

## 論 文 要 旨

# Identification of Tumor-Suppressive miR-30a-3p Controlled Genes: ANLN as a Therapeutic Target in Breast Cancer

腫瘍抑制性 miR-30a-3p により制御される遺伝子の同定  
—乳癌における治療標的としての ANLN—

永田 彩子

## 【序論及び目的】

乳癌は女性において最も頻度の高い悪性腫瘍であり、分子標的治療やホルモン療法の発展にもかかわらず依然として予後不良例が存在する。近年、マイクロ RNA (miRNA) が転写後調節因子として癌の発生や進展に深く関与することが明らかとなっている。我々は RNA シークエンスを用いた乳癌臨床検体の解析から、miR-30 ファミリーの一部が顕著に発現抑制されていることを報告した。その中でも\*\*miR-30a-3p (passenger strand)\*\*は乳癌組織で有意に低発現を示し、低発現例では予後不良であることが TCGA 解析から示唆された。本研究の目的は、腫瘍抑制性 miR-30a-3p の機能を解明し、その制御下にある癌関連遺伝子を同定することで、新規治療標的分子を探索することである。

## 【材料及び方法】

- ① 臨床検体およびデータベース解析：TCGA-BRCA データセットを用い、miR-30a-3p および標的遺伝子の発現解析と生存解析を実施した。
- ② 細胞株：トリプルネガティブ乳癌細胞株 (MDA-MB-157、MDA-MB-231) を使用。
- ③ 遺伝子導入および機能解析：miR-30a-3p を一過性に導入し、XTT アッセイによる増殖能、Transwell 法による浸潤・遊走能を評価した。
- ④ 網羅的遺伝子発現解析：miR-30a-3p 導入細胞を用いた RNA シークエンスにより発現変動遺伝子を抽出し、TargetScan および GeneCodis 4 で標的候補を選定。
- ⑤ 分子生物学的検討：qRT-PCR および Western blotting により標的遺伝子の発現抑制を検証。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにて直接結合を確認。siRNA を用いたノックダウンで標的遺伝子の機能的意義を評価。
- ⑥ 免疫組織化学・統計解析：乳癌組織アレイを用い ANLN タンパク発現を評価。統計解析は JMP Pro および GraphPad Prism にて実施。

## 【結果】

### ● miR-30a-3p の臨床的意義

TCGA 解析により miR-30a-3p は乳癌組織で有意に低発現し、低発現群は 10 年生存率が有意に低下していた。

### ● 機能解析

miR-30a-3p 導入細胞では増殖・浸潤・遊走能が有意に抑制された。

### ● 標的遺伝子の同定

RNA シークエンスと *in silico* 解析から 189 遺伝子を候補として抽出。特に細胞周期関連遺伝子群が有意に富化しており、その中で ANLN, CCNB1, BIRC5, KIF23 の 4 遺伝子が高発現で予後不良因子であった。

### ● ANLN に対する直接制御

ルシフェラーゼアッセイにより miR-30a-3p が ANLN 3' UTR に直接結合することを証明。qRT-PCR および Western blotting で miR-30a-3p 導入により ANLN 発現が抑制されることを確認。siRNA による ANLN ノックダウンは細胞の増殖・浸潤・遊走を著明に抑制した。

### ● 臨床検体での検証

免疫染色にて乳癌組織で ANLN が強発現しており、多変量解析で独立した予後不良因子であることを確認。

## 【結論及び考察】

本研究により、miR-30a-3p は乳癌において腫瘍抑制的に機能することが明らかとなった。miR-30a-3p の導入によって乳癌細胞の増殖・浸潤・遊走能が顕著に抑制され、さらに RNA シークエンスとデータベース解析を組み合わせることで、miR-30a-3p が多数の癌関連遺伝子を制御していることが示された。その中でも ANLN は直接的に miR-30a-3p によって制御され、乳癌細胞の悪性形質に深く関与することが確認された。siRNA による ANLN のノックダウンは腫瘍細胞の増殖・浸潤・遊走を著明に抑制し、乳癌臨床検体における ANLN 高発現は予後不良因子であることも明らかになった。これらの結果は、ANLN が乳癌における新規治療標的として有望であることを強く示唆するものである。

さらに重要な点は、これまで「非機能的」と考えられてきた *passenger strand* miRNA（本研究では miR-30a-3p）が乳癌の分子病態において明確な腫瘍抑制的役割を持つことを実証した点である。従来の miRNA 研究は *guide strand* に焦点を当てることが多かったが、本研究の成果は *passenger strand* 解析の意義を示す新たな知見であり、乳癌における miRNA 研究の新しい方向性を提示している。

本研究の成果は、乳癌の進展機構に関する分子レベルでの理解を深めるとともに、miRNA を起点とした新たな治療戦略の可能性を切り拓くものである。特に、miR-30a-3p や ANLN を標的とした分子治療は、既存のホルモン療法や分子標的治療に抵抗性を示す症例に対して、新たな治療オプションを提供し得ると考えられる。また、miR-30a-3p の発現低下や ANLN の過剰発現はバイオマーカーとして臨床応用できる可能性があり、予後予測や個別化治療の実現にも寄与するだろう。

本研究は乳癌における腫瘍抑制性 miRNA の役割を解明するとともに、ANLN を中心とする細胞周期関連分子群を標的とした新規治療戦略の基盤を提供した。今後は、臨床検体に基づくさらなる検証や、*in vivo* モデルでの治療応用研究を通じて、乳癌治療の新たな展開へとつなげていく必要がある。