

論 文 要 旨

MicroRNA signature of small cell lung cancer after treatment failure: impact on oncogenic targets by *miR-30a-3p* control

治療抵抗性小細胞肺癌における microRNA 発現パターンの解析:
miR-30a-3p 制御による癌促進遺伝子への影響

谷川 健悟

【序論及び目的】

肺癌は癌関連死の主たる死亡原因である。肺癌は非小細胞肺癌と小細胞肺癌の2つのタイプに分けられる。小細胞肺癌は進行が早く、80-85%の症例が診断時に進展型小細胞肺癌として進行した状態で発見される。進展型小細胞肺癌の1次治療としてはプラチナ製剤を基にした薬物療法が推奨され、治療初期の反応性は良好である。しかし、経過とともに治療抵抗性を獲得し、その後の有効な治療の選択肢が少ないことから治療抵抗性獲得後の小細胞肺癌の分子機構の解明が重要な課題となっている。

マイクロRNAはノンコーディングRNAの一つであり、標的RNAの特異的な部位に結合して転写レベルで遺伝子を調整している。一つのマイクロRNAは多数のRNA転写産物を制御しており、マイクロRNAの異常発現は細胞の悪性形質への転換を引き起こすとされ、癌の進行、転移、薬剤抵抗性にも関連している。現在、RNAシーケンス技術の進歩によりゲノム規模でのマイクロRNA発現パターンの解析が可能となり、最新のゲノム解析とマイクロRNAのデータベースから、癌の発生に関わる多数の分子ネットワークがマイクロRNAに制御されていることがわかってきた。また、以前はマイクロRNAのガイド鎖のみが遺伝子を制御すると考えられていたが、パッセンジャー鎖も癌抑制マイクロRNAとして機能していることもわかってきている。

本研究では治療抵抗性となった小細胞肺癌患者の病理解剖検体を使用して新たなマイクロRNA発現パターン解析を行い、発現の低下しているマイクロRNAを同定した。その中から*miR-30a-5p*および*miR-30a-3p*に着目して機能解析を行い、パッセンジャー鎖である*miR-30a-3p*が制御する遺伝子の検証を行った。

【材料及び方法】

治療抵抗性となった小細胞肺癌の病理解剖3症例から癌部8検体、正常肺4検体のRNA抽出を行い、RNAシーケンスを実施した。RNAシーケンスデータをボルケーノプロットとヒートマップを用いて解析し、本研究で検証するマイクロRNAを選定した。選定された*miR-30a-5p*および*miR-30a-3p*の発現を、小細胞肺癌21検体、正常肺10検体のRNAを用いてRT-qPCRで確認した。細胞株はヒト小細胞肺癌細胞株であるSBC-3細胞、H82細胞を使用した。*miR-30a-5p*、*miR-30a-3p*を核酸導入し、増殖能はXTT、遊走能はwound healing assayで確認した。細胞周期とアポトーシスはフローサイトメ

トリーを使用して解析した。*miR-30a-3p* の標的遺伝子は TargetScanHuman database、GEO database を使用して候補を絞り込み、ボルケーノプロットを確認して決定した。*miR-30a-3p* による標的遺伝子の抑制効果は、*miR-30a-3p* 導入細胞より RNA、蛋白を抽出し、RT-qPCR 法、ウエスタンブロッティングで評価した。*miR-30a-3p* の標的遺伝子の RISC への取り込みは抗ヒト Ago2 抗体を使用した免疫沈降法を用いて Ago2 に結合した RNA を抽出し RT-qPCR 法で確認した。*miR-30a-3p* と標的遺伝子内の予測結合配列との直接的な結合はルシフェラーゼレポーターアッセイで評価した。標的遺伝子の機能評価は、標的遺伝子の siRNA を核酸導入した細胞株で行った。小細胞肺癌の組織における標的蛋白質の発現は tissue array と治療抵抗性小細胞肺癌の病理解剖 5 検体および肝生検 1 検体で確認した。

【結果】

〔小細胞肺癌における *miR-30a-5p* および *miR-30a-3p* の発現解析〕

治療抵抗性小細胞肺癌では RNA シーケンス解析により *miR-30a-5p* および *miR-30a-3p* の発現が有意に低下しており、同様の結果が臨床検体の RT-qPCR でも確認された。

〔*miR-30a-5p* および *miR-30a-3p* の小細胞肺癌における機能解析〕

miR-30a-5p 導入細胞で有意な増殖能の低下、アポトーシス細胞の増加がみられ、細胞周期解析では G₀/G₁ 細胞数の増加がみられた。*miR-30a-3p* 導入細胞では有意な増殖能および遊走能の低下、アポトーシス細胞の増加がみられ、細胞周期解析では sub-G₁ 細胞の割合が増加し、G₀/G₁ 細胞数が低下した。

〔*miR-30a-3p* の標的遺伝子候補の選出〕

TargetScanHuman database における *miR-30a-3p* に結合する可能性のある 4944 遺伝子、SBC-3 細胞に *miR-30a-3p* の核酸導入で発現が低下した 6366 遺伝子 (GSE 139319)、小細胞肺癌の組織検体で発現が上昇していた 1218 遺伝子 (GSE 162102) の全てに該当する 25 遺伝子を特定した。GSE 162102 のデータを基に作成したボルケーノプロットに 25 遺伝子をプロットし、*DONSON* に着目して解析した。

〔*miR-30a-3p* 核酸導入による *DONSON* の制御〕

miR-30a-3p 導入細胞で *DONSON* の mRNA および蛋白の発現抑制がみられた。*miR-30a-3p* を核酸導入した SBC-3 細胞では *DONSON* の RISC への取り込みが増加していた。SBC-3 細胞に *miR-30a-3p* の予測結合配列のある *DONSON* の 3'-UTR をクローニングした vector と *miR-30a-3p* を導入したところ、ルシフェラーゼ活性が有意に低下していた。この結果から *miR-30a-3p* は *DONSON* に直接作用し、*DONSON* の発現を抑制していることが示された。

〔小細胞肺癌における *DONSON* の機能解析〕

si-*DONSON* を核酸導入した細胞では *DONSON* の mRNA および蛋白の発現抑制がみられ、機能解析では有意な細胞増殖能の低下、アポトーシス細胞の増加、遊走能の低下がみられた。細胞周期の解析において si-*DONSON* を核酸導入した細胞では sub-G₁ の細胞数が増加し、SBC-3 細胞および si-*DONSON-1* を核酸導入した H82 では G₀/G₁ 細胞数が低下した。

〔*DONSON* の免疫染色〕

正常肺と比較して小細胞肺癌で *DONSON* が高発現していることが tissue array の免疫染色で確認された。また、治療抵抗性小細胞肺癌の組織でも *DONSON* が高発現していることが確認された。

【結論及び考察】

miR-30a-3p の発現が増加することで小細胞肺癌の進展が抑制され、*miR-30a-3p* は小細胞肺癌において癌抑制型マイクロ RNA として機能していることが示された。*miR-30a-3p* により制御されている *DONSON* は小細胞肺癌において癌促進遺伝子として働いており、治療標的分子となる可能性が示唆された。

