

## 論文内容の要旨

論文題目 **マイクロ RNA 複合体構成因子 DDX20 の発現低下が惹起する肝発癌経路の同定**

氏名 高田 朱弥

### 背景

マイクロRNA (miRNA) はタンパク質をコードしない小さなRNAであるが、miRNA複合体構成因子 (miRNP) と相互作用しRISCと呼ばれる複合体を形成する。RISC complexはメッセンジャーRNA (mRNA)の3'側非翻訳領域 (3'UTR) に相補的に結合し、mRNAの翻訳抑制や分解促進に働く。これまでmiRNAの発現量の異常は、癌の発生や進展にも関わるということが明らかになっている。本研究では、miRNP の発現量の変化を肝組織の癌部・非癌部で比較し、miRNP のひとつであるDDX20 タンパク質の発現がヒト肝細胞癌においてしばしば減少していることを見出した。さらに、DDX20 の発現低下に伴う miRNA の異常がどのように肝細胞癌の発生・進展につながるのかについて検討を加え、新しい発癌経路のひとつとしての可能性を示した。

### 結果

#### 1) ヒト肝細胞癌組織では DDX20 の発現量が低下している

ヒト肝組織において miRNP である DICER1, AGO2, TRBP2, DDX20, GEMIN4 の発現レベルをみるため免疫組織染色を行った。その結果、ヒト肝細胞癌組織では非癌部と比較し 10 例中 8 例において DDX20 の発現が低下していた。またウエスタンブロット法では正常肝細胞と比較し、複数のヒト肝細胞癌細胞株において DDX20 タンパク質の発現低下がみられた。またヒト肝細胞癌の針生検組織においても、背景の非癌部と比較し癌部での DDX20 の発現は低下していた。さらに tissue array を用いた肝臓組織の免疫組織染色では 70 例中 47 例で、非癌部に比較し癌部での DDX20 の発現が低下していた。これらの結果より、DDX20 の発現はヒト肝細胞癌において低下していることが多く、ヒト肝細胞癌の発癌にも関与している可能性が考えられた。

#### 2) DDX20 遺伝子領域には LOH が認められる

肝細胞癌細胞株を用いて DDX20 遺伝子が存在する染色体 1p 領域のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) について検討したところ、DDX20 タンパク質の発現低下が認められた Hep3B、Huh7 細胞において LOH を認めた。やや発現低下がみられた PLC/PRF/5 細胞においても LOH を認めたが、HepG2、SK-Hep1 細胞では LOH を認めなかった。さらにヒト肝細胞癌組織における検討でも DDX20 の LOH が報告されている。これらの結果より、肝細胞癌における DDX20 の発現低下の原因として LOH が関連している可能性が考えられる。

### 3) DDX20 の発現低下により NF-κB 活性が増強する

これまでに DDX20 が細胞内シグナル伝達に関与しているという報告がみられたため、DDX20 が細胞内シグナル伝達にどのような影響を与えるかをレポーターアッセイで検討したところ DDX20 の過剰発現により NF-κB 活性の著明な低下が認められた。そこで、DDX20 ノックダウン安定細胞株を樹立したところ、コントロール細胞に比べ NF-κB 活性が増強していた。また DDX20 ノックダウン細胞株ではコントロール細胞と比較し細胞増殖に差はみられなかったが、アポトーシスには抵抗性を示した。次に、マイクロアレイを用いて DDX20 の発現低下により影響を受ける遺伝子を網羅的に解析したところ、DDX20 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して NF-κB により転写が活性する癌関連遺伝子が増加していた。これらの結果から、DDX20 の発現低下は NF-κB の活性増強につながる可能性が示唆された。

### 4) DDX20 は NF-κB 経路の関連分子と相互作用しない

NF-κB 伝達経路関連分子のタンパク質の発現量をウエスタンブロットティング法で検討したところ、DDX20 ノックダウン細胞とコントロール細胞では NF-κB 関連タンパク質の発現量は同程度であった。さらに、免疫沈降では DDX20 と NF-κB 関連分子との間に結合を認めなかった。以上の結果から、DDX20 は NF-κB 経路関連分子に直接的な作用をしているわけではないと考えられた。

### 5) miR-140、miR-22 は NF-κB の活性を抑制する

DDX20 は AGO2 とともに RISC を構成する一因子であり、miRNA の機能に関わる事が示唆されている。そこで DDX20 の発現低下により miRNA の機能不全を生じ、その結果として NF-κB 活性の増強が生じている可能性を考えた。その検討のため NF-κB が恒常的に活性化しているレポーター細胞に肝臓で発現が多い成熟型合成 miRNA をリバーストランスフェクションすることで、NF-κB 活性に影響を与える miRNA をスクリーニングし、NF-κB を抑制する miRNA として miR-22、miR-140-5p、miR-140-3p を同定した。

