

論 文 要 旨

Molecular Pathogenesis of Gene Regulation by the *miR-150* Duplex: *miR-150-3p* Regulates *TNS4* in Lung Adenocarcinoma

miR-150 duplex による遺伝子制御:
肺腺癌において、*miR-150-3p* は *TNS4* を制御する

美園 俊祐

【序論及び目的】

肺癌は世界的に死亡者数が最も多い癌の1つであり、その罹患率は増加傾向にある。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、分子標的治療や免疫チェックポイント阻害薬の出現によって劇的に改善したが、遠隔転移を有する肺腺癌において、その効果は限定的で、5年生存率は20%未満と予後不良である。従って、より効果的な分子標的治療を開発するための研究は不可欠である。

近年、多くの研究において、蛋白質をコードしないRNA分子がヒトゲノムより転写され、機能していることが明らかとなった。その中で、19~22塩基の1本鎖RNA分子であるマイクロRNAは、その発現異常がRNAネットワークの破綻を引き起こし、癌の発生・進展・転移に関与することが示されている。マイクロRNAは生合成の過程において、標的遺伝子を制御するガイド鎖と、機能がなく分解されるパッセンジャー鎖に分離されるが、最近の研究において、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖両者が癌抑制型マイクロRNAあるいは癌促進型マイクロRNAとして機能することが報告されている。その中で、*miR-150-5p* (ガイド鎖) と *miR-150-3p* (パッセンジャー鎖) は食道癌や頭頸部扁平上皮癌において発現が抑制されており、癌抑制型マイクロRNAとして機能することが示された。本研究は、肺腺癌における *miR-150* duplex の両鎖の機能を解析した。さらにパッセンジャー鎖である *miR-150-3p* に注目し、それが制御する癌促進型遺伝子の探索を目的とした。

【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腺癌18検体、非癌部28検体よりRNAを抽出し、qRT-PCR法により *miR-150-5p* および *miR-150-3p* の発現を解析した。細胞株はヒト肺腺癌細胞株であるA549細胞、H1299細胞を使用した。*miR-150-5p*、*miR-150-3p* を核酸導入し、両者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、浸潤能を評価した。*miR-150-5p* および *miR-150-3p* 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。臨床検体における、標的遺伝子の発現は免疫染色にて評価した。*miR-150-3p* による標的遺伝子の抑制効果は、*miR-150-3p* 導入細胞よりRNA、蛋白を抽出し、qRT-PCR法、western blotting で評価した。*miR-150-3p* 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を導入した細胞株と、サイトメガロウイルスベクターを用いて標的遺伝子を過剰発現させた細胞株を用いて行った。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 を利用した。

【結果】

〔肺腺癌手術検体での *miR-150 duplex* の発現解析および発現による database を用いた予後解析〕

qRT-PCR 法による肺腺癌手術検体での解析で、癌部 (n = 18) では、非癌部 (n = 28) と比較し、有意に *miR-150-5p* および *miR-150-3p* の発現低下を認めた ($p < 0.001$)。

TCGA database を利用した解析で、肺腺癌における *miR-150-5p* および *miR-150-3p* の発現低下は予後不良に関連した (5 年生存率: $p = 0.0078$, $p = 0.043$)。

〔*miR-150 duplex* の肺腺癌における機能解析〕

miR-150-5p および *miR-150-3p* を A549 細胞、H1299 細胞に核酸導入し、機能解析を行った。*miR-150-5p* および *miR-150-3p* 導入細胞において、XTT assay では増殖抑制を認め ($p < 0.05$)、wound healing assay では遊走能の抑制を ($p < 0.01$)、invasion assay では浸潤能の抑制を認めた ($p < 0.01$)。

〔*miR-150 duplex* の標的遺伝子候補の選出〕

TargetScanHuman database を用いて *miR-150-3p* と結合する可能性のある 2180 遺伝子を抽出した。次に、2180 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 211 遺伝子を選出した。さらに *miR-150-3p* を核酸導入した A549 細胞で発現が低下している 26 遺伝子を選出した。26 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 *TNS4* に着目し (5 年生存率: $p = 0.0003$, 5 年無病生存率: $p = 0.0213$)、その後の解析を行った。

〔*miR-150-3p* 核酸導入による *TNS4* の制御〕

A549 細胞へ *miR-150-3p* 核酸導入を行い、mRNA (qRT-PCR 法、 $p < 0.01$) および蛋白レベル (western blotting) で *TNS4* の発現抑制を認めた。A549 細胞に *miR-150-3p* の予測結合配列を含んだ *TNS4* の 3'-UTR をクローニングした vector と *miR-150-3p* 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 ($p < 0.01$)。このことから、*miR-150-3p* は *TNS4* の 3'-UTR における特定の配列に直接作用し、*TNS4* の発現を抑制していることが示された。

〔*TNS4* の免疫染色〕

肺腺癌検体における *TNS4* の発現を免疫染色で評価したところ、非癌部と比較し、癌部で高発現していることを確認した。

〔肺腺癌における *TNS4* の機能解析〕

A549 細胞に si-*TNS4* を核酸導入し、機能解析を行った。si-*TNS4* 導入細胞において、XTT assay では増殖抑制を認め ($p < 0.01$)、wound healing assay では遊走能の抑制を ($p < 0.01$)、invasion assay では浸潤能の抑制を認めた ($p < 0.01$)。また、H1299 細胞にサイトメガロウイルスベクターを用いて *TNS4* を過剰発現させて、機能解析を行った。*TNS4* を過剰発現させた細胞株において、遊走能および浸潤能の促進を認めた。このことから、*TNS4* は、肺腺癌において、癌促進遺伝子として機能していることを明らかにした。

【結論及び考察】

肺腺癌において、*miR-150 duplex* は癌抑制性型マイクロ RNA として機能していることを明らかにした。*in vitro* において、パッセンジャー鎖である、*miR-150-3p* は *TNS4* を直接的に制御し、*TNS4* の発現抑制により肺腺癌の進展が抑制された。*TNS4* は癌促進遺伝子であり、治療標的分子となる可能性が示唆された。

(Cancers. Vol.11, No.5 2019 年 掲載)