

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791479

研究課題名(和文) 肺癌における変異KRAS制御末梢分泌型microRNAの解析

研究課題名(英文) Analyse of peripheral secreted microRNA controlled by mutations KRAS in lung cancer.

研究代表者

吉田 康浩 (YOSHIDA, Yasuhiro)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：00624264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：110手術症例を対象に腫瘍細胞にKRAS変異が見られるかを検討し、7例にKRAS変異を確認。KRAS変異陽性症例と陰性症例の病理学的特性を比較した。micropapillary pattern (MPP)が見られる症例が、KRAS変異陽性症例で多いことが分かった。MPPが見られる症例は細胞接着が弱く、転移を起こしやすいとされる。KRAS変異がある大腸癌細胞株で細胞接着が弱いことを証明し、肺癌細胞で同様の証明をするため、KRAS変異がある肺癌細胞株から変異KRASを抑制した細胞を作製している。また、変異KRASを抑えた肺癌細胞を用いて、培養液中のmiRNAを採取・解析することを予定している。

研究成果の概要(英文)：It was analyzed whether there was KRAS mutation in a neoplastic cell in 110 cases of lung cancer removal. The KRAS mutation was confirmed in 7 cases in 110 cases. The pathological special quality was compared between the KRAS mutation positive case and the negative case. We found out that there are a lot of cases with micropapillary pattern in a KRAS mutation positive case. Patients with MPP has been reported with weak cell adhesion, prone to metastasis. We proved that a cell adhesion is weak by a colon cancer cell line with KRAS mutation, to prove it equally by a lung cancer cell, We have produced cells that suppress the expression of a mutant KRAS from lung cancer cell lines that have KRAS mutations. We schedule to extract and analyze miRNA in the culture fluid using the lung cancer cell which suppressed mutation KRAS.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 KRAS micropapillary pattern 微小浸潤癌

1. 研究開始当初の背景

miRNA は、細胞内の遺伝子発現抑制を引き起こす。また、最近になって、癌細胞が自らの miRNA をエクソソームに封入して血液や他の体液などに分泌している事が明らかになり、新たなバイオマーカーとして診断や治療に応用できるのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

我々は3次元微小環境特異的に変異 KRAS が制御する microRNA (miRNA) を同定してきた。miRNA は血液中では、腫瘍からのエクソソームを介した分泌型 miRNA として存在し、生体内組織や縦隔リンパ節における遺伝子発現を遠隔制御する。本研究では、肺癌患者で、変異 KRAS 制御末梢分泌型 miRNA を、患者血清よりエクソソームの抽出により解析し、リンパ節での標的分子の発現も同時に解析することで、癌の早期発見、診断、予後予測、治療効果などに有用なバイオマーカーを探索することを目的とした。本研究では、肺癌患者で、変異 KRAS の有無を比較要素に加えることで、より効率的に肺癌に関連する分泌型 miRNA を検出できるのではないかと考え、変異 KRAS 制御末梢分泌型 miRNA を、患者血清よりエクソソームを

抽出・解析し、癌の早期発見、診断、予後予測、などに有用なバイオマーカーを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、研究期間中に、術前の血清と手術により病変部とリンパ節廓清が行われた 110 症例の肺癌切除患者を対象とした。すべての対象症例に病理標本パラフィン切片を用いて、Scorpion-ARMS 法で腫瘍細胞に KRAS 変異が見られるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 110 例中 7 例 (6.3%) に KRAS 変異が見られた。KRAS 変異が認められた症例と認められなかった症例の病理学的特性を比較した。KRAS 変異が見られた症例の病理組織型、病理学的特性を示す (表 1)。

KRAS 変異が見られた症例は全例腺癌であった。KRAS 変異陰性症例 (103 例) 中、73 例が腺癌、26 例が扁平上皮癌、3 例が大細胞癌、1 例が多形癌であった。KRAS 変異陽性症例では、予想に反してリンパ節転移はみられなかった。7 例中 5 例が 3cm 以下の (T1 サイズ) 腫瘍径であったため、KRAS 変異がなく、T1 サイズでリン

パ節転移が見られない腺癌の症例と比較を行った。その結果、micropapillary pattern (MPP) が見られる症例が、KRAS 変異のある症例で優位に多いことが分かった (変異 KRAS 症例 40%、KRAS 変異陰性症例 6.9%)。MPP が形態学的に見られる肺癌症例は、腫瘍細胞間の接着が弱く、腫瘍径が小さいものでも遠隔転移が多いという報告があり^{①③}、KRAS の変異が MPP の発現に関与しているものであれば、新しい発見であり、変異 KRAS を抑制することが可能となれば MPP の発現も制御できることが期待され、臨床的に大きな意味を持つこととなる。また、KRAS 変異がある症例では、臨床的に早期癌とされる minimally invasive adenocarcinoma が 1 例も見られなかった。このことは KRAS 変異が早期肺癌の段階では起こらず、KRAS が変異することで浸潤癌に変化させている可能性を示唆しており、大腸癌に見られるような発癌シーケンスが肺癌にも存在するのではないかという裏付けにもなるかもしれない。