### 6) DDX20 の発現低下によって miR-140 の機能が低下し NF-κB 活性が増強する

レポーター活性にて検討を行ったところ、DDX20 ノックダウン細胞では miR-140-3p の効果のみが減弱していた。しかし、DDX20 ノックダウン細胞とコントロール細胞における成熟型 miRNA の発現レベルを調べたが同等であった。このことから DDX20 は miRNA の成熟過程には影響を与えていないと考えられた。DDX20 で免疫沈降すると miR-140-3p は miR-140-5p より多く検出され、DDX20 主体の miRNP 複合体への取り込みにおいて、miR-140-3p が優先的に取り込まれ、DDX20 は miR-140-3p に特異的に作用している可能性が示唆された。このことから、DDX20 ノックダウン細胞における特定の miRNA の機能減弱は、DDX20 に関連した miRNP 複合体への miRNA の取り込みの違いによって引き起こされた可能性が考えられた。

#### 7) miR-140-3pはNF-κBのcoactivatorであるNRIP1を標的とする

miR-140-3pの標的遺伝子候補を検索したところ、NF-κBのcoactivatorである Nuclear receptor interacting protein 1 (NRIP1) が、その3'UTR にmiR-140-3pのシードシーケンスと相補的な配列を含んでいることを見出した。レポーターアッセイにてmiR-140前駆体を過剰発現させるとNRIP1-3'UTRレポーターの活性は抑制され、その効果はmiR-140の相補配列に変異を入れると減弱した。さらに、miR-140前駆体を恒常的に過剰発現した細胞では、NRIP1タンパク質の発現は低下した。これらの結果から、miR-140-3pはNRIP1を直接的なターゲットにしていることが示唆された。またDDX20ノックダウン細胞では、NRIP1のタンパク質の発現は著明に増加していた。さらに、ヒト肝組織では癌部では非癌部に比べDDX20の発現が低下している一方で、NRIP1のタンパク質の発現は増加していた。一方、NRIP1を過剰発現させるとNF-κBの活性は増強したが、DDX20ノックダウン細胞において、NRIP1をノックダウンするとNF-κBの活性は減弱したことから、DDX20の発現が低下した状態ではNRIP1の発現増加を介してNF-κBの活性増強がもたらされている可能性が示唆された。以上の結果より、正常ではmiR-140-3pによってNRIP1のタンパク質の発現は抑制されているが、DDX20の発現低下によってmiR-140-3pの機能が減弱し、標的遺伝子NRIP1の発現が増加することでNF-κB活性が増強するのではないかと考えられた。

#### 8) miR-140 ノックアウトマウス肝組織では NRIP1 発現は増加している

これまでの実験結果を *in vivo* で検証したところ、miR-140 ノックアウトマウスの肝組織においてNRIP1の発現レベルは増加していた。上記の結果から、少なくともmiR-140の標的遺伝子のひとつとしてNRIP1があることが示唆された。

#### 考察

本研究ではヒト肝細胞癌組織でmiRNA構成因子のひとつであるDDX20の発現がしばしば低下しており、その結果、通常はNF-κBを抑制しているmiRNA機能が減弱し、NF-κB活性を増強させることを示した。miRNAライブラリーを用いたスクリーニングによって、mi-22とmiR-140-5p、miR-140-3pを肝臓におけるNF-κB活性を制御するmiRNAとして同定した。その中で特にmiR-140-3pがNF-κBのcoactivatorであるNRIP1を直接標的として発現制御していることを見出し、DDX20の発現低下におけるNRIP1のノックダウンによって、増強していたNF-κBの活性が低下したことから、DDX20の発現低下はNRIP1の発現増加を介してNF-κB活性を増強させていることが考えられた。近年、様々な悪性腫瘍におけるNF-κB活性の増強が報告され、NF-κBと発癌との関わりが指摘されている。本研究ではDDX20ノックダウンによりNF-κB活性が増強し、発癌に関連する遺伝子の増加や抗アポトーシス効果を認めることから、DDX20の発現低下に伴うNF-κB活性の持続的な増強が、肝細胞癌の発生・進展につながる可能性が考えられた。本研究の結果から、肝臓におけるDDX20の発現低下によりmiR-140-3pの機能が減弱し、NF-κB活性が増強することで肝細胞癌の発生・進展に関与している可能性が示唆された。