

論文の内容の要旨

論文題目

肺がんでエピジェネティクス異常による発現抑制を受ける microRNA の検索

氏名 江本 範子

今回の研究では小分子 RNA のグループの 1 種の microRNA という約 22 塩基長の一本鎖のタンパクをコードしない RNA 分子鎖を対象とした。miRNA 鎖は、特定の遺伝子より転写された mRNA の 3'UTR とほぼ相補的に結合して mRNA からタンパクへの翻訳過程を阻害することにより特定遺伝子の翻訳抑制が行われる。よって miRNA の発現異常、機能低下により細胞の機能異常、がん化につながると考えられている。

またアプローチの方法としてはがんにおけるエピジェネティクス機構の異常を抽出することを選択した。エピジェネティクスとは、塩基配列の変化によらずに細胞分裂を経ても遺伝子発現における情報を安定的に伝達する分子機構であり、DNA のメチル化修飾やヒストンタンパク質の修飾の機構が含まれているが、がんにおいては miRNA もエピジェネティクス異常による発現制御をうけていることが指摘されている。今回は特に DNA のメチル化の異常により発現制御をうけることによって、細胞のがん化に寄与するようながん抑制的な miRNA を抽出することを目指した。

研究の初期段階では *in silico* 解析による候補 miRNA の絞り込みを行った上で、細胞株による *in vitro* 実験を施行し、肺がん細胞株のエピジェネティクス異常と個々の miRNA の関連性を検討し、がん抑制的に働く候補 miRNA を抽出した。さらにその結果を踏まえて候補 miRNA について臨床検体での検討を加え、実際の症例において機能していると考えられる miRNA を最終的に選んだ。さらにその機能について *in vitro* 実験による検討を加えて、肺がんについての分子生物学的知見を深めることを研究の目的とした。

まず各 miRNA のゲノム上の位置と CpG アイランドとの配列の位置関係について 3 条件を設定した。まず CpG アイランド内の miRNA、次に CpG アイランドの 1 kbp 以内の下流に存在する miRNA、そして miRNA の位置する遺伝子上のプロモーターが CpG アイランド内にある miRNA である。解析可能な 678 種の miRNA から上記の条件による *in silico* 解析によって 55 種を絞り込んだ。

これらの候補 miRNA を次に *in vitro* で解析した。肺がん細胞株の H1755、H2347、H1650、H1975、Calu-1、A549、H441、LC1Sq を使用し 5-aza-CDR を用いて細胞の脱メチル化処理を行い、処理前後の miRNA の発現プロファイルの変化を候補 miRNA 間で比較した。処理前は正常肺組織と比較して発現が 25 % 以下であること、および脱メチル化処理により発現が 4 倍に回復することを条件として絞り込み、14 種の候補 miRNA を選んだ。

次に、臨床検体におけるこれらの 14 候補 miRNA の発現を比較した。使用した検体は肺腺がん 10 症例および扁平上皮がん 5 症例の計 15 症例で、これらの臨床症例をがん部分および非がん部分の各々の組織より RNA を抽出し、miRNA の発現を比較したところ、7 候補 (miR-126, miR-34b, miR-203, miR-30e, miR-449a, miR-486, miR-139) について腺がん症例で共通してがん部の組織で発現が減少していることを発見した。

このうち、CpG アイランド内に配列がある miR-203 について解析を継続した。

発現減少がみられた A549 細胞および H441 細胞でバイサルファイトシークエンスを施行し、*mir-203* の直上 CpG サイトのメチル化を検出した。次に細胞の 5-aza-CDR による脱メチル化処理を行い miRNA の発現量の変化を調べたところ、処理前後で H441 細胞では約 5 倍に、A549 細胞では約 20 倍以上に miR-203 の発現が回復していることから、2 種の肺腺がん細胞株において miR-203 がエピジェネティック異常により発現抑制を受けていることを示した。

次に臨床検体での miR-203 の発現量について調べたところ、腺がん 20 症例では 16 例 (80 %) で miR-203 の発現減少がみられることがわかった。

次に腺がん症例 78 例、扁平上皮がん症例 17 例、腺扁平上皮がん症例 1 例の計 96 症例の臨床検体を用いて COBRA 法によるメチル化解析を施行した。COBRA のメチル化がみられた症例は全体で 71 例 (74 %)、組織別にみても腺がん症例で 57 例 (73%)、扁平上皮がん症例で 13 例 (76 %) と高率であった。しかしながらメチル化の有無と手術検体の病理組織像および性別、病期、喫煙の有無、EGFR 変異の有無、再発の有無などの臨床情報についての相関は得られなかった。

次に miR-203 の強制発現ベクターを作成した。これを細胞へ遺伝子導入し、miR-203 を強制発現させた H441 細胞の細胞遊走能の変化について wound healing assay の手法で調べた。実験開始 20 時間後の細胞の移動距離は、コントロール細胞の 42.2 μm に対して、miR-203 発現細胞では 0.8 μm であり、miR-203 の強制発現細胞において遊走能が有意に低下していることを発見した。

今回、*in silico* 解析、細胞株および臨床検体の解析を経て当初に対象とした miRNA 全体の約 1 % の 7 種にまで絞り込むことが可能であった。そのうち、CpG アイランド上の miR-34b の属する miR-34 ファミリーおよび miR-126 がそれぞれすでに肺がんにおける腫瘍抑制的な関連性が指摘されていることから、今回の絞り込み検索では客観的に有意な結果が得られたと考えた。

現在まで miR-203 は多種のがんで腫瘍抑制的な効果があることが報告されてきたが、肺がんとの直接的なかわりについては報告がなかった。我々は、腺がん症例の臨床検体を用いて miR-203 が臨床例において高頻度に発現が減少していることをリアルタイム PCR により定量的に解析した。また、我々は肺がん細胞株 (H441、A549) で初めて、*mir-203* 配列近傍の CpG アイランドが DNA メチル化を受けており、miR-203 がエピジェネティクス異常で発現抑制を受けていることを指摘した。

また、肺がん臨床症例について COBRA を用いたメチル化解析および miRNA の発現解析を行い、

mir-203 配列直上の CpG サイトは臨床検体においても異常なメチル化が存在することを 96 症例の解析において約 70 %以上の高率で検出した。このようなメチル化の異常は I A 期の早期がん症例においても広汎にみられていた。

さらに miR-203 の強制発現ベクターを作成し、遺伝子導入して細胞の機能解析を行った。その結果 H441 細胞での miR-203 の発現上昇により、細胞の遊走能が低下するという機能変化を発見し、miR-203 が、がん細胞の浸潤性と関連していることを示した。

以上、肺腺がん臨床検体での共通した miR-203 の発現低下、肺がん臨床検体での高頻度な *mir-203* 直上 CpG サイトのメチル化が明らかになったが、臨床例での解析では病理組織像などとの明らかな相関はなく、癌細胞の形質にどの程度関与しているかは明らかではないが、*in vitro* で肺腺がん細胞での DNA メチル化による発現抑制の機構と *mir-203* 発現上昇による細胞遊走能の変化を示すことができた。

今回の肺がんにおける miRNA の解析により、新たに肺がんに関する分子生物学的知見を得ることができた。このような知見の積み重ねにより、個別医療に対応した臨床情報が将来利用可能になるであろうと考えられた。