

## 論 文 要 旨

**RNA sequencing-based microRNA expression signature in esophageal squamous cell carcinoma: oncogenic targets by antitumor miR-143-5p and miR-143-3p regulation**

RNA シークエンスによる  
食道扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルの作成：  
癌抑制型 *miR-143-5p* と *miR-143-3p* が制御する  
癌促進型遺伝子の影響

和田 真澄

**【序論及び目的】**

食道癌は組織学的に食道扁平上皮癌(ESCC)と食道腺癌に分けられ、世界中で 50 万人以上が死亡している。日本では食道癌患者の 90%以上が ESCC と診断されており、毎年約 23000 が新たに罹患し、10000 人が死亡している。食道扁平上皮癌の臨床において、近年開発が相次いでいる、分子標的治療薬も、食道扁平上皮癌の再発症例・遠隔転移症例に対しては効果が乏しく、新しい治療選択肢が求められている。

近年、癌の腫瘍増殖・転移・化学療法の抵抗性などについて、マイクロ RNA (miRNA)の発現異常との関連が多く報告されている。miRNA は、19-22 塩基の低分子 RNA であり、細胞内で蛋白コード遺伝子・蛋白非コード遺伝子(機能性 RNA)の発現を調節し、miRNA の特徴として、1 種類の miRNA が、数十～数千種類の機能性 RNA の発現を制御している。食道扁平上皮癌の機能性 RNA ネットワークの探索は、ESCC の再発や遠隔転移の分子機序解明と、治療標的分子の探索に繋がると考えた。

本研究において以下の 3 項目を目的とした。(1) RNA シークエンサーを用いた解析から、食道扁平上皮癌・miRNA 発現プロファイルを作成すること、(2) プロファイルに基づいて、miR-143-5p(passenger strand), miR-143-3p(guide strand)の癌抑制機能を明らかにすること、(3) miR-143-5p, miR-143-3p を起点として、食道扁平上皮癌に特徴的な癌促進型遺伝子の探索。

**【材料及び方法】**

当教室の根治手術で得られた食道扁平上皮癌組織 4 例と非癌部組織 4 例から RNA を抽出し、miRNA 発現プロファイルを作成した。食道扁平上皮癌組織 23 例と非癌部組織 11 例から RNA を抽出し、定量 PCR 法により miR-143-5p, miR-143-3p の発現を確認した。機能解析として、食道扁平上皮癌細胞株 (TE-1、TE-8)に miRNA 及び siRNA を核酸導入し、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を評価した。miRNA の標的分子探索は、マイクロアレイ遺伝子発現解析と公共のデータベース(Targetscan database、GEO database、The Cancer Genome Atlas(TCGA))を利用し、ゲノム科学的手法で解析した。標的遺伝子の臨床検体における発現は免疫染色で評価した。miR-143-5p, miR-143-3p による標的遺伝子の抑制効果は、miR-143-5p, miR-143-3p 導入細胞より蛋白・RNA を抽出し、ウェスタンブロッティング、pRT-PCR により検討した。また、ルンフェラーゼアッセイにより miR-143-5p と予測結合配列(標的遺伝子 mRNA)の結合を評価した。

**【結 果】**

- ① 食道扁平上皮癌・miRNA 発現プロファイルから、47 種の miRNA が癌部において発現が抑制されていた。本研究では、miR-143 前駆体から派生する miR-145-5p (passenger strand) と miR-143-3p (guide strand) に着目した。
- ② miR-143-5p と miR-143-3p を食道細胞株(TE-1、TE-8)に核酸導入することで、癌細胞の浸潤能、遊走能の顕著な抑制を認めた。
- ③ miR-143-5p と miR-143-3p が制御する機能性ネットワークの探索を行った結果、miR-143-5p については 6 つの遺伝子 (HN1、HMGA2、NETO2、STMN1、TCF3、MET) が、miR-143-3p については 1 つの遺伝子 KRT80(Keratin80)が ESCC の癌促進型遺伝子の候補となった。
- ④ siRNA を用いて miR-143-5p の標的遺伝子である HMGA2、miR-143-3p の標的遺伝子である KRT80 をノックダウンすることで、扁平上皮癌の増殖能、遊走能、浸潤能の顕著な抑制を認めた。

#### 【結論及び考察】

RNA シークエンスにより、食道扁平上皮癌・miRNA 発現プロファイルを作成した。プロファイルに基づき、miR-143-5p (passenger strand)および miR-143-3p (guide strand)に着目した。これまでのマイクロ RNA の生合成において、miRNA 前駆体から派生する passenger strand は、機能を有しないとされていた。この概念に対して、本研究では、miR-143-5p は、miR-143-3p と共に、食道扁平上皮癌細胞で癌抑制型マイクロ RNA である事を明らかにした。更に、両マイクロ RNA が制御する癌促進型遺伝子の探索を行い、HMGA2 および KRT80 を見出した。今回作成した、食道扁平上皮癌・miRNA 発現プロファイルは、食道扁平上皮癌の新たな予後予測マーカーや治療標的分子の探索において有効な情報を提供する。本プロファイルに基づいて、食道扁平上皮癌の新規分子ネットワークが探索可能であると考える。

(Journal of human genetics Vol.65, 1019-1034 2020 年 掲載)