

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462170

研究課題名(和文) 喀痰中のマイクロRNAを用いた肺癌の早期発見に関する研究

研究課題名(英文) Novel biomarker of lung cancer using microRNAs in sputum

研究代表者

桜田 晃 (Sakurada, Akira)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60360872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：喀痰の採取を行いつつ、喀痰において検出されるマイクロRNAにより制御されている可能性のあるGRLF1遺伝子の機能解析について研究を進めた。遺伝子導入による一時的な遺伝子のノックダウンにより、腫瘍の増殖抑制効果を認めたが、安定的ノックダウンを行った肺癌細胞では、増殖能は通常と変わらなかった。この分子機構を明らかにするために、主な分子の発現状況をスクリーニングしたところ、STAT3タンパクの活性が増加していることが明らかになった。これが、GRLF1をノックダウンした場合の代替機構として寄与しているものと考えた。喀痰のサンプルについては、保存して将来の解析に供することにした。

研究成果の概要(英文)：Sputum samples were collected and preserved. We focused on GRLF1, which is a regulator of RAS protein and possibly controlled through microRNAs. By temporal knock-down of GRLF1, significant growth inhibition was observed. However, the effect disappeared when the gene was stably knocked-down. By screening of molecules regarding cell proliferation, both total and phosphorylated protein of STAT3 was evidenced. In addition, inhibition of STAT3 by a specific tyrosin kinase inhibitor in cells with stable knock-down for GRLF1 induced strong growth inhibition. Thus, we concluded that STAT3 worked as an alternative pathway for cell survival in these cells. These findings indicate that GRLF1 could be a therapeutic target and STAT3 could be a resistant mechanism for that treatment.

研究分野：胸部外科

キーワード：肺癌 喀痰 マイクロRNA GRLF1 p190RhoGAP

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の早期発見の機会を増加させることは、肺癌の治療向上に重要である。喀痰は無侵襲で得られる検体であり、細胞診を補完あるいは代替するバイオマーカーを確立することは、社会的要請の強い課題である。

(2) 近年、マイクロ RNA が癌化に関する新たな分子機構として働いていることが指摘され、詳細に関する解明が始まっている。喀痰中のマイクロ RNA を新たなバイオマーカーとして活用することが期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、喀痰中のマイクロ RNA の解析を行う事により、新たなバイオマーカーの確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 肺癌患者からの喀痰を収集して、喀痰中のマイクロ RNA を抽出する。発現パターンをアレイ解析し、バイオマーカーとなり得るものがあるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 研究開始後に当施設の倫理委員会に申請を行い、喀痰細胞診が陽性である肺癌患者から喀痰を採取する許可を得た。

(2) 研究開始後に、MicroRNA-34a が RhoA を制御するという論文を発見したことを受けて (Kim et al, Journal of Biological Chemistry, 287:12501-12509, 2012)、研究者の主要な研究テーマである p190RhoGAP (GRLF1) と喀痰中のマイクロ RNA の相互作用を研究主眼のひとつとすることとし、喀痰の収集と、p190RhoGAP の機能解析を平行で行うこととした。p190RhoGAP については自身の研究で、同遺伝子の一時的なノックダウンによって、EGFR 遺伝子の変異を有する肺癌細胞においても、k-ras 遺伝子に変異を有する肺癌細胞においても増殖が強く抑制されることを示してきた。この効果は、正常ヒト気道上皮細胞では認めなかった。したがって、肺癌に対する特異的な治療標的となりうる可能性を有している。肺癌における同遺伝子の抑制に関する研究を喀痰の収集と並行して行った。

(3) p190GAP の安定的ノックダウンを行った。p190RhoGAP をノックダウンする RNA 配列を含むレンチウイルスを用いて、K-ras に変異を有する A549 細胞、EGFR の L858R 変異を有する PC9、EGFR-TKI 変異を有する H1975 を用いて p190RhoGAP のノックダウンを行った。薬剤による選択を経て、シングルコロニーを複数得て実験に用いた。これにより、60-80%の同遺伝子の mRNA の抑制を得た (図 1 )

