

博士論文

肺腺がんにおける miR-26a 機能解析

関本 登

目次

1. 序論

- 1.1 肺腺がん
- 1.2 microRNA
- 1.3 次世代シーケンサー
- 1.4 本研究の目的、考え方、概要

2. 研究手法

- 2.1 細胞株
- 2.2 次世代シーケンサーによる RNA 発現解析および small RNA 発現解析
- 2.3 遺伝子発現ベクターおよび RNA オリゴヌクレオチド
- 2.4 細胞へのトランスフェクション
- 2.5 細胞からのタンパク質抽出および濃度調整
- 2.6 SDS-PAGE、ウェスタンブロット
- 2.7 リアルタイム PCR
- 2.8 Cell migration assay および Cell invasion assay
- 2.9 細胞増殖アッセイ

2.10 プラスミドの増幅

2.11 ルシフェラーゼアッセイ

3. 結果

3.1 26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株における miRNA と mRNA の発現解析

3.2 26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株における miR-26a 発現量と HMGA1 発現量の負の相関

3.3 H1299 細胞において miR-26a は mRNA の分解を伴って HMGA1 の発現を制御する

3.4 H1299 細胞における、miR-26a の細胞の転移能、浸潤能、増殖能に対する影響

3.5 H1299 細胞における、HMGA1 タンパク質の細胞の転移能、浸潤能、増殖能に対する影響

4. 考察

4.1 本実験の総括

4.2 miR-26a の HMGA1 以外の標的に対する考察

4.3 本実験で得られた結果と過去の研究結果の比較と考察

4.4 今後の肺腺がん治療における miR-26a の可能性

4.5 本研究に用いた解析手法に関する考察

5. 謝辞

6. 参考文献

7. 図表

1. 序論

1.1 肺腺がん

がんによる死亡は、2014年時点で日本人の死因の約3割を占めて1位であり、さらに年々増加傾向にある。がん死亡を部位別に見ると、肺がんは男性では第1位であり、女性においても大腸がんに次いで第2位である（厚生労働省人口動態統計より）。このため、肺がんの治療成績を上げることは喫緊の課題といえる。肺がんは、病理組織学的に非小細胞肺がんと小細胞肺がんに分けることができる。非小細胞肺がんは、肺がんの約85%を占め[1]、さらに細かく腺がん、大細胞がん、扁平上皮がんの3種類に分類することができる。肺腺がんは肺がんの中で最も数が多く、肺がんの約40%を占めている[2]。肺腺がんは、他の種類の肺がんと比べ、細胞増殖速度が遅い。しかし、早期に転移しやすいがんであり[3]、脳や副腎髄質、骨などに転移することがわかっている[4]。

肺がんの治療において、初期の段階では手術による治療が一般的だが、術後に放射線治療あるいは抗がん剤を投与することにより、再発等を減らすことができることが知られている。一方、腫瘍の浸潤や他の臓器への転移が見られた場合は、抗がん剤による治療が中心となる。従来の抗がん剤は細胞増殖に関わる遺伝子を標的にするものが多く、分裂スピードの速い正常細胞にも作用するため、副作用が大きかった。しかし、近年用いられ始めた分子標的薬は、がん細胞に特異的な特定の遺伝子変異を標的とするため、選択性が強く、少ない副作用で高い腫瘍縮小効果が得られる場合が多い。

一般にがんの遺伝子変異は、多様であり、必ずしも既存の分子標的薬の標的となる遺伝子に変異を持つわけでもないため、やみくもに分子標的薬を使

わず、まず遺伝子検査を行い、変異がどの遺伝子に起きているかを見極めた上で、どの分子標的薬を治療に用いるかを決定することが望ましい[5, 6]。遺伝子検査を通じ、患者それぞれに最適な治療法を提供する。このような医療を個別化医療という。

肺腺がんにおいて高い頻度で見出される異常に、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) の過剰発現と遺伝子変異がある。EGFR は膜貫通型受容体タンパク質であり、受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する。細胞外ドメインにリガンドが結合すると、別の EGFR と二量体を形成し、細胞内ドメインのチロシンキナーゼのチロシン残基がリン酸化され、活性化される。EGFR が活性化されると、その下流で細胞の増殖・進展をうながすシグナル伝達経路が活性化される。日本人の肺がん患者では 50% の頻度で EGFR 活性化変異が認められている[7]。これらの症例では、EGFR の変異がドライバーミューテーションとなり、がんが発生したと考えられている。

