんで多くの遺伝子異常の報告があることによりPrecursor miR-138のmutation解析をDirect sequence法を用いて

遺伝子変異解析を行ったが、異常は認められなかった。

我々の以前の研究でmiR-21は、EGFR遺伝子変異に関するmiRNA発現プロファイルで最も発現の亢進を認めた。また、EGFRのリガンドであるEGFによってmiR-21の発現が亢進され、EGFR-TKI (AG1478)暴露でその発現を抑制することで、miR-21はEGFRシグナルとの関連が示された。今回、miR-21とEGFRシグナルとの調整機構を解明するために下流のシグナル因子(Akt、STAT3など)との関係について解析を行った。結果としてmiR-21の発現をsiRNAを用いてKnockdownを行ってもAkt、STAT3の発現に変動は認めず、さらにPre-miR-21の導入を行い、miR-21を過剰発現させても両者に変動は認めなかった(図3A,B)。

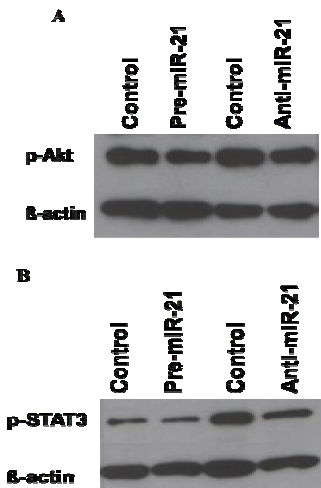
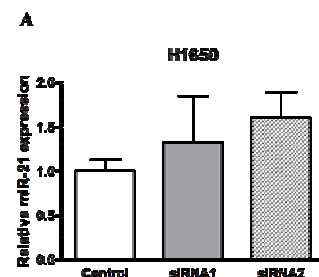


図3 (A) 肺がん細胞株(H3255)においてmiR-21siRNA または、pre-miR-21の導入を行い、p-Aktのタンパク質発現を解析したが変動は見られなかった。(B) p-STAT3のタンパク質発現解析でも同様に変動は見られなかった。

次に、AktとSTAT3の両因子をKnockdownすることによりmiR-21発現の変動を解析したが、いずれも有意な変化は認めなかった(図4A,B)。



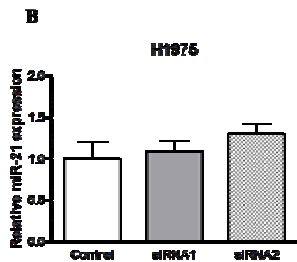


図4 (A) 肺がん細胞株(H1650)において STAT3 siRNA 1、STAT3 siRNA 2の導入を行ったが、いずれの細胞でもmiR-21発現の有意な変動は見られなかった。(B) 肺がん細胞株(H1975)においても同様にmiR-21発現の変動は認めなかった。

この結果からmiR-21は、Akt、STAT3などのEGFR下流のシグナル因子とは別に細胞増殖の調整に関わり、発癌に関連していることが示唆された。

我々のこれまでの研究で、肺がん組織検体を用いたEGFR遺伝子変異に関する網羅的なタンパク質発現解析の結果、9個のタンパク質に有意な変動を認めた。今回、EGFR遺伝子変異を認める肺がん細胞株(PC9)と野生型株(A549)との2群間で発現解析を行い、両群間で有意に発現差を認める11個のタンパク質スポットが同定された。そのうち9つのタンパク質が発現亢進し、2つタンパク質の発現が減少していた。これらのタンパク質とmiR-21との関連を調査する課題はあるものの、これらの知見は、EGFR遺伝子変異陽性の非喫煙者肺がんに対する新しい治療法開発をもたらす糸口となる可能性が示唆された。

## 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 9件)

Noro R, Yoshimura A, Yamamoto K, Miyanaga A, Mizutani H, Minegishi Y, Seike M, Kubota K, Kosaihiro S, Hino M, Ando M, Nomura K, Okano T, Kobayashi K, Uematsu K, Gemma A. Alternating chemotherapy with amrubicin plus cisplatin and weekly administration of irinotecan plus cisplatin for extensive-stage small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 査読有 33(3) 巻、2013、1117-23

Yoshimura A, Noro R, Miyanaga A, Mizutani H, Kosaihiro S, Minegishi Y, Seike M, Hino M, Ando M, Nomura K, Okano T, Kobayashi K, Gemma A. Combination chemotherapy of alternating etoposide and carboplatin

with weekly administration of irinotecan and cisplatin in extensive-stage small-cell lung cancer. *Anticancer Res.* 査読有、32(10) 巻、2012、4473-8

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. *Br J Cancer.* 査読有、106 巻、2012、867 - 75  
doi: 10.1038/bjc.2012.7.

Tada Y, Okano T, Kaga A, Yamazaki S, Kawada S, Ishida M, Kobayashi K, Onishi H. Dissociative stupor mimicking consciousness disorder in an advanced lung cancer patient. *Jpn J Clin Oncol.* 査読有、42(6) 巻、2012、548-51  
doi: 10.1093/jjco/hys053.

Rinako Ishikawa, Tetsuya Okano, Nobuyuki Koyama, Erika Saito, Akiko Kaga, Harue Utsugi, Tomohiko Mio, Hisayoshi Daito, Yuri Maeno, Yuka Uchida, Yoshiaki Nagai, Yoshitake Murayama, Kunihiro Kobayashi, Successful treatment of carcinomatous meningitis with erlotinib and whole brain radiotherapy. *Ann. Cancer Res. Ther.* 査読有、20(2) 巻、2012、58-62

Minegishi Y, Kuribayashi H, Kitamura K, Mizutani H, Kosaihiro S, Okano T, Seike M, Azuma A, Yoshimura A, Kudoh S, Gemma A. The feasibility study of Carboplatin plus Etoposide for advanced small cell lung cancer with idiopathic interstitial pneumonias. *J Thorac Oncol.* 査読有、6(4) 巻、2011、801-7  
doi: 10.1097/JTO.0b013e3182103d3c

Noro R, Miyanaga A, Minegishi Y, Okano T, Seike M, Soeno C, Kataoka K, Matsuda K, Yoshimura A, Gemma A. Cancer Sci. 2010 Histone deacetylase inhibitor enhances sensitivity of non-small-cell lung cancer cells to 5-FU/S-1 via down-regulation of thymidylate synthase expression and up-regulation of p21(waf1/cip1) expression. *Cancer Sci.* 査読有、6 巻、2010、1424-30

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 LETTERS、査読有、6 巻 2010、  
1011-1016

岡野 哲也 肺癌の現状について 都臨技  
会誌、査読無、5 巻、2010、391-400

〔学会発表〕(計 3 件)

岡野 哲也 非喫煙者肺がんにおける発癌  
分子機構の解明 第 53 回 日本肺癌学  
会総会2012年11月8日~9日 岡山市

岡野 哲也 EGFR をめぐる基礎研究の展開  
第9回日本臨床腫瘍学会学術集会シンポ  
ジウム2 2011年7月22日パシフ  
イコ横浜

岡野 哲也 肺がんの多段階発がんについ  
ての網羅的機能解析 第78回日本医  
科大学医学会総会 2010年9月4日  
日本医科大学(東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氏名(岡野 哲也)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00339376

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：