

論 文 要 旨

**Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer: Impact of
Oncogenic Targets Regulated by Tumor Suppressive *miR-139-3p***

大腸癌の分子病態：
癌抑制型マイクロ RNA (miR-139-3p) により制御される
癌促進型遺伝子の影響

安留 龍太郎

【序論及び目的】

本邦において、1年間に新たに大腸癌 (colorectal cancer: CRC) と診断された人数 (罹患数) は、2019年では男性は約9万人、女性は約7万人である。臓器別にみると、CRCは男性、女性ともに2番目に多い癌である。また、癌死亡者数では、男性では2番目、女性では1番目である。CRCは、早期に診断されれば、患者の生命予後は比較的良好である (5年生存率、ステージ I: 95%、ステージ II: 88%、ステージ III: 76%)。しかしながら、進行症例 (ステージ IV) では、5年生存率は18%と極めて不良である。初診時において、CRC患者の約14%~18%は、転移を有する進行症例である。進行症例に対する新規治療戦略を考案するためには、CRC細胞の治療標的分子の探索が不可欠である。

ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒトゲノム中には、膨大な数の蛋白質をコードしない RNA 分子 (non-coding RNA: nc RNA) が存在している事が明らかとなった。最近の研究から、これら nc RNA の発現異常が、癌を含むヒトの疾患に深く関与している事が明らかになってきた。nc RNA 分子の1種であるマイクロ RNA (miRNA) は、19塩基~22塩基の1本鎖 RNA 分子である。その生物学的特徴は、1種類の miRNA が極めて多くの蛋白質コード遺伝子の発現を制御している事である。そのため、miRNA の発現異常は、細胞内の RNA ネットワークの破綻を引き起こす。癌研究において、癌細胞で発現異常を示す miRNA の解析が精力的に行われている。

我々は、CRC 臨床検体を用いて RNA シークエンスにより、CRC miRNA 発現プロファイルを作成した。このプロファイルに基づき、癌組織で発現が抑制されている miRNA に着目し、その機能と、miRNA が制御する分子ネットワークの探索を行った。本研究は、CRC 組織で発現が抑制されていた *miR-139-3p* に着目し、CRC 細胞における機能と、*miR-139-3p* が制御する分子ネットワークを明らかにする事を目的とした。

【材料及び方法】

CRC 細胞株は HCT116 と DLD-1 を使い、*miR* precursor および siRNA を用いて核酸導入を行い、細胞増殖能及び遊走能、浸潤能を評価した。miRNA の標的分子の探索は公共のデータベース (TargetScanHuman、Gene Expression Omnibus (GEO) database、The Cancer Genome Atlas (TCGA)) を利用しゲノム科学的手法で解析した。標的分子の抑制効果は *miR-139-3p* を核酸導入した CRC 細胞株から RNA および蛋白質を抽出し、q-PCR およびウェスタンブロット法で確認した。またルシフェラーゼレポーターアッセイ及び RNA 免疫沈降により標的 mRNA と *miR-139-3p* との直接の結合を評価した。標

的蛋白分子の臨床検体における発現は免疫組織化学染色により評価した。

【結果】

CRC 癌抑制型マイクロ RNA (*miR-139-3p*) の機能解析について

プロファイルから選択した *miR-139-3p* の発現について、当科で保存している CRC 臨床検体を用いて解析を行なった。その結果、*miR-139-3p* の発現は、正常組織と比較して、CRC 組織で有意に発現抑制されている事が確認された。

次に、*miR-139-3p* を CRC 細胞株 (HCT116 及び DLD-1) に核酸導入し、細胞の増殖能及び遊走能、浸潤能を評価した。その結果、*miR-139-3p* は、CRC 細胞の増殖能及び遊走能、浸潤能を顕著に制御している事を明らかにした。さらに、ウェスタンブロット分析によると、*miR-139-3p* の発現は、CRC 細胞における AKT のリン酸化を顕著に抑制した。

癌抑制型マイクロ RNA (*miR-139-3p*) が制御する癌遺伝子の探索について

TargetScan および *miR-139-3p* を核酸導入した CRC 細胞の遺伝子発現データ (GSE155659) を用いて、*miR-139-3p* が制御する癌遺伝子の探索を行い、95 遺伝子を候補として抽出した。さらに、GEPIA2 プラットフォームを介して TCGA データベースを用い、CRC で有意に発現上昇している 29 遺伝子を同定した。解析の中で *KRT80* の発現量は正常組織ではかなり低いことがわかった。癌細胞でのみ発現している遺伝子は、CRC の治療ターゲットとして適切であることから *KRT80* に着目した。

CRC 細胞における *KRT80* の機能解析について

CRC 臨床検体を用いた免疫染色において、*KRT80* の発現亢進を確認した。これら遺伝子の機能解析については、siRNA を用いた loss-of-function により検討した。*KRT80* をノックダウンした細胞株では、細胞の増殖能及び遊走能、浸潤能が抑制された。加えて、CRC 細胞株に対して *KRT80* の siRNA を核酸導入することで、AKT のリン酸化が抑制された。更に、ルシフェラーゼレポーターアッセイ及び RNA 免疫沈降から、*KRT80* の発現は *miR-139-3p* により、直接制御されている事を明らかにした。

CRC 細胞における *KRT80* を介した RNA ネットワーク

CRC における *KRT80* が制御する RNA ネットワークを探索するために、*KRT80* をノックダウンした CRC 細胞において、包括的な遺伝子発現解析を行った結果、52 個の遺伝子が発現低下していることが確認された。我々はそれらの遺伝子の中から hexokinase 2 (*HK2*) に注目した。*HK2* は、CRC 細胞において *miR-139-3p* と *KRT80* によって共通に制御されていた。さらに、*HK2* は、RNA 免疫沈降およびルシフェラーゼレポーターアッセイにより、CRC 細胞において *miR-139-3p* による直接制御が確認された。さらに、*HK2* は、CRC 組織において発現が亢進しており、様々な先行研究で *HK2* の異常発現が種々の癌において癌細胞の悪性転換を促進することが示されている。我々の結果は、*siKRT80* または *miR-139-3p* を核酸導入した細胞で *HK2* の発現が低下することを明らかにした。

【結論及び考察】

CRC miRNA 発現プロファイルから、癌組織で発現が抑制されている *miR-139-3p* に着目した。*miR-139-3p* は、*miR-139* 前駆体から派生するパッセンジャー鎖である。一般的には、miRNA 前駆体から派生するパッセンジャー鎖は、細胞質で分解され機能を有しないとされている。今回の解析では、*miR-139-3p* を CRC 細胞に核酸導入する事で、癌細胞の、増殖能及び遊走能、浸潤能が顕著に抑制されたことから、*miR-139-3p* は、癌抑制型 miRNA である事を証明した。

更に、CRC 細胞において、*miR-139-3p* が制御する分子ネットワークの一端が明らかとなった。これら分子の更なる解析から、CRC 治療標的分子の探索が可能であると考えられる。その中で、*KRT80* は、*miR-139-3p* により直接制御されており、*KRT80* を介する経路に *HK2* が存在する事を明らかにした。miRNA を起点とした解析により、CRC 細胞の分子ネットワークの一端を明らかにする事ができた。