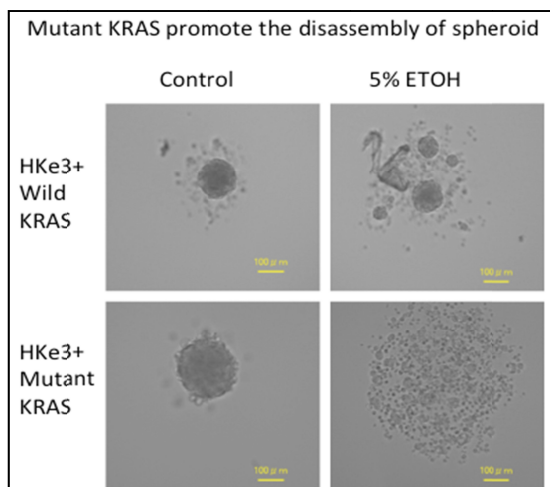
(表 1)

症例	組織系	亜分類	T	N	M	最大腫瘍径
1	Adenocarcinoma	micropapillary pattern	1a	0	0	1.6
2	Adenocarcinoma	invasive mucinous	3	0	0	6
3	Adenocarcinoma	acinar	1a	0	0	1.5
4	Adenocarcinoma	papillary	1a	0	0	1.7
5	Adenocarcinoma	micropapillary pattern	1b	0	0	2.7
6	Adenocarcinoma	papillary	1a	0	0	1.2
7	Adenocarcinoma	acinar	3	0	0	6.2

(2) 当初、患者血清を用いたエクソソームの解析を予定していたが、KRAS 変異症例が 7 例 (6.3%) と少なかった事 (報告では 20 から 25%)、予想に反して KRAS 変異症例にリンパ節転移が見られなかった事、患者血清では腫瘍そのものが産生するエクソソームかどうかの判別も困難であると予想された事より、患者血清を用いず、KRAS 変異がある肺癌細胞株から変異 KRAS をノックアウトして、培養液中の miRNA を採取・解析する方針へと方針を変更した。現在、KRAS 変異がある肺癌細胞株から変異 KRAS を抑制した細胞を作製している段階である。

(3) 今後の方針として、KRAS 変異がある細胞とそれから変異 KRAS を抑制した細胞を比較することで、細胞の分散能を解析する予定である。先行実験として大腸癌細胞株で、浮遊培養を行い、分散傾向を見る実験を行なった。その結果によると、Tight junction protein を抑制する 5% ETOH を加えると、活性化 KRAS が存在する事で細胞塊が分散傾向にある事を観察した (図 1)。この事より、これまでに報告があるように、変異 KRAS 陽性細胞塊は細胞間

接着が弱く、細胞塊が小さなうちから転移能が高い事が示唆される。まさにこの特性は、MPPに見られる特性であり、KRAS 変異有り無し
の細胞を用いて、細胞塊の分散傾向を観察することにより、基礎の方面から細胞接着にKRAS が関与しているかを解明する実験になりえる。これにより KRAS が担う機能が解明されることにつながると考える。



(図 1)

(4) また、KRAS 変異がある肺癌細胞と変異KRAS を抑制した肺癌細胞から培養液に出させるエクソソームを回収し、そこから miRNA を抽出して、qRT-PCR、発現アレイ等により、KRAS が制御する分泌型 miRNA を解明することができないかと期待している。

また、浮遊培養を行なった細胞塊を回収する事で、qRT-PCR、Western blotting や免疫染色で遺伝子解析やアポトーシス・接着能等の確認も解析可能と考える。

引用文献

Amin MB, Ro JY : Micropapillary component in lung adenocarcinoma: a distinctive histologic feature with possible prognostic significance. Am J Surg Pathol 26:358- 364, 2002.

Miyoshi T, Ishikawa Y : Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathologic marker for a significantly poor prognosis. Am J Surg Pathol 27 : 101-109, 2003.

Tsutsumida H , Yonezawa S : A micropapillary pattern is predictive of a poor prognosis in lung adenocarcinoma, and reduced surfactant apoprotein A expression in the micropapillary pattern is an excellent indicator of a poor prognosis. Mod Pathol 20:638-647, 2007.

5 . 主な発表論文等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 康浩 (YOSHIDA, Yasuhiro)

福岡大学 医学部・講師

研究者番号 : 00624264

(2) 研究連携者

角田俊之 (TSUNODA, Toshiyuki)

福岡大学 医学部・准教授

研究者番号 : 70444817

鍋島一樹 (NABESHIMA, Kazuki)

福岡大学 医学部・教授

研究者番号 : 40189189

白澤専二 (SHIRASAWA, Senji)

福岡大学 医学部・教授

研究者番号 : 10253535