

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト非小細胞肺癌において異常な DNA メチル化による発現抑制を受けるマイクロ RNA の
同定と機能解析

氏名 渡邊 広祐

1 背景

マイクロ RNA (miRNA) はゲノムにコードされる 22 塩基前後の small non-coding RNA で、標的遺伝子の 3'側非翻訳領域に結合しその発現を抑制する。ヒト癌において miRNA の発現は変化しており、癌において発現が増加し癌抑制遺伝子を標的とする miRNA は癌遺伝子として機能しうるし、逆に癌において発現が低下し癌遺伝子を標的とする miRNA は癌抑制遺伝子として機能しうる。癌における miRNA の発現異常の機序として遺伝子増幅や欠失が知られているが、異常な DNA メチル化による発現抑制を受ける miRNA についての報告が近年散見されるようになった。本研究の目的は非小細胞肺癌において異常な DNA メチル化により発現抑制を受ける miRNA を同定し、その機能を解析することである。

2 方法と結果

研究開始時に Applied Biosystems 社の Taqman probe を用いた miRNA の定量 PCR の系が利用可能な miRNA は 687 種あった。このうち DNA メチル化による発現抑制を受ける miRNA の候補として *in silico* で 55 種を選択した。選択の基準は、1) CpG アイランド上にある miRNA、2) CpG アイランドの下流 1 kbp 以内にある miRNA、3) 遺伝子のイントロン内に位置しその host gene の 5'側に CpG アイランドが存在する miRNA、のいずれかを満たすものとした。続いて非小細胞肺癌細胞株 6 種 (H1755 と H2347 は EGFR 遺伝子変異陰性腺癌、H1650 と H1975 は EGFR 遺伝子変異陽性腺癌、LC1sq と Calu-1 は扁平上皮癌) の脱メチル化剤処理を行い、処理前後での 55miRNA の発現量を定量した。14 種の miRNA (mir-375, mir-196b, mir-126, mir-34b, mir-127, mir-203, mir-148a, mir-181c, mir-30e, mir-449a, mir-340, mir-486, mir-483, mir-139) が、正常肺組織と比較して発現低下し、かつ脱メチル化剤処理により誘導された。次にこの 14miRNA の発現量を 15 例の原発性肺癌手術検体 (EGFR 遺伝子変異陰性腺癌 5 例、EGFR 遺伝子変異陽性腺癌 5 例、扁平上皮癌 5 例) を用いて定量した。7 種の miRNA (mir-126, mir-34b, mir-203, mir-30e, mir-449a, mir-486, mir-139) が高頻度に発現低下していた。このうち mir-34b, mir-203 は CpG アイランド上に位置し、mir-30e, mir-449a, mir-486, mir-139 は CpG アイランドを有する host gene のイントロン内に位置する。mir-126 は CpG アイランド上に位置すると同時に、host gene EGFL7 も CpG アイランドを有する。

CpG アイランド上に位置する mir-34b について *HpaII* PCR 法と bisulfite sequencing 法を用いて肺癌細胞株の DNA メチル化を検討したところ、発現が最も低下していた H2347 と LC1sq において完全にメチル化されていた。これらの細胞株を脱メチル化剤処理すると mir-34b の発現は誘導された。したがって mir-34b は DNA メチル化による発現制御を受けると考えられた。mir-203 についても DNA メチル化を検討したが、今回用いた細胞株ではわずかな DNA メチル化しか認められなかった。

mir-126 は EGFL7 のイントロン内に位置し、その発現量は EGFL7 の発現量と強く相関していた。

mir-126 と EGFL7 の発現量は H1975 と Calu-1 において最も低下しており、この 2 細胞株では脱メチル化剤処理により mir-126 と EGFL7 が共に誘導された。EGFL7 の 5'側に位置する CpG アイランドの DNA メチル化を bisulfite sequencing 法により検討すると、H1975 と Calu-1 において高度な DNA メチル化が認められた。また COBRA (combined bisulfite restriction analysis)法を用いて検討したところ、mir-126 の発現量は EGFL7 の CpG アイランドの DNA メチル化とは相関していたが、mir-126 の配列を含む CpG アイランドの DNA メチル化とは関連が無かった。したがって mir-126 は host gene EGFL7 の DNA メチル化による発現制御を受けると考えられた。イントロン内に位置する他の miRNA (mir-30e, mir-449a, mir-486, mir-139) と各々の host gene についても発現量の相関を検討したところ、mir-449a と mir-139 が host gene の発現と有意な相関を認めた。しかし今回用いた細胞株ではこれらの miRNA の host gene の CpG アイランドに有意なメチル化は認めなかった。

