

## 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 6 月 20 日現在

機関番号： 82504  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22591559  
 研究課題名（和文） 喫煙関連肺癌に対する新規治療法開発のための機能性 RNA ネットワークの解明  
 研究課題名（英文） Anti-proliferative miRNA expression in squamous cell carcinoma of the lung: Pursue for the common therapeutic targets of the tobacco-related cancer  
 研究代表者  
 守屋 康充（MORIYA YASUMITSU）  
 千葉県がんセンター（研究局）・その他部局等・主任医長  
 研究者番号： 90375692

研究成果の概要（和文）：肺扁平上皮癌手術検体から抽出したマイクロRNA（miRNA）の網羅的発現解析を行い、肺扁平上皮癌において腫瘍部で発現が抑制されている特徴的なmiRNA群を抽出した。これらのmiRNAを検討したところ、細胞増殖を有意に抑制していることが認められ、さらに標的遺伝子群を見出すことができた。他の喫煙関連がんとの比較検討から、このmiRNAは喫煙関連がんの腫瘍部で共通して発現が抑制されていることが認められた。この結果より喫煙関連がんに共通する発癌過程の解明、治療標的の開発に応用できる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In tobacco-related cancers including lung squamous cell carcinoma, disorder of anti-proliferative miRNA expression may be involved in the pathogenesis, and one of the miRNAs is likely to be a candidate of molecular targets. Now the referred miRNA is further analyzed for the expression status in a large series of clinical lung cancers.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌、マイクロアレイ、ゲノム、マイクロ RNA、遺伝子、外科

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療薬として開発されたゲフィチニブの治療効果は、肺腺癌における EGFR 遺伝子変異の有無と相関があることが見出され、注目を浴びている。このような肺腺癌は女性、非喫煙者に多く、喫煙非関連肺癌の一類型と考えられるようになっているが、扁平上皮癌など主に喫煙を発症要因とする肺癌に対する分子標的治療薬は未だ開発されていない。

## 2. 研究の目的

喫煙関連肺癌および非関連肺癌のマイクロ RNA の網羅的発現解析を行い、我々がすでに有する肺癌 cDNA 発現プロファイルおよび他の喫煙関連がんにおける発現プロファイルとの比較検討から喫煙関連肺癌の新しい機能性 RNA 分子ネットワークを解明し、核酸医薬として応用できるような治療標的を探索し、検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 喫煙を発症要因とする肺癌と喫煙と関連がない肺癌の各手術検体の腫瘍組織および正常肺組織から RNA を抽出し、665 種類のマイクロ RNA (miRNA) の網羅的発現解析を行い、喫煙関連および非関連肺癌の miRNA 発現プロファイルを作製する。

(2) 喫煙関連肺癌から得られた miRNA 発現プロファイルと他の喫煙関連がんから得られた miRNA 発現プロファイルとをバイオインフォマティクスを駆使して解析する。さらに我々が既に有する肺癌手術検体の cDNA 発現プロファイルと公共のデータベースも用いて、miRNA の標的となるタンパクコード遺伝子群を探索し、新しい分子ネットワークを解明する。

(3) 癌の増殖や浸潤に関わる miRNA を肺癌由来の癌細胞株において導入実験を施行し、将来的に治療標的分子、核酸医薬の候補となるか検討する。

### 4. 研究成果

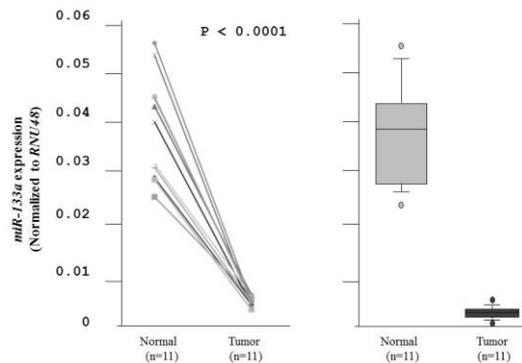
(1) miRNA の網羅的発現解析によって肺扁平上皮癌に関連した特徴的な miRNA を抽出することが可能であった。(表 1)