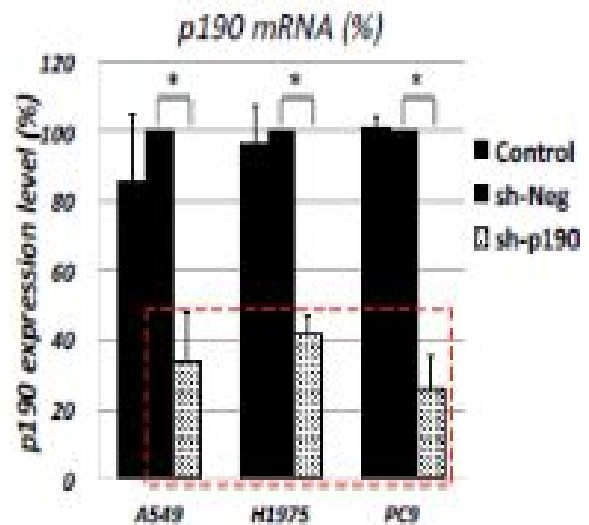


図 1

また、蛋白レベルで同蛋白が著明に抑制されていることを確認した (図 2 )

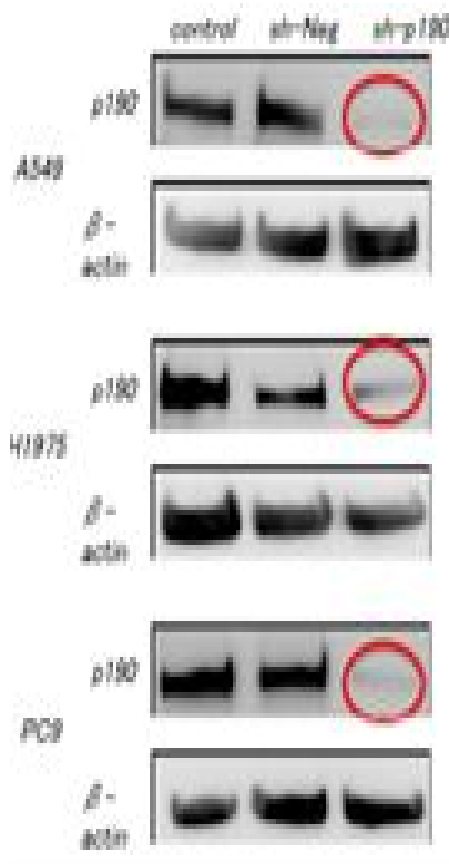


図 2

(4) 安定的ノックダウンを行った状態での細胞増殖能を確認したところ、以前、一時的なノックダウンで認められた細胞増殖の抑制は消失していた (図 3 )

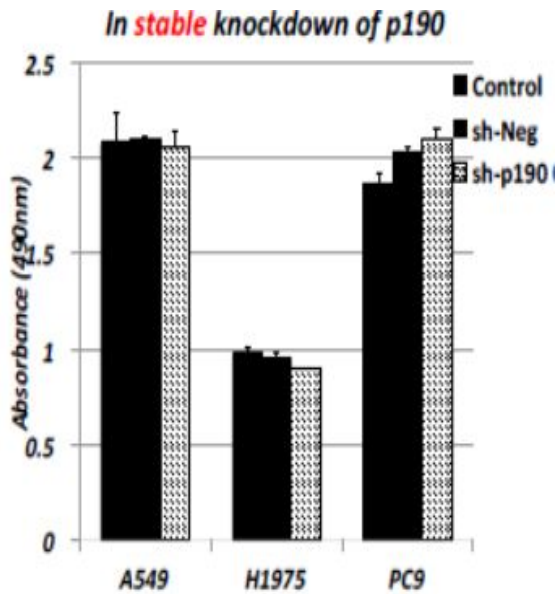


図 3

(5)細胞の増殖能が回復したのは、細胞増殖に関連する代替の情報伝達経路が活性化したことによると考え、細胞増殖にかかわる主要な経路の蛋白レベルでのスクリーニングを行った。A549においてはp190RhoGAPの安定ノックダウンを行った細胞において明らかなSTAT3の総蛋白とリン酸化蛋白の増加を認めた。H1975とPC9については、明らかな代替経路は同定できなかった(図4)。

