

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト非小細胞肺癌においてヒストンメチル化修飾により発現抑制をうけるマイクロ RNA の機能解析および臨床病理学的検討

氏名 天野 陽介

1 背景

microRNA (miRNA) はゲノム上にコードされる 22 塩基前後の翻訳されない non-coding RNA で、標的遺伝子の mRNA の 3'側非翻訳領域 (3' UTR) に結合することで、mRNA の分解促進、翻訳抑制を通じて遺伝子の発現を抑制するものである。miRNA は発生・分化、細胞増殖、細胞死、代謝などの基本的な生命現象に関わっている一方で、miRNA の発現異常と癌との関連が報告されている。すなわち腫瘍抑制遺伝子を標的とする miRNA の発現亢進、癌遺伝子を標的とする miRNA の発現低下によって癌化を来す。

一方、遺伝子の発現量の変化を来す要因の一つとして、DNA の CpG 配列のシトシンメチル化 (とりわけ CpG 配列を固まって認める CpG アイランドにおいて) やヒストン修飾といった塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が報告されている。そこで、本研究ではエピジェネティックな変化による miRNA の発現変化が肺癌に与える影響を検討する。

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。このうちエピジェネティックな変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。これらのうち、非小細胞肺癌細胞株を DNA 脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) 処理し、処理前後での miRNA の発現量を定量したところ、14 の miRNA で正常肺組織と比較して 25%未満に発現低下しており、かつ脱メチル化処理により 4 倍以上発現が誘導された。さらにその中で原発性肺癌手術検体 15 例のうち高頻度に発現低下していた 7 の miRNA のうち、今回 *miR-139* に注目した。

miR-139 は PDE2A 遺伝子のイントロンに存在する miRNA であり、PDE2A と発現量の相関が見られた ($r=0.69$, $p=0.008$)。PDE2A 遺伝子のプロモーター領域に CpG アイランドを認め、同領域に対して DNA のシトシンメチル化を検出する bisulfite sequencing とヒストン修飾を検出するクロマチン免疫沈降 (ChIP) を施行した。その結果、同領域に転写抑制を来す DNA のシトシンメチル化を認めなかったが、転写活性化を来す H3K4me3 (ヒストン H3 の Lys4 のトリメチル化) が正常ヒト気道上皮細胞株 (NHBE) では PDE2A 転写開始点近傍にピークを形成するのに対して肺癌細胞株では抑制されていた。

当院の肺癌手術検体 75 例から RNA を抽出して *miR-139* の発現量と臨床病理学的特徴との関連を検討した。*miR-139* 低発現群は高発現群と比較して無再発生存や全生存期間において有意差を認めなかったが、有意に遠隔リンパ節転移 (N2) ($p=0.038$) と脈管浸潤 (ly+v+) ($p=0.029$) を認め、これらは多変量解析でも *miR-139* の発現量が独立した規定因子であった (それぞれ $p=0.035$, $p=0.021$)。一方で miRNA の発現量は腫瘍サイズ (T 因子) や EGFR 遺伝子変異とは関連を認めなかった。

肺癌細胞株における *miR-139* の機能解析を行うために *miR-139* 発現プラスミドベクターを作成した。肺癌細胞株 A549 にリポフェクションし、hygromycin による薬剤選択を行うと、*miR-139* 強制発現株では scramble ベクター、空ベクター導入株と比較して MTT アッセイ変法による解析で増殖能の抑制を認めた ($p<0.01$)。TargetScan を用いて 3' UTR の配列から推測した *miR-139* の標的遺伝子 248 のうち、癌との関連が報告されている遺伝子を 10 認めたが、それらは *miR-139* 強制発現株では mRNA レベルで平均して約 30% 発現抑制を認めた ($p<0.01$)。

3 考察

miR-139 と癌との関係について、近年肝細胞癌や HER2 の発現が亢進した胃癌で *miR-139* の発現低下が転移・浸潤に関わるとする報告が見られる。本論文では肺癌手術検体において *miR-139* の発現低下が脈管浸潤や遠隔リンパ節転移との関連を認め、肺癌細胞株において *miR-139* の強制発現により増殖能の抑制を来たした。これは肺癌において *miR-139* の腫瘍抑制能を *in vitro* および臨床検体で示した初めての報告である。*miR-139* は癌との関係が報告されている複数の遺伝子を制御していることが明らかとなり、これらのうちひとつないし複数の遺伝子が形質に影響を与えたと考えられた。今回生命予後には有意差を見いだせなかったが、症例数を増やすことで明らかになる可能性があるとともに、転移・浸潤能との相関を認めたことから進行肺癌における検討も重要になると考えられる。

miR-139 は PDE2A 遺伝子のイントロンに存在する intronic miRNA で、発現量が PDE2A の発現量と相関していた。今回、PDE2A の転写開始点近傍の CpG アイランドに DNA メチル化は認めなかったが、肺癌細胞株において転写活性型のヒストン修飾が抑制されており、PDE2A と *miR-139* の発現が制御されていると考えられた。

4 結語

今回肺癌においてヒストン修飾による発現制御を受ける miRNA として *miR-139* を同定し、肺癌の進展に関与することを *in vitro* および臨床病理学的検討により明らかにした。miRNA およびそのエピジェネティックな制御が癌の進展に重要であると考えられた。