

論文の内容の要旨

論文題目 肺腺癌の浸潤過程に關与する microRNA の研究

氏名 森田 茂樹

肺癌は日本人の癌死因の1位であり、中でも腺癌は最も多い組織型で近年増加している。腺癌では腫瘍内に筋線維芽細胞を伴った癒痕の周辺で、非浸潤癌から浸潤癌への進展起こると考えられてきた。一方、microRNA は近年盛んに研究され、癌の発生や癌細胞の増殖、浸潤に果たす役割が徐々に明らかになりつつあり、肺癌でも多数の報告が認められる。本研究では肺腺癌の浸潤過程で寄与する microRNA を明らかにする目的で、2方向からアプローチを行った。1つ目は非浸潤部と浸潤部での癌細胞における microRNA 発現の比較、2つ目は浸潤部の間質に認められる筋線維芽細胞での microRNA の発現に対する検討である。

肺腺癌(上皮)の研究では細胞株を用いた機能解析が中心で、組織切片を用いた研究も散見されるが主に非腫瘍部と腫瘍部との対比で研究がされており、非浸潤部と浸潤部での対比研究は少ない。そこで、本研究ではレーザーマイクロダイセクションおよび *in situ* hybridization (ISH) を用いて非浸潤部と浸潤部を比較し、浸潤過程に關与する microRNA を同定、解析し、肺癌細胞株を用いてその microRNA の機能の検討も行った。

まず、肺癌臨床検体の凍結保存検体の非浸潤部及び浸潤部よりレーザーマイクロダイセクションを使用して検体を分取、RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。microRNA マイクロアレイには Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異群及び EGFR 野生型群の非浸潤部、浸潤部より抽出した RNA を用い、非浸潤部、浸潤部での変動からクラスター解析により約 1700 個の候補の中から 143 個の microRNA が抽出された。さらに非浸潤部と浸潤部での変動の大きさや文献による情報を元に各クラスターから 1~3 個ずつ、計 8 個の microRNA を選び、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed, paraffin-Embedded, FFPE) 検体の非浸潤部及び浸潤部より分取した RNA を用いて、10 症例に対して定量的 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。凍結検体からの RT-PCR、FFPE 検体からの RT-PCR 及びマイクロアレイの非浸潤部及び浸潤部の変動が

一致した miR-146a, miR-107, miR-141, miR-200c が候補として残った。後半の 3 つは miR-107 - DICER-1 - miR-200family (miR-141, 200c を含む) の経路が既報に認められたため、miR-146a と上流にあると考えられた miR-107 の 2 つの microRNA を中心に解析を行うことに決定した。miR-146a, miR-107 について各々、FFPE から分取した定量的 RT-PCR 50 例 による検討、ISH を用いた microRNA の発現検討、標的遺伝子の検討、肺癌細胞株を用いた microRNA の機能について検討を行った。

定量的 RT-PCR 及び ISH にて非浸潤部に比して浸潤部で miR-146a の発現亢進が認められた。さらに、臨床検体を用いた予後解析では miR-146a が浸潤部で過剰発現している症例は無病生存期間の短縮が認められ、miR-146a が肺腺癌の浸潤過程に関与していることが示唆された。次に、標的遺伝子予想プログラムである target scan 及び文献から miR-146a の標的遺伝子候補として、antiproliferative gene である BTG2 (B cell transcription family, member 2) を見出し、検証を行った。BTG2 は免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) で非浸潤部に比して浸潤部で染色性の低下が認められ、BTG2 の IHC での染色強度と miR-146a の ISH でのシグナル強度に逆相関が見られることや肺癌細胞株での miR-146a 前駆体導入で BTG2 の発現が mRNA レベルで低下することなどから BTG2 は miR-146a の標的遺伝子であることが示唆された。尚、BTG2 が IHC で陰性 (0) の症例は予後不良であった (無病生存期間及び全生存期間)。肺癌細胞株を用いた検討では、miR-146a 前駆体導入による形態変化や wound healing 実験における移動能亢進、TGF- β 添加による EMT 誘導に伴った miR-146a の発現亢進が認められ、miR-146 の発現亢進が上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) に関与すると考えられた。以上の結果からは miR-146a は BTG2 を介して EMT を誘導し、肺腺癌の浸潤過程に関与していることが示唆され、miR-146a は予後因子としての利用も期待される。