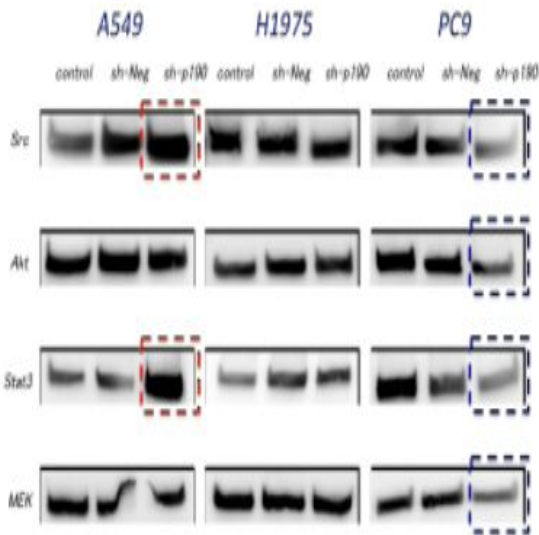


図 4

(6)p190RhoGAPの安定的なノックダウンを行ったA549におけるSTAT3の発現亢進の機能的な意義を明らかにするために、同細胞においてSTAT3の阻害薬を投与してその効果を見た。A549細胞ではSTAT3の抑制によって、著明な増殖抑制効果が認められた。K-ras遺伝子変異を有するA549細胞においては、p190RhoGAPの機能をSTAT3が代替した可能性

が大きいと考えられた(図5)。

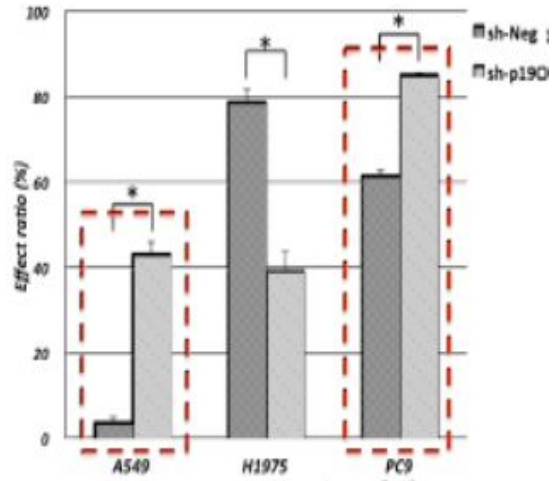


図 5

(7)p190RhoGAPはSrcにより調節を受けることが報告されている。そこでSrcとSTAT3の同時阻害による腫瘍増殖能抑制効果を見た。その結果、SrcとSTAT3の阻害により相乗的に細胞増殖抑制効果が認められることが明らかになった。これにより、今後の肺癌治療において、低濃度の分子標的薬の組み合わせが治療の一つの方法となり得ることを示唆する結果が示された(図6-8)。