EGFR を標的とした分子標的薬として、ゲフィチニブ、エルロチニブ等が開発されている。これらの薬剤は EGFR と ATP の結合を競合的に阻害することでリン酸化を阻害し、EGFR の下流のシグナル経路の活性化を妨げる。面白いことに、この経路を阻害すると細胞の増殖が止まるだけでなく、細胞死が誘導される。このような状態をがん遺伝子依存 (oncogene addiction) と言い、チロシンキナーゼの変異による活性化は、こうしたがん遺伝子依存を起こしやすい。そのため、EGFR 阻害剤は EGFR 遺伝子変異を持つがん患者に対して非常に有効である[8]。

2007 年に、肺腺がんの細胞中で EML4-ALK 融合遺伝子が発現していることが明らかとなった。EML4 は echinoderm microtubule associated

protein like 4 の略であり、ALK は anaplastic lymphoma kinase の略である。EML4-ALK 融合遺伝子は非常に強いチロシンキナーゼであり、有力な薬剤標的となりえることが報告された[9]。この融合遺伝子は、第 2 染色体上で ALK 遺伝子と EML4 遺伝子が逆位を起こした結果できたと考えられている。

ALK 遺伝子と EML4 遺伝子が融合すると、チロシンキナーゼである ALK が恒常的に活性化される。EML4-ALK 融合遺伝子を標的として、クリゾチニブという ALK 阻害薬が開発され[10]、アメリカでは 2011 年に承認され、日本でも 2012 年に承認された。ALK 陽性の非小細胞肺癌患者にクリゾチニブを投与した結果、ほとんどの症例で腫瘍縮小効果が見られた[11]。

肺腺がん治療において、上述したように分子標的薬が開発され、治療効果も見られているが、まだ多くの課題が残されている。EGFR を標的としたゲフィチニブやエルロチニブは、当初効き目があった患者でも、投与を続けている間に抵抗性となってしまいう例が多い。その約半数は、治療過程で生じた EGFR 遺伝子の第 20 エキソンの T790M 点突然変異(トレオニンからメチオニンへの置換)が原因であると考えられている[12, 13]。

また、クリゾチニブは非常に強力な ALK 阻害薬であるが、EML4-ALK 融合遺伝子の発現が見られる非小細胞肺癌患者は患者全体の約 4%しかおらず[9]、多くの肺癌患者にとっては有効な薬剤ではない。

肺腺がんの治療成績を上げるためには、新規の分子標的を見つけるなど、新しいがんの治療法の開発が必須である。新しい分子標的薬を開発することによって、今までは選択肢が限られていたために有効な抗がん剤が見つからなかった患者にも、効果的な治療法を提案できるようになると考えられる。そのためには、肺腺がんにおける増殖・浸潤・転移に関わる遺伝子の発現制

御ネットワークについての深い理解が必要となってくるが、未だに、未知の部分が多い[14]。

1.2 microRNA

microRNA(miRNA)は、21-25 塩基からなる non-coding small RNA で、標的となる mRNA の 3' UTR と結合することによって、標的 mRNA の分解、もしくはタンパク質への翻訳の抑制を行う機能性 RNA である[15]。miRNA をコードする領域は、タンパク質をコードしない遺伝子間領域や遺伝子のイントロン部分に存在すると考えられている。

そこから読まれる第一次転写産物である pri-miRNA(primary miRNA)は 21-25 塩基よりはるかに全長が長く、ヘアピン構造を内部に持つ。pri-miRNA は核内で Drosha と呼ばれる酵素によって切り出され[16]、pre-miRNA(precuror miRNA)にプロセシングされる。その後、Exportin-5 によって細胞質へと輸送され[17]、さらに Dicer によって切断されることによって mature-miRNA が作られる[18]。mature-miRNA は RNA-induced silencing complex (RISC)へと取り込まれ、取り込んだ miRNA をガイドとして、標的 mRNA の分解を促進する、もしくはその翻訳を抑制する。

miRNA は配列の相補性を介して標的 mRNA に対して働くために、1 種類の mRNA だけでなく、複数の mRNA に対して影響を及ぼすことが多い。そのため、様々な組織や細胞において、多数のタンパク質をコードする mRNA に影響を与えていると考えられる。

現在ヒトでは、2500 種類以上の miRNA が同定されており、全てのヒト遺伝子のうち 3 分の 1 以上が、miRNA によってその発現が抑制されていると考えられている[19, 20]。

miRNA は様々な生命現象、すなわち、細胞の増殖、分化、アポトーシス等と関わっていることが明らかとなっている[21]。種々のがんにおいて miRNA 発現の異常が見られることから、発がんに亢進的、もしくは抑制的に働くことが示唆されている[22]。

