

論 文 要 旨

**MicroRNA Signatures in Lung Adenocarcinoma Metastases:
Exploring the Oncogenic Targets of Tumor-Suppressive
miR-195-5p and *miR-195-3p***

肺腺癌の転移における microRNA シグネチャー：
miR-195-5p と *miR-195-3p* が制御する癌促進型遺伝子の探索

富岡 勇也

【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、その約 85%は非小細胞肺癌で、特に肺腺癌が多くを占める。近年、分子標的治療や免疫チェックポイント阻害薬の導入により肺腺癌の予後は改善しているものの、遠隔転移を有する症例や再発症例の予後は依然として不良であり、特に脳転移患者の生存期間中央値は 3~6 か月と極めて予後不良である。このため、肺癌細胞の脳転移に関与する分子機構の解明が不可欠である。マイクロ RNA は 18~25 塩基からなる 1 本鎖のノンコーディング RNA であり、配列依存的に数百~数千種類の機能性 RNA の発現を制御することで、複雑な細胞内分子ネットワークを形成する。マイクロ RNA の発現異常は細胞内ネットワークの破綻を引き起こし、さまざまな疾患の発症や進展に関与することが知られている。癌においても、マイクロ RNA の異常発現が腫瘍の進行や悪性化に影響を及ぼすことが報告されている。従来、マイクロ RNA はガイド鎖のみが機能すると考えられてきたが、近年、一部のパッセージ鎖もガイド鎖と同様に機能することが示されている。本研究では、肺腺癌症例の原発巣および脳転移巣組織を用いたマイクロ RNA 発現プロファイル解析から、転移巣で発現が著しく低下していた *miR-195-5p* と *miR-195-3p* に着目し、それら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】

肺腺癌の手術症例より、原発巣 5 検体および脳転移巣 4 検体から RNA 抽出を行い、マイクロ RNA シークエンスを実施して発現プロファイルを作成した。原発巣と比較し脳転移巣で発現が低下したマイクロ RNA の中から、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* を候補として選出した。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-195-5p* および *miR-195-3p* を核酸導入し、腫瘍抑制機能を評価した。増殖能は XTT assay、遊走能は wound healing assay、浸潤能は transwell invasion assay で確認した。細胞周期とアポトーシスはフローサイトメトリーで評価した。TargetScanHuman database、GEO database、GeneCodis4 database を利用して、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* によって制御される候補遺伝子を同定した。臨床 database 解析には TCGA database、cBioPortal、OncoLnc を利用して解析した。*miR-195-5p* および *miR-195-3p* による標的遺伝子の抑制効果は、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* 導入細胞から RNA、蛋白を抽出し、qRT-PCR 法、Western blotting で評価した。*miR-195-5p* および *miR-195-3p* 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、標的遺伝子に対する siRNA を導入した細胞株で行った。標的遺伝子が制御する分子ネットワークを GEO database、GeneCodis4 database

を用いて解析した。

【結 果】

〔肺腺癌における *miR-195-5p* および *miR-195-3p* の発現解析および database を用いた予後解析〕

マイクロ RNA シークエンス解析により、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* は原発巣と比較して脳転移巣で発現が著しく低下していた。TCGA database を用いた解析では、肺腺癌組織では正常肺組織と比較し *miR-195-5p* および *miR-195-3p* の発現は有意に低下しており、*miR-195-3p* の発現低下は予後不良と有意に関連していた。

〔*miR-195-5p* および *miR-195-3p* の肺腺癌における機能解析〕

miR-195-5p および *miR-195-3p* を A549 細胞、H1299 細胞に核酸導入し、機能解析を行った。その結果、両細胞株において細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が抑制され、細胞周期の進行が抑制されアポトーシス細胞が増加した。

〔*miR-195-5p* および *miR-195-3p* の標的遺伝子候補の選出〕

miR-195-5p および *miR-195-3p* に結合する可能性のある遺伝子を TargetScanHuman database から抽出し、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* を導入した A549 細胞で発現が低下した遺伝子 (GSE 281258) と照合したところ、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* の標的遺伝子候補としてそれぞれ 95 遺伝子、63 遺伝子を同定した。計 158 遺伝子を GeneCodis4 database で解析した結果、27 遺伝子が細胞周期の制御に関連していた。TCGA database による解析で、27 遺伝子のうち 12 遺伝子が正常肺組織と比較し肺腺癌組織で有意に発現上昇しており、その高発現は肺腺癌患者の予後不良と関連していた。それぞれの標的遺伝子候補の中から、予後に最も有意差のあった *ANLN* を *miR-195-5p*、*MAD2L1* を *miR-195-3p* の標的遺伝子として選出した。

〔*miR-195-5p* および *miR-195-3p* による *ANLN* および *MAD2L1* の制御〕

miR-195-5p および *miR-195-3p* を導入した細胞でそれぞれ *ANLN* および *MAD2L1* の mRNA および蛋白の発現が抑制された。ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、*ANLN* および *MAD2L1* の 3'-UTR に存在するマイクロ RNA 結合部位を含むレポーターとそれぞれのマイクロ RNA を共導入したところ、ルシフェラーゼ活性が有意に低下した。これにより、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* は、それぞれ *ANLN*、*MAD2L1* の 3'-UTR へ直接結合し、発現を抑制していることが示された。

〔肺腺癌における *ANLN* および *MAD2L1* の機能解析〕

si-*ANLN* および si-*MAD2L1* を A549 細胞、H1299 細胞に核酸導入し、機能解析を行った。その結果、両細胞株において細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が抑制され、細胞周期の進行が抑制されアポトーシス細胞が増加した。

〔肺腺癌における *ANLN* および *MAD2L1* の制御する分子ネットワークの解析〕

si-*ANLN* および si-*MAD2L1* を核酸導入した A549 細胞から RNA を抽出し RNA シークエンス解析を実施したところ、si-*ANLN* の核酸導入により *MAD2L1* の発現が抑制され、si-*MAD2L1* の核酸導入により *ANLN* の発現が抑制されることが確認された。si-*ANLN* および si-*MAD2L1* の核酸導入により発現が低下した遺伝子の中で、39 遺伝子が共通して低下していた。GeneCodis4 database を用いた分子機能解析により、これらの遺伝子の多くが細胞周期の制御に関与していることが示された。

【結論及び考察】

肺腺癌において、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* は癌抑制型マイクロ RNA として機能することが明らかになった。さらに、*miR-195-5p* および *miR-195-3p* の直接標的としてそれぞれ *ANLN*、*MAD2L1* を同定し、それぞれが肺腺癌細胞において癌促進遺伝子として機能することを明らかにした。*ANLN* と *MAD2L1* は肺腺癌の治療標的になりうることが示唆された。