ISH では非浸潤部に比して浸潤部での miR-107 の発現亢進が認められた。さらに予後解析では miR-107 の RT-PCR, ISH において浸潤部での miR-107 過剰発現が予後増悪因子であることが認められ、miR-107 が肺腺癌の浸潤過程に関与していることが示唆された。乳癌での検討で miR-107 の前駆体誘導により、microRNA のプロセッシングにかかわる蛋白である DICER-1, 200family を介し上皮間葉転換 (EMT) が引き起こされることが報告されており、本研究でも miR-107 の標的遺伝子候補として DICER-1 及びその下流に miR-200 family を介した EMT の流れを想定して検証を行った。DICER-1 は IHC で非浸

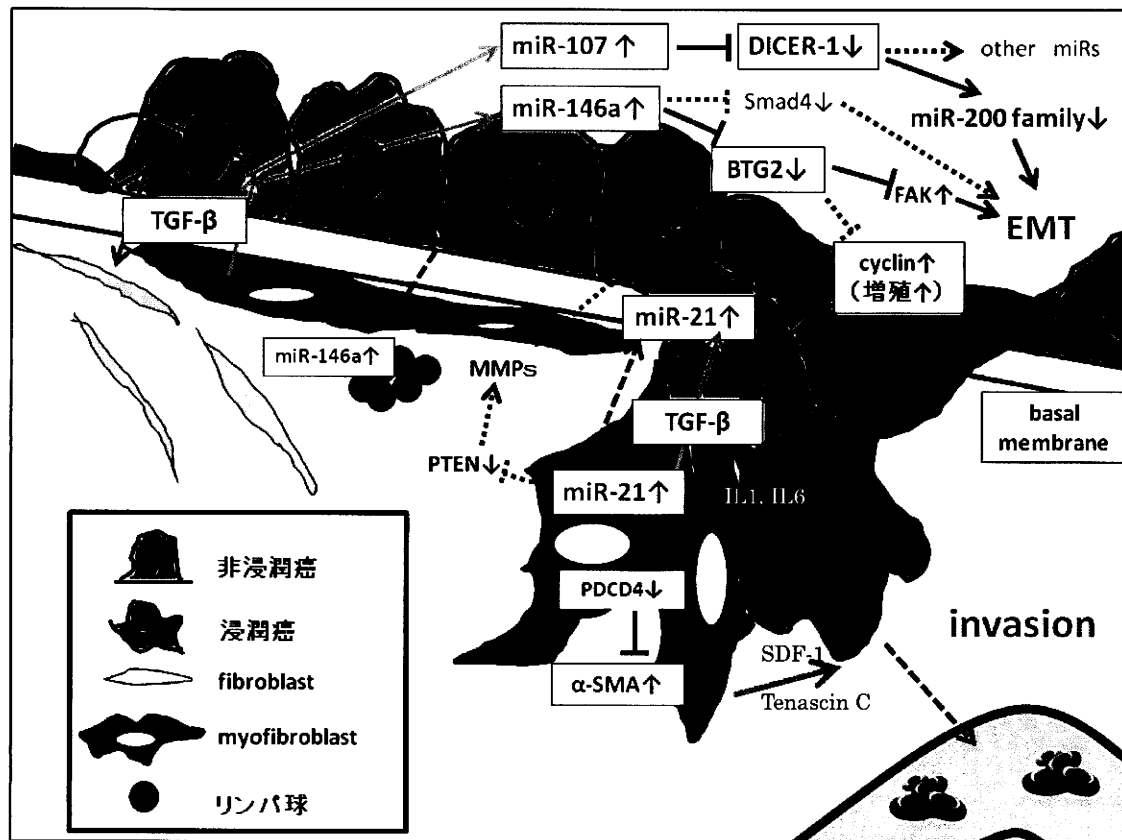
潤部に比して浸潤部での染色性の低下が認められ、非浸潤部に比し、浸潤部でmiR-107高発現 (ISH)、DICER-1低発現 (IHC)であることや細胞株を用いたTGF- β によるEMT誘導を行い、miR-107の発現亢進と蛋白レベルでのDICER-1の低下が認められたことなどから、肺腺癌においてもDICER-1がmiR-107の標的遺伝子であることが示唆された。尚、IHCでDICER-1が浸潤部に陰性の症例では無病生存期間の短縮が認められた。以上のようにmiR-107も浸潤癌への進展に関与すると考えられ、miR-146aと同様に予後因子もしくは治療への応用の可能性が考えられる。