	miRNA	Normalized data		Fold Change Tumor/Normal	p-value
		Normal	Tumor		
1	miR-133a	0.03655	0.00224	0.0613	1.64E-02
2	miR-1247	0.00695	0.00048	0.0695	6.19E-03
3	miR-206	0.00116	0.00012	0.1055	4.27E-02
4	miR-99b	0.00351	0.00043	0.1217	3.53E-02
5	miR-139	0.0921	0.01138	0.1236	2.64E-03
6	miR-30a-3p	0.30994	0.05335	0.1721	1.16E-02
7	miR-138	0.09074	0.01959	0.2159	2.00E-02
8	miR-126	11.1672	2.4132	0.2161	4.92E-02
9	miR-30e	0.20773	0.05111	0.2461	1.51E-02
10	miR-26a	0.00131	0.00033	0.2527	9.52E-03
11	miR-140	0.04569	0.01209	0.2646	7.29E-03
12	miR-34b	0.03143	0.00863	0.2745	2.12E-02
13	miR-574	0.42691	0.12074	0.2828	1.68E-02
14	miR-628-5p	0.01294	0.00366	0.2831	3.17E-03
15	miR-186	0.39553	0.11448	0.2894	8.90E-03

(表 1) 肺扁平上皮癌切除検体において正常肺組織に比較して腫瘍組織で発現抑制されている miRNA

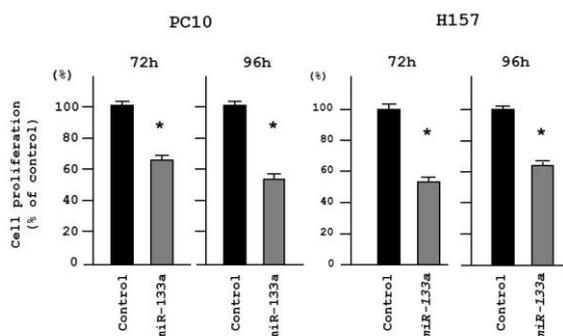
(2) 肺扁平上皮癌において腫瘍組織で最も発現が抑制されていた miR-133a に関して、別の肺扁平上皮癌切除検体において、

real-time RT-PCR で検討したところ、miR-133a は正常肺組織に比較して腫瘍組織で有意に発現抑制されていた。(図 1)



(図 1) 肺扁平上皮癌切除検体 (正常肺組織、腫瘍組織) における miR-133a 発現解析結果

(3) 肺扁平上皮癌由来細胞株 (PC10, H157) に miR-133a を導入し、XTT assay で細胞増殖機能解析を行ったところ、どちらの細胞株においても、miR-133a 導入細胞株は 72 時間後、96 時間後に増殖が抑制されており、miR-133a は細胞増殖抑制機能を有することが認められた。(図 2)



(図 2) miR-133a 導入細胞株 (PC10, H157) における細胞増殖機能解析結果 (XTT assay)

(4) 他臓器癌 (食道癌、膀胱癌) における miRNA の網羅的発現解析結果と肺扁平上皮癌の発現解析結果の比較検討で、miR-133a は共通して細胞増殖抑制機能を有することが認められた。

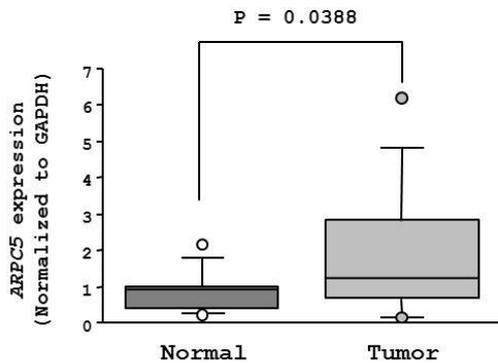
(5) 肺扁平上皮癌由来細胞株 (PC10, H157) に miR-133a を導入し、マイクロアレイで網羅的発現解析を行ったところ、発現抑制されている候補遺伝子群が抽出された。(表 2) miRNA ターゲット予測プログラムで解析した結果、target site を有する遺伝子群のなか

