

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790920
研究課題名(和文) microRNAを指標とした肺癌診断マーカーの開発及び発癌メカニ
ズムの解明
研究課題名(英文) Identification of microRNAs differentially expressed between lung
squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma.
研究代表者
浜本 純子 (HAMAMOTO JUNKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40570239

研究成果の概要（和文）：

本研究代表者は肺癌の腺癌と扁平上皮癌の組織分類診断マーカーとなりうる分子として3つの microRNA を同定した (Molecular Medicine Reports, 2013)。また、3分子のうちの1つである miR-375 の過剰発現が肺癌細胞株の浸潤能を促進することを発見した。その機序に関わる miR-375 の新たな標的遺伝子の候補として、Claudin-1 を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：

We identified three microRNAs as diagnosis markers differentially expressed between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (Molecular Medicine Reports, 2013). We found that overexpression of mi-375, one of these markers, promote the invasive capacity of a lung cell line (SK-MES-1) and claudin-1 is involved in this pathway as a target of miR-375.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦および世界において癌死亡の

第一位でありさらに増加傾向にある。種々の治療法の進歩にもかかわらず肺癌の平均5年生存率は15%以下であり、治療の新たな標的となる分子生物学的特徴を解明することが切実に求められている。近年様々な microRNA が細胞の増殖やシグナリングに関与することが明らかになっており、癌においても microRNA の重要性は広く認識されている。一方、非小細胞肺癌の化学療法において扁平上皮癌ではない癌に特異的に奏効する pemetrexed や bevacizumab などの薬剤が使用されるようになったため、扁平上皮癌での副作用を回避しよりよい薬剤の効果を得られるようにするためには腺癌と扁平上皮癌を正確に見分けることが必要となってきた。

我々は、肺癌の 86 臨床検体から microRNA を含む RNA を抽出し、TaqMan Human MicroRNA Array v2.0 を用いて定量 RT-PCR (Applied Biosystems) により 377 種類の microRNA 発現量を網羅的に測定・解析した結果、腺癌と扁平上皮癌で発現量が異なる microRNA として miR-196b, miR-205, miR-375 を同定した (図1)。これら分子の発現量が腺癌と扁平上皮癌を見分ける診断マーカーとして適当かどうかを調べるために ROC 解析を行ったところ、AUC は 0.8 より大きくなりどれもよい診断マーカーとなることが示唆された。さらに3つのマーカーを組み合わせた判別関数は単独のマーカーによる診断よりも感度が上がり、扁平上皮癌も腺癌も約 80%の感度で判別できることがわかった。これらの現象は異なるグループの 88 検体においても確認できた。

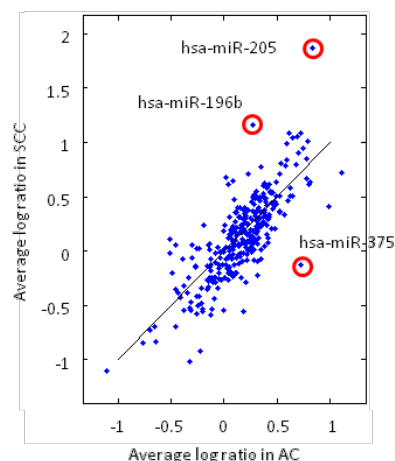


図1 腺癌と扁平上皮癌で発現量の異なる microRNA の同定

Mitchell らは、血清または血漿における microRNA の検出ががんを発見する効果的な戦略となりうることを明らかにした (Mitchell et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2008)。そこで我々も、上記に示した事象が血液検体からも実証できるかどうかを目的の一つとして検討を行う。

我々が扁平上皮癌と腺癌で発現量が異なることを見出した miR-205 と miR-375 はそれぞれ PI3K pathway を制御する PTEN と PDK1 を標的として発現を低下させることが報告されている (Greene et al, J Cell Sci 2010, El Ouaamari et al, Diabetes 2008)。一方、EGFR 変異陽性の腺癌では PI3K pathway が活性化されているものの、一般的に扁平上皮癌では PI3K の遺伝子増幅により腺癌に比べて PI3K pathway が活性化していることはよく知られている。これらのことを考え合わせると、我々が早期組織分類診断マーカーになりうる分子として見出した microRNA が腺癌と扁平上皮癌の PI3K pathway の活性の違いという点において機能的にも寄与していること

が考えられた。そこで、これら3つの microRNA が腺癌と扁平上皮癌の特性に影響を与えるという仮説を立て(図3)、詳細な検討を行うことをもう一つの目的とする。

2. 研究の目的

(1)本研究においてはまず肺癌患者の血清から各 microRNA が検出されるかどうか、組織での発現との相関はあるか、その発現量が健常者と有意に異なるのか、腺癌と扁平上皮癌の分類に有用であるか、早期診断に有用であるか、ステージなどの臨床情報と発現量に相関はあるのかなどを明らかにすることを指標として検討を行う。

(2)PI3K pathway との関連性については発癌あるいはその維持への関与を解明するとともに、microRNA そのものが治療標的となり得るか否かについても検討する。