mir-34b と mir-126 のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降により解析した。NHBE (normal human bronchial epithelial cells) では mir-34b の 5'側に転写開始点の指標である Histone H3 Lysine 4 のトリメチル化(H3K4me3)のピークが認められた。一方 CpG アイランドが完全にメチル化されている LC1sq ではこのピークは認めず、脱メチル化剤処理によりピークが誘導された。mir-126 については、host gene がメチル化されていない NHBE と LC1sq では EGFL7 の 5'側に H3K4me3 のピークを認めたが、メチル化されている H1975 と Calu-1 ではピークを認めず、これらの細胞株を脱メチル化剤処理するとピークが誘導された。EGFL7 における H3K4me3 のピークの位置は H1975 と Calu-1 において DNA メチル化が認められた領域と一致しており、転写開始点近傍の DNA メチル化が mir-126 と EGFL7 の発現を制御していることが確認された。さらに肺癌細胞株では mir-34b と mir-126 はともに転写抑制のマーカーである Histone H3 Lysine 9 のメチル化(H3K9me2, H3K9me3)が認められた。mir-126 ではこれに加えて Histone H3 Lysine 27 のメチル化(H3K27me3)も認められた。

続いて mir-34b と mir-126 の標的遺伝子について解析を行うために、プラスミドベクターを用いて miRNA の強制発現を行った。単一の miRNA は多数の標的遺伝子を制御することが知られているが、実際に標的遺伝子予測アルゴリズム Target Scan によると mir-34b, mir-126 の標的遺伝子の候補数はそれぞれ 469, 17 であった。これらの候補のうち c-Met, Crk 遺伝子は肺癌における癌遺伝子としての機能が報告されているため、さらに解析を進めることとした。肺癌細胞株 A549 に mir-34b を強制発現させると c-Met 遺伝子の発現が低下した。また HEK293t 細胞に mir-126 を強制発現させると Crk 遺伝子の発現が低下した。

最後に原発性肺癌手術検体 99 例を用いて mir-34b と mir-126 のメチル化を検討した。mir-34b のメチル化は MSP (methylation specific PCR)法を、mir-126 のメチル化は COBRA 法を用いて検討した。96 例で PCR が可能であり、mir-34b と mir-126 はそれぞれ 40 例 (41%)、7 例 (7%) でメチル化を認めた。miRNA のメチル化と標的遺伝子の発現との関連を検討するために c-Met の免疫染色を行ったが、mir-34b のメチル化と c-Met の発現量との間に有意な関連を認めなかった。一方、mir-34b メチル化陽性 ($p = 0.007$)と c-Met 高発現 ($p = 0.005$)は共に病理組織学的なリンパ管浸潤陽性と相関しており、mir-34b のメチル化は癌浸潤能のマーカーとなることが明らかとなった。

3 考察

mir-34 family は、第 1 染色体に位置する mir-34a と第 11 染色体に位置し共通の転写産物に由来する mir-34b, mir-34c とから成り立つ。mir-34 family は p53 により直接の転写活性化を受ける癌抑制 miRNA であり、mir-34b, mir-34c は肺で特に高発現であることが知られている。今回の研究で、この miRNA が

非小細胞肺癌において高頻度に DNA メチル化による不活化を受けることが明らかとなった。また手術検体において mir-34b のメチル化は c-Met の発現量とは相関がないものの、リンパ管浸潤と強く相関していた。mir-34b のメチル化と浸潤能の関連性は c-Met 発現量では説明できないが、これは *in vivo* における miRNA、標的遺伝子、癌の形質の関係が複雑であることを示唆している。

mir-126 は手術検体において高頻度に発現低下していたが、DNA メチル化の頻度が 7 % と低かった。H3K27me3 は DNA メチル化とは独立して発現抑制をもたらすことが知られており、肺癌細胞株のクロマチン免疫沈降では H3K27me3 が認められた。したがって DNA メチル化がないものの H3K27me3 により発現抑制されている症例が含まれている可能性が考えられた。

4 結語

ゲノム構造に着目したスクリーニングにより mir-34b と mir-126 が DNA メチル化による発現制御を受けることを明らかにした。この方法は他の癌種や今後新たに発見される miRNA にも適応可能である。