がん抑制的に機能する miRNA として、let-7 が良く知られている。ヒトでは、13 種類の let-7 ファミリー miRNA 前駆体が報告されており、これらは 10 種類の異なる配列の mature-miRNA をコードしている[23]。

let-7 ファミリーのうち何種類かは、RAS 遺伝子スーパーファミリーである N-RAS、K-RAS、H-RAS やがん遺伝子として知られる HMGA2 の発現を抑制することが知られている[24-26]。肺がんにおいては、let-7 の発現が減少している傾向があり、let-7 の発現量と患者の予後には相関が見られる[27]。

let-7 のような腫瘍形成抑制的に働く miRNA は、その発現を活性化することで、がんの進行を抑えることができると考えられる。実際、let-7 を肺がん細胞に導入することで増殖抑制効果が得られた例もある[28]。

がん亢進的に働く miRNA として、miR-21 が良く知られている。転写抑制因子 NFIB や RECK 等の遺伝子は、miR-21 の標的遺伝子であることがわかっている[29, 30]。RECK は、がんの浸潤・転移に関与しているマトリックスメタプロテアーゼ MMP の活性を阻害する。

2014 年には、miR-21 が転写された後に、3'末端にアデニンが付加されることによって、miR-21 の分解が促進される仕組みが解明された。そして、がん細胞では miR-21 にアデニンを付加するシステムに異常が生じており、その結果、miR-21 が蓄積するということが明らかになった[31]。miR-21 のようながん亢進的に働く miRNA に関しては、その働きを抑制することによ

って腫瘍抑制効果が期待できると考えられる。

乳がんにおいては、正常組織と比較して miR-21 が過剰に発現している傾向がある。anti-miR-21 オリゴヌクレオチドをヒト乳がん細胞にトランスフェクションして miR-21 分子をノックダウンすると、細胞増殖が抑制され、この細胞をマウスに移植すると、腫瘍の成長が抑制されたとの報告がある [32]。

今後ますます多くの miRNA の標的となる mRNA が特定されると推測される。そして、それらのがんにおける機能解析研究が進むことによって、より有望ながん治療薬の標的となる miRNA が見つかるのではないかと考えられる。

1.3 次世代シーケンサー

あらゆる医学生物学研究において、ゲノム情報・遺伝子情報を解析することが、非常に重要なこととなりつつある。しかし、従来使われていた塩基配列の解析手法であるサンガー法には、データ取得のスループット、拡張性、スピード、コスト等の面で様々な制限があった。サンガー法では、それぞれの反応容器ごとに、1 種類の鋳型 DNA と、DNA 合成を開始するために必要なプライマーオリゴヌクレオチドを準備する必要がある。そのため、大きな DNA の配列決定をする際には、プライマーに相補的な配列を持つクローニングベクターを用いて、断片化した DNA をそれぞれクローン化し、クローンごとに増幅できるようにしなければならない。それに対し、近年新しく誕生した次世代シーケンサーは、より高速、低コストで大量の塩基配列を決定することができる。

次世代シーケンサーによる mRNA 発現解析を行う際、まず mRNA の 3'

末端にあるポリ A 鎖を利用して、total RNA から mRNA のみを分離する。次世代シーケンサーで解読できる DNA 断片長には上限があるため、2 価陽イオン(Mg²⁺)を用いて断片化を行う。その後、ランダムプライマーを用いて逆転写を行うことで鋳型 RNA から 1st strand cDNA を合成する。2nd strand cDNA を合成した後、末端にアダプターオリゴヌクレオチドを結合させ、シーケンス用ライブラリーを作製する。ライブラリーのうち、250~400bp のものを精製し、配列を解読する。

得られたシーケンスがレファレンス配列上のどの位置にあるかを探した(マッピング)後、ゲノム上のそれぞれの遺伝子領域にマッピングされた配列をカウントし、それぞれの遺伝子の発現量を算出する。また、長鎖 non-coding RNA と言われている RNA 群も mRNA 同様、3'端にポリ A 鎖を持つことから、mRNA の発現解析をする際、non-coding RNA の発現解析も同時に行うことができる。

miRNA の第 1 次転写産物である pri-miRNA はポリ A を含んでいるが、Drosha や Dicer 等によるプロセッシングによって切断されると、ポリ A は失われてしまう。そのため、mRNA 発現解析と同様の手法を用いて、mature-miRNA の発現を次世代シーケンサーで解析することは難しいが、pri-miRNA の発現量は調べることができる。

しかし、pri-miRNA は数百~数千塩基長の長鎖 RNA であり、時として 1 つの pri-miRNA から複数の種類の mature-miRNA がプロセッシングされることもある。また、全ての転写された pri-miRNA が mature-miRNA にプロセッシングされているとは限らない。そのため、pri-miRNA の発現解析では、全ての miRNA の発現量を正確に把握することは難しいと思われる。