で ARPC5、GSTP1 などが miR-133a の標的遺伝子候補と認められた。

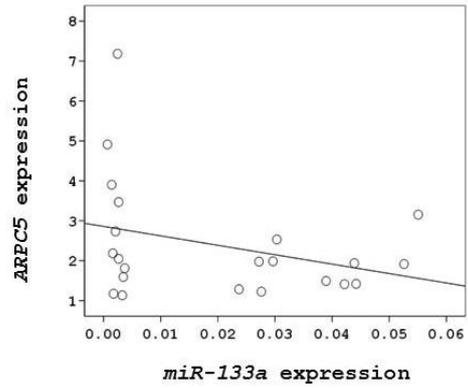
No.	Entrez gene ID	Symbol	Gene name
1	51776	ZAK	Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK
2	8407	TAGLN2	Transgelin 2
3	23204	ARL6IP1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
4	79026	AHNAK	AHNAK nucleoprotein
5	1500	CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1
6	10092	ARPC5	Actin-related protein 2/3 complex, subunit 5, 16kDa
7	29956	LASS2	LAG1 homolog, ceramide synthase 2
8	27166	PRELID1	PREL1 domain containing 1
9	2950	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
10	124152	IQCK	IQ motif containing K
11	255758	TCTEX1D2	Tctex1 domain containing 2
12	7168	TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)
13	2512	FTL	Femlin, light polypeptide
14	65977	PLEKHA3	Pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 3
15	2760	GM2A	GM2 ganglioside activator
16	200232	C20orf106	Chromosome 20 open reading frame 106
17	55435	APIAR	Adaptor-related protein complex 1 associated regulatory protein
18	80127	C14orf45	Chromosome 14 open reading frame 45
19	10944	C11orf58	Chromosome 11 open reading frame 58
20	10952	SEC61B	Sec61 beta subunit
21	9208	LRRFIP1	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
22	359821	MRPL42P5	Mitochondrial ribosomal protein L42 pseudogene 5
23	58472	SQRDL	Sulfide quinone reductase-like (yeast)
24	7171	TPM4	Tropomyosin 4
25	100133263	LOC100133263	Hypothetical LOC100133263
26	56005	C19orf10	Chromosome 19 open reading frame 10
27	145694	LOC145694	Hypothetical protein LOC145694
28	1389	CREBL2	cAMP responsive element binding protein-like 2
29	10186	LHPF	Lipoma HMGIC fusion partner
30	54842	MFSO6	Major facilitator superfamily domain containing 6

(表 2) miR-133a 導入細胞株 (PC10, H157) におけるマイクロアレイ解析で発現抑制されていた候補遺伝子群

(6) miR-133a 標的遺伝子候補の ARPC5 に関して、肺扁平上皮癌切除検体において、real-time RT-PCR で検討したところ、ARPC5 は腫瘍組織に比較して正常肺組織で有意に発現が低下していた (図 3)。また、肺扁平上皮癌切除検体において、miR-133a の発現と ARPC5 の発現には相関が認められた。(図 4)

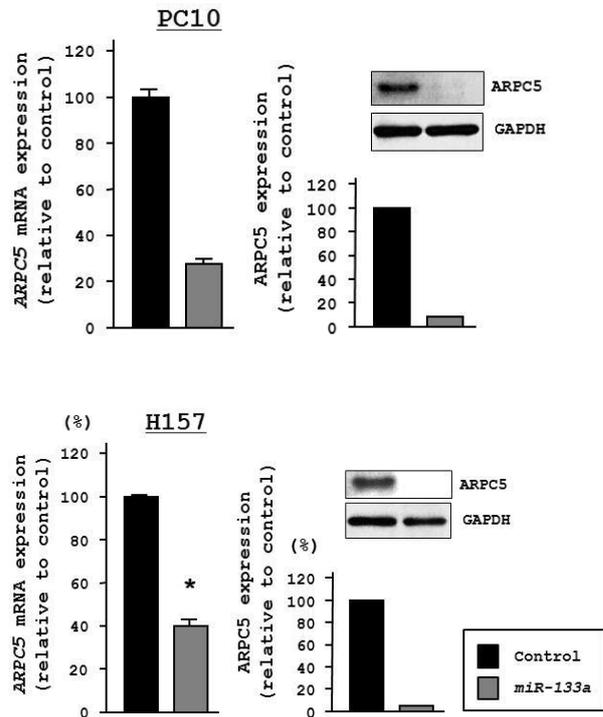


(図 3) 肺扁平上皮癌切除検体 (正常肺組織、腫瘍組織) における ARPC5 発現解析結果 (real time RT-PCR)



