

論 文 要 旨

The microRNA expression signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by RNA sequencing: anti-tumor functions of the *microRNA-216* cluster

〔 次世代シーケンサーを用いた膵癌における microRNA 発現プロファイルの作成 ; *microRNA-216* クラスターの腫瘍抑制効果 〕

米盛 圭一

【序論及び目的】

膵癌は非常に予後の悪い悪性腫瘍の一つである。近年開発が盛んな分子標的薬の治療効果も得られず、膵癌の悪性度に関する新たな分子ネットワークの解明が必要である。

non-coding RNA の一つである microRNA (miRNA) は、その発現異常が癌の発生・進展・転移に関与することが報告されている。今回申請者らは次世代シーケンサーを用いた膵癌の miRNA 発現プロファイルを作成し、クラスターを形成する 4 種類の miRNA (*miR-216a-5p/miR-216a-3p*、*miR-216b-5p/miR-216b-3p*) の発現が膵癌組織で顕著に抑制されていることを示した。

本研究では、これら miRNA の機能解析と、miRNA が制御する分子経路の探索を目的とした。

【材料及び方法】

1991 年から 2014 年に鹿児島大学病院で切除を行った膵腺癌 24 検体、正常膵 14 検体を用いて RNA を抽出した。このうち癌部 7 検体と正常膵 4 検体から抽出した RNA を用い、次世代シーケンサーを用いて miRNA の発現プロファイルを作成した。*miR-216a-5p/miR-216a-3p*、*miR-216b-5p/miR-216b-3p* の発現を膵腺癌 24 検体、正常膵 14 検体から抽出した RNA を用いた qRT-PCR 法により解析した。

miR-216a-5p/miR-216a-3p、*miR-216b-5p/miR-216b-3p* を膵腺癌細胞株 (PANC-1、SW 1990) に遺伝子導入し、これら miRNA の腫瘍抑制効果を評価した。機能解析は miRNA 導入細胞の増殖能 (XTT assay)、遊走能 (migration assay)、浸潤能 (matrigel invasion assay) について評価した。最も腫瘍抑制効果が強かった *miR-216b-3p* の標的遺伝子の選出には、*miR-216b-3p* を導入した膵癌細胞株を用いたマイクロアレイ解析と、公共のデータベース (TargetScan database、GEO database) 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 qRT-PCR 法にて評価した。標的遺伝子の機能解析は、siRNA を用いて標的遺伝子を膵癌細胞株 (PANC-1、SW 1990) へ導入し、細胞の増殖能 (XTT assay)、遊走能 (migration assay)、浸潤能 (matrigel invasion assay) を評価した。*miR-216b-3p* による標的遺伝子の抑制効果は、*miR-216b-3p* 導入細胞より蛋白・RNA を抽出し、western blotting、qRT-PCR により検討し

た。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*miR-216b-3p* と予測結合配列(標的遺伝子 mRNA)の結合を評価した。標的遺伝子が制御する下流のネットワークを探索するため、標的遺伝子導入細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。

【結 果】

- 1) 次世代シーケンサーを用いて膀胱癌における miRNA 発現プロファイルを作成した。*miR-216a-5p/miR-216a-3p*、*miR-216b-5p/miR-216b-3p* は正常膀胱と比較して有意に癌部で発現が低下しており、これらの miRNA は全て染色体の 2q16.1 に存在しクラスターを形成していた。
- 2) 臨床検体、癌細胞株を用いた qRT-PCR でも *miR-216a-5p/miR-216a-3p*、*miR-216b-5p/miR-216b-3p* の発現は膀胱癌組織、癌細胞株で有意に低下していた。
- 3) 機能解析では、*miR-216a-5p/miR-216a-3p*、*miR-216b-5p/miR-216b-3p* は癌細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制し、特に *miR-216b-3p* が最も腫瘍抑制効果が顕著であった。
- 4) *miR-216b-3p* が制御する分子ネットワークを探索した結果、転写因子として知られる FOX ファミリーの 1 つである FOXQ1 が直接 *miR-216b-3p* に抑制されていた。
- 5) 臨床検体、癌細胞株において FOXQ1 は正常膀胱と比較して有意に癌部・癌細胞株で発現が高く、siRNA を用いた機能解析では FOXQ1 は特に癌細胞の遊走・浸潤に関与していることが明らかになった。免疫染色を用いた検討では、FOXQ1 高発現群は有意にリンパ節転移が多く ($p=0.0088$)、予後も不良であった ($p=0.0007$)。

【結論及び考察】

本研究では、*miR-216 family* が膀胱癌の腫瘍進展に重要であることが示された。ガイド鎖である *miR-216a-5p* と *miR-216b-5p* についてはいくつかの癌で腫瘍抑制効果が報告されているが、パッセンジャー鎖である *miR-216a-3p* と *miR-216b-3p* については十分な研究がなされていない。パッセンジャー鎖はこれまで分解されて機能しないとされていたが、今回の検討では *miR-216a-3p* と *miR-216b-3p* ともに腫瘍抑制効果を示した。膀胱癌や肺癌においても同様にパッセンジャー鎖が腫瘍抑制効果をもつとの報告があり、今後はパッセンジャー鎖 miRNA の働きの解明が重要になってくると考えられる。

今回 *miR-216 family* の中で最も腫瘍抑制効果が強かった *miR-216b-3p* の標的遺伝子として FOXQ1 が同定されたが、これまでも膀胱癌を含む様々な癌で癌遺伝子として報告されている。申請者らは転写因子である FOXQ1 の下流の遺伝子群を同定するためにマイクロアレイを行い、多くの遺伝子が FOXQ1 に制御されていることが明らかにした。その中には膀胱癌で癌遺伝子として報告されている遺伝子を多く含んでおり、FOXQ1 が制御する分子経路は、膀胱癌の悪性度に強く関わっていると思われた。

本研究では次世代シーケンサーを用いた膀胱癌 miRNA 発現プロファイルを作成し、これを用いることで膀胱癌の悪性度に関する新たな miRNA ネットワークが同定された。本プロファイルは膀胱癌における分子経路の探索に有効な情報を提供すると考えられた。