このため、miRNA 発現解析用に、特殊なアダプターを使ったライブラリ

一作製キットが発売されている。このキットを用いることで、miRNAを含む small RNA 発現を網羅的に解析することができる。ここで用いるアダプターは、Dicer 等の RNA のプロセッシングを行う酵素によって出来た small RNA や miRNA の 3'ヒドロキシル基を特異的に認識して結合する。この 3'端に結合する特殊なアダプターと 5'端に結合するアダプターを利用して cDNA 合成を行うことで、small RNA ライブラリーを作ることができる。

次世代シーケンサーによる解析では、ライブラリーの作製以降は、クローニング操作は一切必要なく、かかる労力も従来型よりはるかに少ない[33]。また、マイクロアレイによる発現解析では、基板上に設置された DNA 断片と相補的な塩基配列を持つ遺伝子しか検出できないという欠点がある。次世代シーケンサーを用いた発現解析にはそのような欠点がなく、手軽に網羅的な発現解析を行うことができる[34]。

遺伝子発現は、遺伝子以外の様々な因子によっても制御されている(DNA メチル化、ヒストン修飾、non-coding RNA による制御等)。DNA のシトシン残基のメチル化修飾は、メチル化された領域での遺伝子発現を抑制することが分かっている。また、組織特異的な遺伝子発現や遺伝子刷り込み等において重要な役割を担っていることが知られている。

DNA のメチル化が異常となることにより、がん抑制遺伝子が不活性化される等、メチル化は発がんにおいて重要な働きを果たしている。したがって、ゲノム中の DNA のメチル化状態を解析することは、がん研究において非常に重要である。次世代シーケンサーを用いて全ゲノムバイスルファイトシーケンスを行うことによって、DNA のメチル化状態をゲノムワイドに解析することができる。

30 種類の様々なヒトの細胞や組織を用いて全ゲノムバイスルファイトシ

ークエンسを行ったところ、メチル化の変化が起こるのは染色体全体の CpG のうち 21.8%に限られているということが明らかになった[35]。網羅的な DNA のメチル化解析データの蓄積は、DNA メチル化により発現が抑制されるがん関連遺伝子の特定や、DNA メチル化異常が誘発される分子機構の解明等につながると考えられる。

ヒストンはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化等の様々な修飾を受ける。このようなヒストンの修飾により遺伝子発現が制御される。ヒストン修飾異常を標的としたがん治療法等も提案されている[36]。次世代シーケンサーを用いることで、ゲノムワイドなヒストンの修飾状態の解析と、転写因子の結合領域の解析を行うことができる。これにはクロマチン免疫沈降 (ChIP)-seq 解析を用いる。

一方、タンパク質をコードしていない non-coding RNA も遺伝子発現に多大な影響を及ぼしていることが知られている。哺乳類のゲノム配列のうち約半分は何らかの RNA に転写されるという報告があり、その多くは non-coding RNA であると考えられている[37]。non-coding RNA が遺伝子発現に関与した例として、ある種の長鎖 non-coding RNA がヒト細胞株において標的遺伝子の発現を促進するエンハンサーの様に働いたという報告がある[38]。現在、ほとんどの non-coding RNA の役割は不明であるが、これら分子が、遺伝子発現と密接にかかわっている可能性は高いと考えられる。

上述した通り、次世代シーケンサーを用いることで、non-coding RNA も含む全ての RNA 発現解析を行うことができる。細胞や組織ごとの non-coding RNA や遺伝子発現量を比較、解析することによって、新しい non-coding RNA と遺伝子との関係性が見えてくるかもしれない。

non-coding RNA の中でも、上述したように、miRNA は時として mRNA

の分解を導く。これにより標的 mRNA の発現レベルが低下することから、次世代シーケンサーにより、RNA 発現解析を行うと、特定の miRNA の発現量と標的 mRNA の発現量に負の相関が見られることがある。RNA 発現解析と small RNA 発現解析のデータを比較、解析することで、新しい miRNA と標的 mRNA 等を発見することができると期待される。

1.4 本研究の目的、考え方、概要

上述した通り、チロシンキナーゼに対する分子標的薬が開発され、白血病のみならず、肺がんの約 40%を占める肺腺がんでは一定の効果が得られたことは、遺伝子発現制御ネットワークの研究が、がん治療に直接結びつくことを具体的に示し、本研究を進める上での大きなきっかけになった。