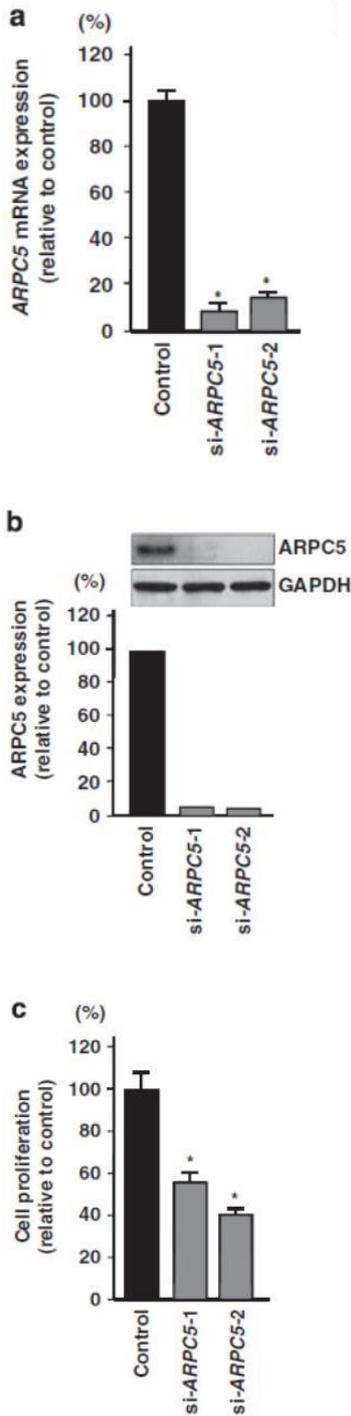
(図 4) 肺扁平上皮癌切除検体における miR-133a と ARPC5 発現解析の相関結果

(7) miR-133a 導入肺扁平上皮癌由来細胞株 (PC10, H157) において、ARPC5 は mRNA、protein レベルで発現が抑制されていた。(図 5)



(図 5) miR-133a 導入肺扁平上皮癌由来細胞株 (PC10, H157) における ARPC5 の発現解析結果

(8) 肺扁平上皮癌由来細胞株 (PC10) に si-ARPC5 を導入したところ、ARPC5 は mRNA、protein レベルで発現が抑制されていた。また細胞増殖機能が抑制されていた。(図 6)



(図6) si-ARPC5を導入した肺扁平上皮癌由来細胞株(PC10)におけるARPC5の機能解析結果

## 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 1 件)

- ① Moriya Y, Yoshino I, Seki N et al. Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel molecular networks in lung squamous cell carcinoma. *Journal of Human Genetics*. 査読有, 2012, 57: 38-45.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Moriya Y et al., Anti-proliferative microRNA expression in squamous cell carcinoma of the lung. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Lung Cancer Conference. 2012年11月、福岡
- ② 守屋康充、他 肺扁平上皮癌におけるmicroRNA-133aの機能解析および標的遺伝子の探索、第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月、千葉
- ③ 守屋康充、他 肺扁平上皮癌における増殖抑制性microRNAの同定：喫煙関連癌における分子標的の解明、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月、東京
- ④ 守屋康充、他 マイクロRNA発現プロファイルに基づく肺扁平上皮癌の新たな治療標的の探索、第51回日本肺癌学会総会、2010年11月、広島
- ⑤ 守屋康充、他 Identification of tumorsuppressive miRNAs by miRNA expression signature in squamous cell carcinoma、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

守屋 康充 (MORIYA YASUMITSU)

千葉県がんセンター・その他部局等・主任  
医長

研究者番号：90375692

### (2) 研究分担者

吉野 一郎 (YOSHINO ICHIRO)

千葉大学大学院・医学研究院・教授

研究者番号：40281547

関 直彦 (SEKI NAOHICO)

千葉大学大学院・医学研究院・准教授

研究者番号：50345013