

論 文 要 旨

Molecular pathogenesis and regulation of the miR-29-3p-family:**Involvement of ITGA6 and ITGB1 in intrahepatic
cholangiocarcinoma**

miR-29-3p-family の分子病態と制御：

—肝内胆管癌における ITGA6 と ITGB1 の関与—

保坂 優斗

【序論及び目的】

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma: ICC) は、原発性肝癌の中で肝細胞癌に次いで 2 番目に頻度の高い癌種である。外科的切除が第一選択肢であるが、根治切除症例においても 5 年生存率は 30% 程度と極めて予後不良である。ICC は自覚症状が乏しく診断時に根治切除の対象となる患者は全体の 30% 以下である。外科的切除が望めない症例に対してはゲムシタビンやシスプラチンなどの殺細胞性化学療法を行うが、十分な治療効果が得られていない。ICC 患者の予後改善には、早期診断システムの開発と、治療標的分子の探索に基づく新規治療法の開発が急務である。

ヒトゲノム解析研究の成果としてヒトゲノム中には、蛋白質をコードしない機能性 RNA 分子が数多く存在している事が明らかとなった。これら機能性 RNA 分子の 1 種であるマイクロ RNA は、僅か 19 塩基~23 塩基の 1 本鎖 RNA 分子である。マイクロ RNA の生物学的特性は 1 種類のマイクロ RNA が極めて多くの蛋白質コード遺伝子の発現を負に制御している事である。そのため、マイクロ RNA の発現異常は癌をはじめとするヒト疾患に深く関与している。

本研究では、ICC の miR 発現プロファイルから miR-29-3p-family (miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p) 着目し、肝内胆管癌 (ICC) 細胞株における癌抑制機能とこれらマイクロ RNA が制御している ICC 癌遺伝子ネットワークの探索を目的とした。

【材料及び方法】

ICC 細胞株は HuCCT1 と RBE を用い、miR precursor および siRNA を用いて核酸導入を行い、細胞増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。miR 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-29-3p を核酸導入した肝内胆管癌細胞株から 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アッセイにより標的 mRNA と miR-29-3p ファミリーとの直接の結合を評価した。標的タンパク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】

① ICC 癌抑制型マイクロ RNA (*miR-29-3p-family*) の機能解析について

ICC の臨床検体(癌部 63 例、正常部 9 例)を比較した GEO データベースを用いて *miR-29a-3p*、*miR-29b-3p*、*miR-29c-3p* の発現について解析した。その結果、*miR-29a-3p* ($p = 0.0003$)、*miR-29b-3p* ($p < 0.0001$)、*miR-29c-3p* ($p = 0.0210$) の発現は正常組織と比較して、ICC 組織で有意に発現抑制されている事が確認された。

次にこれらマイクロ RNA を ICC 細胞株 (HuCCT1、RBE) に核酸導入し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を評価した。その結果、これらマイクロ RNA は、ICC 細胞の遊走能と浸潤能を顕著に制御している事を明らかにした。

② 癌抑制型マイクロ RNA (*miR-29-3p-family*) が制御する癌遺伝子の探索について

TargetScan および TCGA データベースを用いて、*miR-29-3p-family* が制御する癌遺伝子の探索を行い、888 の遺伝子を候補として抽出した。これら遺伝子について Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースを用いて機能分類し、癌の悪性化に関わる 20 の分子経路の存在が明らかにした。その中でも細胞の遊走、浸潤に関与する Focal adhesion 経路に着目した。この分子経路に含まれる 30 の遺伝子の中から、細胞外マトリックス・レセプターである *ITGA6* および *ITGB1* に着目した。

③ ICC 細胞における *ITGA6* および *ITGB1* の機能解析について

ICC 臨床検体における *ITGA6* および *ITGB1* の発現を Gene Expression profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) データベースを用いて調べた結果、いずれの遺伝子も ICC 組織で発現が亢進している事が明らかとなった ($p < 0.01$)。ICC の臨床検体を用いた免疫染色検査において、*ITGA6* および *ITGB1* 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。解析の結果、*ITGA6* および *ITGB1* をノックダウンした細胞株では細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が顕著に抑制された。更に、ルシフェラーゼレポーター解析から *ITGA6* および *ITGB1* の発現は、*miR-29a-3p*、*miR-29b-3p*、*miR-29c-3p* により、直接制御されている事を明らかにした。

④ *ITGA6* および *ITGB1* の発現を促進する転写因子の探索について

過去の文献およびデータベース検索から、*ITGA6* および *ITGB1* の発現を促進する転写因子を探索した。その結果、6 個の転写因子 (*SP1*、*CREB1*、*MAX*、*FHL2*、*RFX1* および *HIF1A*) の発現は、ICC 臨床検体で発現が亢進しており、更に、これら転写因子の発現と、*ITGA6/ITGB1* の発現が正の相関を示す事を明らかにした。興味ある知見として、転写因子の *SP1* は、*miR-29-3p-family* の結合部位を有しており、これらマイクロ RNA により、直接の制御を受けている事を明らかにした。

【結論及び考察】

ICC における癌抑制型マイクロ RNA として、*miR-29a-3p*、*miR-29b-3p*、*miR-29c-3p* を明らかにした。これらマイクロ RNA は、*ITGA6/ITGB1* の 2 量体および、これら遺伝子の転写因子である *SP1* の発現を直接制御している事を明らかにした。ICC 細胞においては、*miR-29a-3p*、*miR-29b-3p*、*miR-29c-3p* の発現抑制により、*ITGA6/ITGB1* を介した、癌分子経路の活性化が起きていると考えられる。今後、この分子経路の詳細な解析により、本疾患の治療標的分子が明になる可能性がある。

癌抑制型マイクロ RNA を起点とした、癌遺伝子および癌分子経路の探索により、ICC の悪性化の分子機序が明らかになると考える。