様々なシグナル経路、様々な遺伝子発現制御ネットワークがある中で、本研究で注目したのは miRNA である。その主な理由は、miRNA が、がんにおいて亢進的もしくは抑制的に働くことを示す実験成果が多数ある[39]ことから、がん組織やがん細胞における特定の miRNA の機能解析研究は、がんの病態メカニズムを理解する上での有用なツールの一つとなりえるだけでなく、合成 pre-miRNA もしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用して、miRNA の発現量をコントロールすることによって、直接的にがん治療法開発につながる可能性がある[40]、と考えたためである。

mRNA や miRNA の機能解析をする際に、網羅的な遺伝子発現解析や miRNA 発現解析のデータは非常に役に立つ。しかし、本研究開始時点では、ウェブ上のデータベースでは、mRNA の発現プロファイルデータは充実してきていたものの、miRNA 等の non-coding RNA に関するデータはまだ十分に蓄積していなかった(現在でも不十分)。

一方、私の所属する研究室では、過去に 26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株を用いて、ゲノム、トランスクリプトームおよびエピゲノムデータの収集を行い、取得したマルチオミックスデータの解析を行っていた[41]。がん細胞株のマルチオミックス解析は、対象となる正常細胞が入手しにくいという問題点があるものの、見出された遺伝子発現変化の意味を、直接、その細胞株を使った実験で検証できるという利点も持ち合わせている。

そこで、この網羅的な RNA 発現解析のデータに加え、miRNA 等も含む small RNA 発現解析のデータを得ることができれば、同じ条件で培養を行った同一細胞株における RNA 発現解析データと small RNA 発現解析データを得ることが出来ると考えた。このようなデータは、本研究開始時点では非常に貴重であり、本研究に強みを与えると考えられた。実際、私の要請に応じて、26 種類すべての細胞株の small RNA 発現データを鈴木研究室で提供いただくことができた。

本研究では、26 種類の肺腺がん由来細胞株から得られた網羅的な mRNA および small RNA の発現データを相関解析することによって、miRNA とその標的 mRNA の探索を行った。

通常、遺伝子や miRNA の発現解析を行い、がん関連遺伝子や miRNA を探索する際には、正常細胞とがん細胞の発現量を比較し、発現量に差があるものを探す手法をとるのが一般的である。しかし、本研究においては、26 種類の肺腺がん由来細胞株間での miRNA や mRNA の発現量の変化を比較し相関解析することによって、肺腺がん細胞の機能維持や悪性度等に関わる miRNA や mRNA が見つかるのではないかと考えた。

上述のように miRNA は時として mRNA の分解を介して標的遺伝子の発現を抑制することから、miRNA とその標的 mRNA の発現量には負の相関

関係が見られると考えられる。そのため、26 種類の肺腺がん由来細胞株間における mRNA と miRNA の発現量変化の相関を見た際、多くの mRNA 発現と強い負の相関が見られる miRNA は、それだけ強く多くの遺伝子の発現を抑制している可能性が高い。そのような miRNA は、解析対象が 26 種類の肺腺がん由来細胞株であることを考慮すると、肺腺がん細胞株中でしっかり機能している可能性が高く、肺腺がんにとって重要な役割を果たしている miRNA であると想像される。そして、その発現の変化は細胞のフェノタイプに影響を与える可能性も高いのではないかと期待した。

一方、そのような miRNA の主要なターゲットを得る目的で、注目する miRNA と、発現において最も強い負の相関を持つ遺伝子も探索することとした。そのような遺伝子は、注目する miRNA によって発現を抑制されており、肺腺がん細胞において重要な働きをしているタンパク質をコードしている可能性が高いと考えた。

以上の考え方にしたがって、26 種類の肺腺がん由来細胞株から得られた mRNA および miRNA の相関解析を行った結果、miR-26a という miRNA が、多くの mRNA 発現と負の相関を持っていることが分かった。そして、HMGA1 という遺伝子の mRNA の 3'UTR に配列の相補性を持ち（すなわち、間接でなく直接の標的である可能性が高い）、HMGA1 と miR-26a は発現において最も強い負の相関を持っていることが判明した。HMGA1 は他の遺伝子の発現を制御する転写因子として知られ[42]、がんの悪性度への関与が示唆されている遺伝子であった[43, 44]。

情報解析の結果、miR-26a と HMGA1 発現の間には負の相関関係が見られたが、その後の細胞を用いた実験の結果、HMGA1 が miR-26a の直接の標的であることが示唆された。また、それら miR-26a と HMGA1 が、肺腺

がん細胞の浸潤能、増殖能等のフェノタイプに影響を及ぼすことが明らかになった。ヒト肺腺がん由来細胞株において、miR-26a は HMGA1 の発現を抑制し、腫瘍抑制的に働くことが示唆された。