3. 研究の方法

(1)診断マーカーとしての開発に関しては、血液検体から3つの microRNA が測定可能かどうか及び手術検体で検証された組織分類が可能かどうかを検討する。

(2)また、種々の肺癌細胞における3つの microRNA の発現を検討した上で、使用する細胞株については既に選定しており、これらのうちそれぞれの microRNA が発現低下している細胞については pri-microRNA の導入を行って過剰発現による影響を、発現上昇している細胞については anti-sense の導入を行ってノックダウンによる影響を調べる。PI3K pathway に与える影響を調べるとともに、細胞増殖、足場非依存性増殖、アポトーシスな

どへの影響を検討する。また、正常細胞に対する影響を調べることにより、発癌への寄与について検討する。

4. 研究成果

(1)同定した3つの microRNA が腺癌と扁平上皮癌を診断するマーカーとなり得る知見について、論文を発表した(Molecular Medicine Reports, 2013)。

診断マーカーの開発として提案した血液検体からの microRNA の測定に関しては患者さんからの検体の収集を予定通り進めることができず、明確な成果を得ることができなかった。

(2)発癌メカニズムに関しては3つの microRNA の発現を様々な肺癌細胞で測定し、これらの microRNA の過剰発現あるいはノックダウンが細胞増殖(MTT assay)、タンパク発現の変化及びタンパクリン酸化の変化(Western Blotting)などを通し PI3K pathway に与える影響を調べたものの、現在までの結果からは腺癌と扁平上皮癌の発症に違いにこれらの microRNA が関与しているとはまだ言えない。

そこで次に我々は各 microRNA そのものが治療標的となり得るか否かについて検討した。その結果、このうち miR-375 を肺扁平上皮癌由来細胞 SK-MES-1 において過剰発現すると、浸潤能を促進することを見出した(図2)。他に、Modified Boyden chamber assay によっても同様の傾向を確認した。

miR-375 は、いくつかの癌種で癌抑制遺伝子として報告されているが、別のいくつかの癌種では逆に転移促進遺伝子である可能性

を示唆する報告もある。肺癌に関しては miR-375 は小細胞癌と大細胞神経内分泌癌を合わせた神経内分泌への分化を誘導するという報告がある (Nishikawa E et al, Cancer Res. 2011)。その報告では、miR-375 は ASH1 の下流にあり、YAP1 の発現を直接抑制することによって、神経内分泌への分化を誘導する機能があることが明らかにされている。しかし、肺癌の多くを占める腺癌、扁平上皮癌における miR-375 の機能は依然としてわかっていなかった。

そこで我々は手術で得られた肺癌の臨床検体における miRNA microarray での発現を用いて検討したところ、有意差に至らなかったものの、miR-375 高発現群で予後が悪い傾向にあった (図 3)。すなわち肺癌においては、miR-375 が癌抑制遺伝子としては機能しておらず、逆に浸潤能、転移を促進する機能を持つ可能性が示唆された。

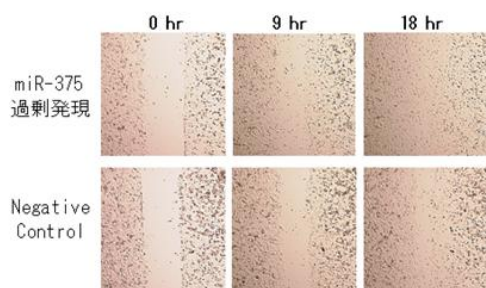


図2 Wound healing assay

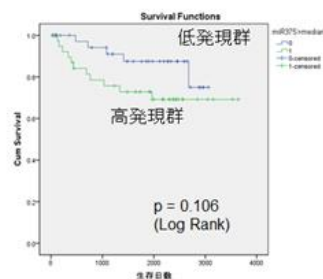


図3 miR-375発現レベル別の生存曲線

miR-375 の既知の標的遺伝子の多くは細胞増殖に働く遺伝子であり、miR-375 の過剰発現が浸潤能を促進する機序とは合致しないため、新たな標的遺伝子が関係する可能性を考え、TargetScan database を用いて miR-375 の標的遺伝子の候補を再抽出した。それらのうち、さらに浸潤能を抑制する機能を持つ遺伝子を抽出し、Claudin-1 に注目するに至った。Claudin-1 は、4 つの膜貫通ドメインを持ち、Occludin などとタイトジャンクション複合体を構成する。肺癌では転移抑制遺伝子としての機能があり、低発現群で予後が悪かったという報告がある (Chao YC et al, Am J Respir Crit Care Med. 2009)。Claudin-1 の 3' UTR には、miR-375 が相補的に結合し得る配列が 4 箇所含まれていた。実際、SK-MES-1 において、miR-375 を過剰発現させたところ、Claudin-1 の発現が、messenger RNA レベルで抑制された (図 4)。

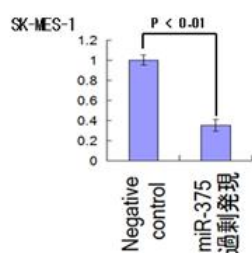


図4 miR-375過剰発現によるCaludin-1の発現変化

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) Junko Hamamoto et al., Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. Molecular Medicine Reports, 査読有、Accepted for publication on March 18, 2013, #MMR-2629-E112924

[学会発表] (計1件)

(1) Junko Hamamoto et al., Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. AACR (American Association for Cancer Research), Apr. 6, 2011, Orlando, Florida, USA, #4956

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜本 純子 (HAMAMOTO JUNKO)

慶應義塾大学・医学部・助教