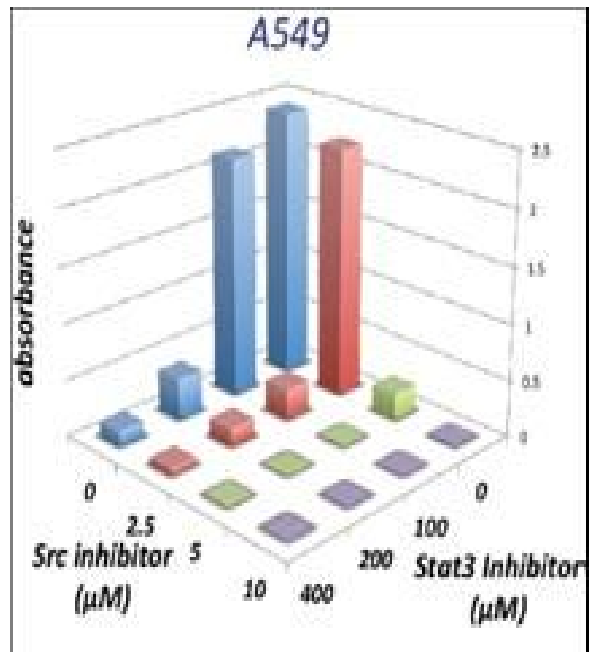


図 6

(8) 研究期間中に3名から喀痰の検体を得て保存した。これは、将来の研究に備えて保存することとした。

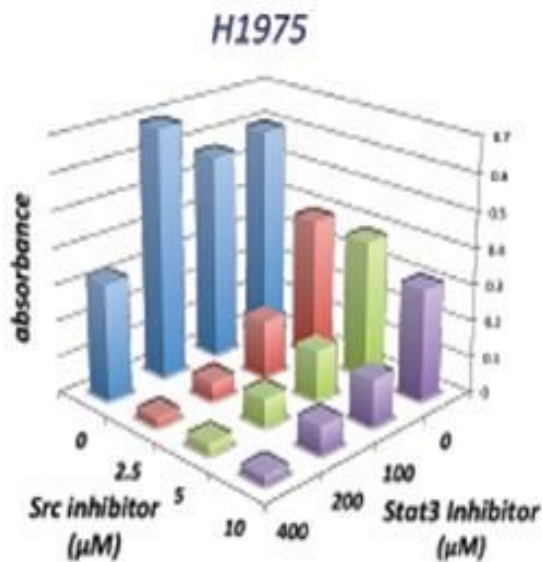


図 7

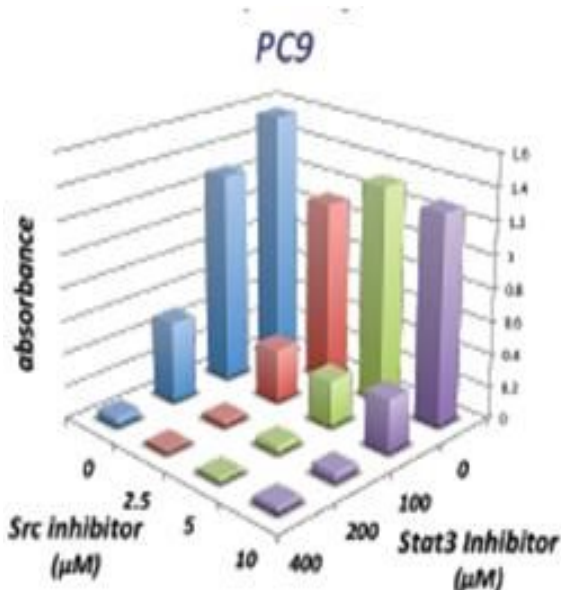


図 8

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2件)

Kawamura M, Endo C, Sakurada A, The prognostic significance of eukaryotic elongation factor 1 alpha-2 in non-small cell lung cancer. Anticancer Res 34: 651-658, 2014, 査読有り.  
 Notsuda H, Sakurada A, Endo C, p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells.

Int J Oncol 43:1569-1577, 2013, DOI: 10.3892/ijo.2013.2096, 査読有り.

[学会発表](計2件)

Ken Onodera, Akira Sakurada, Hirotsugu Notsuda, Tatsuaki Watanabe, Yasushi Matsuda, Masafumi Noda, Yasushi Hoshikawa, Yoshinori Okada . Cosuppression of Stat3 and Src/p190RhoGAP leads synergistic growth inhibition in KRAS mutant lung adenocarcinoma . ATS conference 2016 . 2016年05月13日~2016年05月18日, San Francisco, USA

小野寺 賢、桜田 晃、野津田弘嗣、遠藤千顕、渡辺龍秋、松田安史、野田雅史、星川 康、岡田克典. ヒト肺癌細胞株における p190-A RhoGAP の機能解析. 第56回日本肺癌学会 2015年11月26日~2015年11月28日、パシフィコ横浜、横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

桜田 晃 (SAKURADA, Akira)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60360872

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

小野寺 賢 (ONODERA, Ken)