2. 研究手法

2.1 細胞株

ヒト肺腺がん由来細胞株 H1299 細胞は American Type Culture Collection (ATCC)から入手し、10% fetal bovine serum(GIBCO)および 1% penicillin streptomycin(GIBCO)を加えた RPMI medium(Life Technologies)中で 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

次世代シーケンサーによる解析に使用した細胞株のリストをまとめて表 1 に示した。次世代シーケンサーに使用した細胞の培養には、抗生剤 Antibiotic-Antimycotic(GIBCO)、MEM 非必須アミノ酸(Sigma)、10%ウシ胎児血清、25 mM HEPES-KOH pH7.4 を添加した medium を使用し、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。ABC-1 細胞、RERF-LC-MS 細胞、VMRC-LCD 細胞の培養には、EMEM medium(ニッスイ)を用いた。A549 細胞および LC2/ad 細胞の培養には DMEM medium(ニッスイ)を用いた。その他細胞の培養には RPMI medium を用いた。LC2/ad 細胞、H1648 細胞、H2347 細胞、PC-3 細胞の培養にはタイプ I コラーゲンプレート(IWAKI)を用いた。次世代シーケンサーによる RNA 発現解析および small RNA 発現解析に用いた細胞の培養は、ゲノムシステム医科学分野 鈴木 絢子博士(現:国立がん研究センター 先端医療開発センター トランスレーショナルリサーチ分野所属)のご協力を得て行った[41]。

2.2 次世代シーケンサーによる RNA 発現解析および small RNA 発現解析

RNA 発現解析および small RNA 発現解析用データについては、東京大学鈴木研究室で取得していただいた。具体的には、以下の通りである。

RNA 発現解析に用いた RNA は、RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用い、マニュアルに従って細胞から抽出を行った。small RNA 発現解析に用いた RNA は、細胞に TRIzol reagent(invitrogen)を 1 ml 加え、ホモジナイズした後、クロロホルムを 0.2 ml 加え、14,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した後、上清に 0.5 ml イソプロパノールを加え、14,000 rpm、4°C で 10 分間遠心して RNA を沈殿させた後、75 % エタノール 1 ml で wash し、nuclease free water に溶解し、抽出を行った。抽出した RNA の純度を、2100 Bioanalyzer(Agilent)を用いて確認した。Assay Class は「Eukaryote Total RNA Nano」に設定し、RNA Integrity Number(RIN)が 9 以上であることを確認した。

mRNA ライブラリーは TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)を使い作製した。mRNA を cDNA に変換後、HiSeq2500 system (Illumina)を用いて、シーケンスを行った。

miRNA ライブラリーは TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina)を使い作製した。miRNA を cDNA に変換後、HiSeq2500 system (Illumina)を用いて、small RNA シーケンスを行った。

シーケンスデータのマッピングは hg19(UCSC)をリファレンスにして行った。マッピングデータをもとに、perl スクリプトを用いて集計を行った。シーケンス解析は、東京大学 鈴木研究室出向研究員 堀内 映実氏の協力を得て行った。

全てのシーケンスデータは以下の accession number で DNA Data Bank of Japan(DDBJ)に登録を行った(RNA-Seq: DRA001846、small RNA-Seq: DRA003587)。

2.3 遺伝子発現ベクターおよび RNA オリゴヌクレオチド

miR-26a 発現ベクター(pcDNA-miR26a2)は addgene から購入した。miR-26a 発現ベクターを細胞にトランスフェクションする実験で、コントロールベクターとして使用したプラスミド(pcDNA3.1)は invitrogen から購入した。HMGA1 siRNA は sigma-Aldrich Japan に依頼して合成した。細胞への siRNA トランスフェクション実験でネガティブコントロールとして使用した siRNA(AllStars Negative Control siRNA)は QIAGEN から購入した。

2.4 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションを行う前日に 6 ウェルプレートに 2.5×10^5 cells/well となるように、2 ml の培地に希釈して細胞を播いた。オリゴヌクレオチドのトランスフェクションには Lipofectamine 3000 (Invitrogen)を用いた。プラスミドベクターのトランスフェクションの手順は以下の通りである。

7.5 μ l のリポフェクタミン 3000 溶液を 125 μ l の OPTi-MEM1 (GIBCO) に添加した。プラスミドベクターと P3000 溶液を OPTi-MEM1 溶液に添加した。プラスミド入り OPTi-MEM1 溶液をリポフェクタミン 3000 入り OPTi-MEM1 溶液に加えた。その混合溶液を 5 分間室温に静置した後、培養細胞を含む培地に全量を直接加えた。

siRNA トランスフェクションの手順は以下の通りである。7.5 μ l のリポフ

ェクタミン 3000 溶液を 125 μ l の OPTi-MEM1 に添加した。siRNA を OPTi-MEM1 溶液に添加した。siRNA 入り OPTi-MEM1 溶液をリポフェクタミン 3000 入り OPTi-MEM1 溶液に加えた。その混合溶液を 5 分間室温に静置した後、培養細胞を含む培地に直接加えた。

