

論 文 要 旨

Tumor-suppressive *microRNA-206* as a dual inhibitor of *MET* and *EGFR* oncogenic signaling in lung squamous cell carcinoma.

腫瘍抑制性 *microRNA-206* は肺扁平上皮癌において
MET、*EGFR* による腫瘍促進性シグナルを抑制する

俣木 浩子

【序論及び目的】

非小細胞肺癌の治療は分子標的治療により大きく変化してきた。しかし、その治療適応例のほとんどが肺腺癌症例であり、肺扁平上皮癌については有効な治療選択肢が限定されている。

近年、機能性 RNA である *microRNA* (*miRNA*) の発現異常が癌の発生・進展・転移に関与する事が示されている。我々は、肺扁平上皮癌の *miRNA* array による発現プロファイルから癌組織において発現が低下していた *microRNA-206* (*miR-206*) に着目した。*miR-206* は肺癌を含め多くの癌腫で重要な役割をもつチロシンキナーゼ受容体 *MET*、*EGFR* を標的遺伝子候補としてもつ。*MET*、*EGFR* は非小細胞肺癌において過剰発現が報告されており、腫瘍の増殖、浸潤、転移及び血管新生の促進に関与していると考えられている。また、*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌において *EGFR*-TKI は極めて有用な薬剤であるが、その耐性獲得の約 20% に *MET* の増幅を認めることが報告されている。

本研究では肺扁平上皮癌における *miR-206* の腫瘍抑制機能を明らかにし、標的遺伝子 *MET*、*EGFR* の二重阻害作用を介した腫瘍抑制機構を検証する。

【材料及び方法】

2010 年より 2013 年に鹿児島大学で肺葉切除を施行した肺扁平上皮癌 32 検体、正常肺 22 検体より RNA を抽出し、qRT-PCT 法により *miR-206* の発現を解析した。

細胞株はヒト扁平上皮肺癌細胞株である EBC-1 細胞を使用した。*miR-206* を EBC-1 細胞に遺伝子導入し、*miR-206* の腫瘍抑制機能を評価した。機能解析は *miR-206* 導入細胞の増殖能 (XTT assay)、遊走能 (wound healing assay)、浸潤能 (matrigel invasion assay)、アポトーシス、cell cycle について評価した。*miR-206* の標的遺伝子の選出には公共のデータベース (TargetScan database、GEO database、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) pathway categories) 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にて評価した。*miR-206* による標的遺伝子の抑制効果は、*miR-206* 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-206* と予測結合配列 (標的遺伝子 mRNA) の結合を評価した。

【結 果】

〔*miR-206* の肺扁平上皮癌臨床検体及び細胞株における発現低下〕

miR-206 の発現を qRT-PCR 法により解析したところ、肺扁平上皮癌臨床検体 (n = 32) 及び肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1 細胞では正常肺組織 (n = 22) と比較し、有意な発現の低下を認めた ($P < 0.0001$)。

〔*miR-206* の腫瘍抑制機能〕

miR-206 を EBC-1 細胞に遺伝子導入し機能解析をおこなった。

XTT assay では *miR-206* による増殖抑制を認めた ($P < 0.0001$)。 *miR-206* 導入細胞ではアポトーシスによる細胞死を認め、G0/G1 期の cell cycle arrest を認めた。wound healing assay では遊走能 ($P < 0.0001$)、invasion assay では浸潤能 ($P < 0.001$) の抑制を認めた。

〔*miR-206* の標的遺伝子候補の選出〕

TargetScan database を利用し、*miR-206* の予測結合配列を有する標的遺伝子候補を検索した。標的遺伝子候補を GeneCodis program を使用し Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) pathway categories により解析したところ、チロシンキナーゼ受容体関連の pathway の関与が示唆された。さらに、肺扁平上皮癌臨床検体における発現を GEO database (accession no. GSE 11117) を利用し確認したところ、発現亢進を認めていた。チロシンキナーゼ受容体関連の pathway には肺癌において重要な遺伝子である *EGFR*、*MET* が含まれており、*miR-206* の *MET*、*EGFR* の二重抑制効果に着目し、解析対象とした。

〔*MET*、*EGFR* の免疫染色〕

肺扁平上皮癌臨床検体における *MET*、*EGFR* の発現を免疫染色で評価し、*MET*、*EGFR* の双方が陽性であった検体も認められた。

〔*miR-206* の *MET* 及び *EGFR* の発現抑制〕

EBC-1 細胞に *miR-206* を遺伝子導入したところ、mRNA レベル (qRT-PCR 法, $P < 0.001$) 及び蛋白レベル (Western blotting) で *MET* 及び *EGFR* の発現抑制を認めた。さらに *MET* 及び *EGFR* のリン酸化や下流のシグナルである p-AKT、p-ERK の抑制も Western blotting で確認した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイでは *MET* もしくは *EGFR* における *miR-206* の予測結合配列を TargetScan database により検索し、vector へのクローニング配列を決定した。予測結合配列である *MET* (positions 499–505, 814–820)、*EGFR* (positions 746–752) それぞれを含む 3'-UTR を vector にクローニングした。EBC-1 細胞に *miR-206* とその予測結合配列を含む *MET* もしくは *EGFR* の 3'-UTR をクローニングした vector 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ていた ($P < 0.0001$)。このことから *miR-206* は *MET* および *EGFR* の 3'-UTR における特定の配列に直接作用し、その発現を抑制していることが示唆された。

【結論及び考察】

EGFR 及び *MET* の二重阻害作用を有する癌抑制性 *miR-206* は非常に魅力的であり、その腫瘍抑制機構の解明は腫瘍進展の分子機構を明らかにし、将来的に治療ツールの開発につながる可能性を秘めている。