腫瘍関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast, CAF)におけるmiR-21の過剰発現についてはいくつかの報告が認められるが、肺腺癌の臨床検体に対してISHを用いてmiR-21を詳細に検討した報告はない。今回、我々の研究ではISHで肺腺癌に接する筋線維芽細胞に同様のmiR-21の過剰発現が認められ、浸潤部における間質でのmiR-21 ISHのシグナル強度が強い(3+)場合、有意に全生存期間の短縮が認められた。また、胎児由来の筋線維芽細胞株にmiR-21の前駆誘導体を導入すると伸びだすような形態の変化が認められた。非浸潤癌から浸潤癌への進展においては中心部の瘢痕との関与が注目されており、上皮だけでなく、間質での変化を見ることは重要と考えられ、今後の課題である。

本研究の前半ではマイクロダイセクションやISHといった手法を用いて、肺腺癌を非浸潤部と浸潤部に分けてとらえることで、肺腺癌の浸潤過程に深く関与すると考えられるmicroRNAを検討した。非浸潤部に比して浸潤部で過剰発現しているmicroRNAとしてはmiR-146、miR-107が認められ、これらのmicroRNAが肺癌の予後に関連することを示した。また、miR-146aの標的遺伝子としてBTG2を見出し、miR-107の標的遺伝子としてはDICER-1に対して検討した。いずれもEMTの誘導を介して肺腺癌の浸潤過程に関わることが示唆され、予後マーカーや治療への応用が期待される。肺腺癌のmicroRNAに関して正常部と腫瘍の対比ではなく、腫瘍内での非浸潤部と浸潤部という形の検討は前例がなく、非浸潤癌から浸潤癌への進展過程に関与するmicroRNAの一部を明らかにしたという点で本研究の意義は大きいと考えられる。

本研究の後半では、腫瘍間質においてISHを用いてmiR-21が肺癌細胞に接する筋線維芽細胞に過剰発現していること及び予後との関係性を示し、浸潤への関与を示唆した。図1に本研究及び既報を

含めたまとめを示す。浸潤癌への進展過程で癌細胞内部での microRNA の変化だけでなく周囲の癌微小環境との変化にも microRNA は関わっていると考えられ、TGF- β などのサイトカインを介した情報伝達の一部、あるいはエクソソームなどによって分泌されることで直接細胞同士でやり取りされている可能性などが考えられる。既に血漿中の microRNA をバイオマーカーとして利用する研究や治療への研究も報告されており、本研究見られた miR-21 のように腫瘍間質で機能する microRNA を解析していくことは、癌の診断や治療法への応用できる可能性がある。



- 癌細胞からの分泌
- 線維芽細胞から分泌
- ←--→ エクソソームを介した輸送の可能性

図1 本研究のまとめ

実線は本研究で一部検討した経路。破線は文献から知られている経路。TGF β , Transforming growth factor β ; FAK, Focal adhesion kinase; MMP, Matrix metalloproteinase; PTEN, Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10; BTG2, B-cell translocation gene family, member 2; EMT, Epithelial-mesenchymal transition; PDCD4, Programmed Cell Death 4, SMA, Smooth muscle actin; IL, Interleukin, SDF-1, Stromal cell-derived factor 1.