

論 文 要 旨

Regulation of *KIF2A* by Antitumor *miR-451a* Inhibits Cancer Cell Aggressiveness Features in Lung Squamous Cell Carcinoma

肺扁平上皮癌において癌抑制型 *miR-451a* は *KIF2A* を制御して肺癌細胞の進展を抑制する

内田 章文

【序論及び目的】

肺癌は世界的にも死亡者数が最も多い癌の 1 つである。肺癌の多くは非小細胞肺癌であり、その大部分を肺腺癌、肺扁平上皮癌が占める。肺腺癌の予後は各種キナーゼ阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬の出現により劇的に改善したが、肺扁平上皮癌の治療選択肢は依然として少ない。

近年、様々な癌において、機能性 RNA である microRNA (miRNA) の発現異常が癌の発生・進展・転移に関与することが示されている。我々は、癌抑制型 miRNA である *miR-144-5p*、*miR-144-3p* が癌促進遺伝子である *NCSI* を標的として肺扁平上皮癌細胞の進展を抑制すること、*miR-144-5p*、*miR-144-3p* の低発現および *NCSI* の高発現が肺扁平上皮癌の予後不良に関与することを報告した。*miR-144-5p*、*miR-144-3p* をコードする領域は 17 番染色体長腕に存在し、近傍に *miR-451a* をコードする領域があり、三者は cluster を形成している。cluster を形成する miRNA は一括に転写され、共通した病態に関与することが報告されている。そこで、肺扁平上皮癌において重要な *miR-144-5p*、*miR-144-3p* と cluster を形成している *miR-451a* に着目した。本研究では、肺扁平上皮癌において *miR-451a* の腫瘍抑制効果を解析し、*miR-451a* が制御する腫瘍進展に関わる重要な癌促進遺伝子を同定する。

【材料及び方法】

2010 年から 2013 年に鹿児島大学病院で手術された肺扁平上皮癌 30 検体、非癌部 20 検体より RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *miR-451a* の発現を解析した。細胞株はヒト肺扁平上皮癌細胞株である EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞を使用した。*miR-451a* を核酸導入し、*miR-451a* の腫瘍抑制機能を評価した。機能解析は核酸導入細胞の増殖能、遊走能、浸潤能、apoptosis 誘導能を評価した。*miR-451a* の標的遺伝子の選出には TargetScanHuman database、GEO database を利用し、ゲノム科学的手法で解析した。臨床 database 解析には TCGA database、cBioPortal、OncoLnc を利用し、統計学的手法にて解析した。標的遺伝子の臨床検体での発現は免疫染色にて評価した。*miR-451a* による標的遺伝子の抑制効果は、*miR-451a* 導入細胞より RNA、蛋白を抽出し、qRT-PCR 法、western blotting で評価した。*miR-451a* 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 を導入した細胞株を用いて機能解析を行った。標的遺伝子が制御する分子ネットワークの解析には、GEO database、KEGG pathway categories を利用した。

【結 果】

〔肺扁平上皮癌手術検体での *miR-451a* の発現解析および *miR-451a* 発現による臨床 database 解析〕

qRT-PCR 法による肺扁平上皮癌手術検体での解析で、肺扁平上皮癌部 (n = 30) では、非癌部 (n = 20) と比較し、有意に *miR-451a* の発現低下を認めた ($p < 0.001$)。

TCGA database を利用した解析で、肺扁平上皮癌における *miR-451a* の発現低下は予後不良に関連した (5 年生存率: $p = 0.035$ 、5 年無病生存率: $p = 0.029$)。多変量解析で、*miR-451a* の発現低下は臨床病期や TNM factor とは独立した予後不良因子であった (hazard ratio = 0.667、 $p = 0.029$)。

〔*miR-451a* の腫瘍抑制機能〕

miR-451a を EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞に核酸導入し、機能解析を行った。*miR-451a* 導入細胞において、XTT assay では増殖抑制を認め ($p < 0.001$)、apoptosis の誘導を認めた ($p < 0.001$)。また wound healing assay では遊走能の抑制を ($p < 0.001$)、invasion assay では浸潤能の抑制を認めた ($p < 0.001$)。

〔*miR-451a* の標的遺伝子候補の選出〕

TargetScanHuman database を用いて *miR-451a* と結合する可能性のある 543 遺伝子を抽出した。次に、543 遺伝子から GEO database (accession no. GSE 19188) を利用し、肺癌で発現が亢進している 49 遺伝子を選出した。さらに *miR-451a* を核酸導入した SK-MES-1 細胞で発現が低下している 15 遺伝子を選出した。15 の候補遺伝子のなかで、TCGA database を利用した解析で、発現高値が予後不良に関連した *KIF2A* に着目し (5 年生存率: $p = 0.043$ 、5 年無病生存率: $p = 0.028$)、その後の解析を行った。

〔*miR-451a* 核酸導入による *KIF2A* の発現抑制〕

EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞への *miR-451a* 核酸導入により、mRNA (qRT-PCR 法、 $p < 0.001$) および蛋白レベル (western blotting) で *KIF2A* の発現抑制を認めた。EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞に *miR-451a* の予測結合配列を含んだ *KIF2A* の 3'-UTR をクローニングした vector と *miR-451a* とを遺伝子導入したところ、ルシフェラーゼ活性が有意に低下した ($p < 0.001$)。このことから、*miR-451a* は *KIF2A* の 3'-UTR における特定の配列に直接作用し、*KIF2A* の発現を抑制していることが示された。

〔*KIF2A* の免疫染色および *KIF2A* 発現による臨床 database 解析〕

肺扁平上皮癌臨床検体における *KIF2A* の発現を免疫染色で評価し、非癌部と比較し、癌部で高発現していることを確認した。TCGA database を利用した多変量解析で、*KIF2A* の高発現は臨床病期や TNM factor とは独立した予後不良因子であった (hazard ratio = 1.493、 $p = 0.034$)。

〔*KIF2A* の機能解析〕

si-*KIF2A* を EBC-1 細胞、SK-MES-1 細胞に核酸導入し、機能解析を行った。si-*KIF2A* 導入細胞において、XTT assay では増殖抑制を認め ($p < 0.001$)、apoptosis の誘導を認めた ($p < 0.001$)。また wound healing assay では遊走能の抑制を ($p < 0.001$)、invasion assay では浸潤能の抑制を認めた ($p < 0.001$)。

〔*KIF2A* が制御する分子経路の探索〕

si-*KIF2A* を導入した SK-MES-1 細胞で発現が低下した 3621 遺伝子を選出し、そのうち GEO database において肺癌で発現が亢進している 92 遺伝子を選出した。KEGG pathway categories での解析で、*KIF2A* は cell cycle、p53 signaling pathway、DNA replication の経路を制御していることが判明した。

【結論及び考察】

肺扁平上皮癌において、*miR-451a* は癌抑制性 miRNA として機能し、*KIF2A* を直接的に制御する。*KIF2A* は癌促進遺伝子で、*KIF2A* の発現抑制により肺扁平上皮癌細胞の進展が抑制される。癌抑制型 miRNA を起点とした癌関連遺伝子の探索は、肺扁平上皮癌の病因を解明する新しい分子ネットワークの発見につながる可能性がある。

(Cancers. Vol.11, No.2 2019 年 掲載)