

論 文 要 旨

Oncogenic Targets Regulated by Tumor-Suppressive *miR-30c-1-3p* and *miR-30c-2-3p*: *TRIP13* Facilitates Cancer Cell Aggressiveness in Breast Cancer

癌抑制型 miRNA (*miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p*)が
制御する癌遺伝子 *TRIP13* は乳癌の攻撃性を促進する

満枝 怜子

【序論及び目的】

乳癌は世界中の女性の間で最も多い癌であり、毎年約 230 万人の女性が乳癌と診断され、70 万人が乳癌関連で死亡している。女性の 5 人に 1 人が生涯のうちに乳癌を発症すると推定されており、乳癌の早期診断法の開発と新しい治療法の発見は重要な課題である。

ポストゲノム時代において、様々なノンコーディング RNA が細胞内で転写され、細胞の分化、増殖、遊走、免疫応答などの重要な機能に深く関与していることが明らかとなった。これらのノンコーディング RNA のうち、マイクロ RNA (miRNA) は短い一本鎖の RNA で、その塩基配列は様々な遺伝子発現の調整役として働いている。また、一つの miRNA は同時に多くの遺伝子の発現を制御することができる。そのため、miRNA の有無により、細胞内の標的遺伝子の発現は乱され、正常細胞の悪性化に寄与する可能性がある。多くの研究から、異常発現した miRNA は、癌細胞において対応する遺伝子を標的とすることで、癌遺伝子や癌抑制因子として振る舞うことが明らかになっている。

我々は乳癌臨床検体を用いた RNA シークエンスにより、乳癌 RNA 発現シグネチャーを作成した。このプロファイルの解析から、乳癌組織で発現が抑制されている miRNA を見出し、その機能と、miRNA が制御する標的遺伝子の探索を行った。本研究では、乳癌組織で発現が抑制されていた *miR-30c-1-3p* と *miR-30c-2-3p* (パッセンジャー鎖)に着目し、乳癌細胞における機能と、それが制御する癌遺伝子を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

乳癌細胞株は MDA-MB-157 と MDA-MB-231 を用い、miR precursor と siRNA を用いて核酸導入を行い、細胞増殖能及び遊走能、浸潤能の変化を評価した。miRNA の標的分子の探索は公共のデータベース(TargetScanHuman、The Cancer Genome Atlas (TCGA))を利用しゲノム科学的手法で解析した。標的分子の抑制効果は *miR-30c-1-3p* と *miR-30c-2-3p* を核酸導入した乳癌細胞株から RNA と蛋白を抽出し、qRT-PCR 法及びウェスタンブロット法で確認した。またルシフェラーゼレポーターアッセイと RNA 免疫沈降法により標的 mRNA と *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* との直接の結合を評価した。標的蛋白分子の臨床検体における発現は免疫組織化学染色により評価した。

【結 果】

乳癌抑制型 miRNA (miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p) の機能解析について

TCGA での解析の結果、当院のプロファイルから選択した *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* の乳癌組織での発現は正常組織と比べ有意に低下しており、その低発現は予後の悪化に有意に関連していた。

miR-30c-1-3p, *miR-30c-2-3p* を乳癌細胞株に核酸導入し、細胞の増殖能及び浸潤能、遊走能を評価した。その結果、*miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* は、乳癌細胞の増殖能及び遊走能、浸潤能を制御している事が明らかになった。

乳癌抑制型 miRNA (miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p) が制御する癌遺伝子の探索について

当院乳癌細胞の遺伝子発現データ(GSE118539)で発現が上昇しており、かつ TargetScanHuman で *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* が制御する癌遺伝子の探索を行い、62 遺伝子を候補として抽出した。さらに、TCGA データベースを用い、乳癌で有意に発現上昇し、予後の悪化に関わる 7 遺伝子を同定した。この中から、当院の遺伝子データの中で最も発現量が上昇していた *TRIP13* に着目した。

乳癌細胞における miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p による TRIP13 の制御について

miR-30c-1-3p, *miR-30c-2-3p* を核酸導入した乳癌細胞株において、*TRIP13* の RNA と蛋白の発現が有意に抑制されることがそれぞれ qRT-PCR 法、ウェスタンブロット法で判明した。さらに、RNA 免疫沈降法及びルシフェラーゼレポーターアッセイの結果から、*TRIP13* の発現は *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* により、直接制御されている事を明らかにした。

乳癌における TRIP13 の臨床的重要性について

当院の乳癌臨床検体を用いた免疫染色の結果、*TRIP13* が乳癌組織において正常組織と比べて明らかに発現亢進していることを確認した。また、臨床的予後因子で調整した多変量解析においても、*TRIP13* は独立した予後因子であることが示された。乳癌細胞における *TRIP13* が介在する分子ネットワークを調べるため、Gene set enrichment analysis (GSEA)を行った結果、*TRIP13* が高発現している患者において、「E2F 標的」、「G₂M チェックポイント」、及び「MYC 標的」の経路は低発現している患者と比較して濃縮していることが判明した。

乳癌細胞における TRIP13 の機能解析について

遺伝子の機能解析について、siRNA を用いた loss-of-function により検討した。*TRIP13* をノックダウンした細胞株では、細胞の増殖能が有意に抑制された。また、*TRIP13* 阻害剤である DCZ0415 を投与すると、濃度依存的に細胞の増殖能が抑制されることが示された。

【結論及び考察】

miR-30 family は 6 つの miRNA(*miR-30a*, *miR-30b*, *miR-30c-1*, *miR-30c-2*, *miR-30d*, *miR-30e*)で構成される。これまで、*miR-30c-5p* による様々な癌腫の制御機能については報告があるが、パッセンジャー鎖である *miR-30c-3p* の詳細な報告はなかった。TCGA の解析によると、*miR-30c-5p* は乳癌患者の予後に有意な影響を及ぼさないが、*miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* は明らかな予後改善が見られたため、今回当院の乳癌 miRNA 発現プロファイルでも発現抑制が示された *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* に着目した。これら miRNA が標的遺伝子を制御するシード配列は同一である (UGGGAG)。

miR-30c-1-3p, *miR-30c-2-3p* の高発現は、乳癌細胞の増殖能、浸潤能、遊走能を減弱させたことから、これらの miRNA は乳癌細胞において癌抑制型 miRNA として働くことが示唆された。合計 7 つの遺伝子 (*TRIP13*, *CCNB1*, *RAD51*, *PSPH*, *CENPN*, *KPNA2*, 及び *MXRA5*) が *miR-30c-1-3p* および *miR-30c-2-3p* の推定ターゲットであり、それらの高発現レベルは患者の予後悪化と関連していた。*TRIP13* は *miR-30c-1-3p* と *miR-30c-2-3p* によって直接制御され、その過剰発現は乳癌細胞の攻撃性を促進した。今回、癌抑制型 miRNA の解析に基づき、乳癌の分子病態に密接に関連する遺伝子を同定することが可能であった。