プラスミドもしくは siRNA 入り溶液を細胞に加えた後、6 ウェルプレートは 37 °C、5%CO₂ の条件で培養した。タンパク質の抽出をする際には、途中 10 cm シャーレに継代を行った。

2.5 細胞からのタンパク質抽出および濃度調整

細胞からタンパク質を抽出する際は、常に氷上で作業を行った。トランスフェクションを行ってから 3 日後に、細胞の入った 10 cm シャーレを、冷却した Phosphate buffered saline(PBS)で 2 回ウォッシュした。その後、スクレーパーで細胞をはがし、細胞懸濁液を 15 ml 滅菌ポリプロピレン製コンカル遠心チューブに入れ、容量が 10 ml となるように PBS を加え、4°C、1,000 rpm で 5 分間遠心をした。上清を取り除き、容量が 10 ml となるように PBS を再び加え、4°C、1,000rpm で 5 分間さらに遠心を行った後上清を取り除いた。この作業をさらにもう一度行った後に、細胞ペレットを 10% complete mini solution (Roche) RIPA buffer (Wako Pure Chemical)に溶かした。その細胞懸濁液を 5 分間氷上で静置した後、攪拌し、超音波発生器 UR-21P(TOMY)を用いて超音波処理を行った。そして、14,000 rpm で 20 分間、4°C で遠心し、上清をタンパク質抽出液として-80°C で保存した。タンパク質抽出液のタンパク質濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用い、マニュアルに従って測定し、濃度の調整を RIPA buffer で行った後、タンパク質抽出液と等量の 2×sample buffer を

加え、ヒートブロックで 95°C、5 分間加熱した。加熱した後、サンプルはすぐに氷上に移し、-80°C で保存した。

・ 2×sample buffer 組成

0.5M トリス塩酸バッファー(pH=6.8)	2.5 ml
2-メルカプトエタノール	1 ml
10% SDS	4 ml
スクロース	1 g
Bromophenol Blue	1 mg
水	10 ml にメスアップ

2.6 SDS-PAGE、ウェスタンブロット

垂直型電気泳動装置にポリアクリルアミドゲルをセットし、SDS-PAGE 泳動バッファー(250 mM Tris、1.92 M glycine、1%SDS)で中を満たし、それぞれのウェルにサンプルおよびマーカーとして Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad)を静かにアプライし、パワーステーション 1000VC(ATTO)を用いて電流を流した。ゲル濃度は HMGA1 を分離する場合 5~20%とし、Tubulin を分離する際は 10%とした。流し始めてから 30 分間は 50 V で泳動し、その後は 120 V で泳動し、Bromophenol Blue がゲルの下端まで移動したら電流を止め、ゲルを電気泳動装置からはずした。転写装置 TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL(Bio-Rad)の+極から、濾紙、Immun-Blot PVDF Membrane(Bio-Rad)、ゲル、濾紙の順でセットした。濾紙は事前に Towbin バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、20% Methanol) に 1 時間以上浸しておいた。また、PVDF 膜は事前に 100%

メタノール溶液に 20 秒間浸すことで親水化処理を行った。パワーサプライ PowerPac HC(Bio-Rad)を用いて 4°C、20 V で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキングバッファー(5% スキムミルク、0.1% Tween20、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl)が入ったプラスチックケースに転写後のメンブレンを入れて、室温で 1 時間ベリータンサーに乗せて攪拌した。抗体をブロッキングバッファーで希釈した。HMGA1 抗体は ab4074(abcam)を用い、10,000 倍に希釈した。Tubulin 抗体は ab129153(abcam)を用い、1,000 倍に希釈した。4°C で一晩以上 PVDF 膜と抗体と反応させた。PVDF 膜を TBST(0.1% Tween 20/TBS)に浸し、10 分間室温で攪拌することで洗浄した。TBST を交換して合計 3 回洗浄した。ブロッキングバッファーで 2 次抗体 NA934(GE Healthcare)を 100,000 倍に希釈し、PVDF 膜を浸し、室温で 1 時間攪拌することで反応させた。PVDF 膜を TBST に浸し、10 分間室温で攪拌することで洗浄した。TBST を交換して合計 3 回洗浄した。ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare)の Solution をメンブレン全体にかけて 5 分間反応させた。Las-3000 mini system (FujiFilm)を用いて画像を得た。

2.7 リアルタイム PCR

トータル RNA は miRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて、マニュアルに従い細胞から抽出した。プライマーは Exigen に依頼して合成した。miRNA の発現レベルは、Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (Clontech)を用いて、マニュアルに従い、トータル RNA を DNase 処理した後、ポリアデニル化および逆転写し、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、SYBR Green 検出によるリアルタイム PCR 法

により解析した。mRNA 発現解析に使用した際と同じ温度条件と時間条件で解析を行った(下記参照)。miR-26a 発現解析に用いたプライマーは、forward primer (5' -TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT-3')と Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit に付属のプライマーを用いた。

以下の方法で mRNA の発現レベルを測定した。1 ng~5 µg の Total RNA に対して、オリゴ dT プライマー(Invitrogen) 1 µl、10 mM dNTP Mixture(Promega)を 5 µl、0.1 M DTT(Invitrogen) 2 µl、5×First Strand Buffer(Invitrogen) 4 µl、RNasin Plus RNase inhibitor(Promega) 1 µl、SuperScript Reverse Transcriptase(Invitrogen) 1 µl を加え、42°C で 2 時間以上逆転写させ一本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を QIAquick PCR purification kit(QIAGEN)を用い、精製した。精製した cDNA の濃度を nanodrop 1000(Thermo SCIENTIFIC)で測定し、濃度を均一に揃え、そのサンプル 1 µl に対して SYBR Green Master Mix (ABI) 5 µl、10 pmol の Forward primer および Reverse primer をそれぞれ 2 µl ずつ添加し、ABI7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、以下の温度条件と時間条件でリアルタイム PCR を行った。

- 1) 50°C、2 分
- 2) 95°C、10 分
- 3) 95°C、15 秒
- 4) 60°C、1 分

※3)と 4)は 40 サイクル繰り返し行った。

miR-26a と HMGA1 の発現レベルは、U6 small nuclear RNA 発現レベルもしくは GAPDH 発現レベルと比較し、ノーマライズし、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量した[45]。

HMGA1 発現解析には以下のプライマーを用いた。

プライマーペア A(forward): 5' -GGCCCAAATCGACCATAAAGG-3'

プライマーペア A(reverse): 5' -GGACAAATCATGGCTACCCCT-3'

プライマーペア B(forward): 5' -CAGCGAAGTGCCAACACCTAA-3'

プライマーペア B(reverse): 5' -GTTTTTGCTTCCCTTTGGTCG-3'

2.8 Cell migration assay および Cell invasion assay

CytoSelect 96-Well Cell Migration Assay 8 μ m, Fluorometric Format (Cell Biolabs, Inc.)および CytoSelect 96-Well Cell Invasion Assay Basement Membrane, Fluorometric Format (Cell Biolabs, Inc.)を用いて、Cell migration assay および Cell invasion assay を行った。

アッセイを行う 48 時間前に、siRNA もしくはプラスミドの H1299 細胞へのトランスフェクションを行った。それら H1299 細胞を血清抜き RPMI 培地に懸濁して、100 μ l ずつ 96 well plate の upper chamber の中に播いた。Lower chamber には走化性因子として 10%血清入り RPMI 培地を 150 μ l 入れた。

Migration assay と Invasion assay に用いる 96 well plate は、upper chamber と lower chamber を隔てている膜が異なっている (Migration: ポアサイズ 8 μ m のポリカーボネート製メンブレン; Invasion: ポアサイズ 8 μ m のポリカーボネート製メンブレンの上部に基底膜マトリクスがコートされている)。12 時間後、Cell detachment solution を用いて、メンブレン下部の細胞をはがした。はがした細胞に 4* Lysis Buffer/CyQuant GR dye solution を加え、lower chamber に移動した細胞数を、FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH)を用いて蛍光を検出(励起波長 480 nm、蛍光波長 520 nm)

することでカウントした。

2.9 細胞増殖アッセイ

生細胞数は Cell Counting Kit-8(同仁化学)を用いて計測した。Cell Counting Kit 溶液を 96 well plate の細胞の播かれた well にそれぞれ 10 μ l ずつ添加し、2 時間 CO₂ インキュベーター内で 37°C、5% CO₂ の条件で静置した。iMark マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)を用い、それぞれの well の溶液の 450 nm の吸光度を測定することで、生細胞数を計測した。

2.10 プラスミドの増幅

10 μ g Bacto Tryptone(BD)、5 g Bacto Yeast Extract(BD)、10 g NaCl に 1 l の純水を加え、オートクレーブ (121°C、20 分) にかけることで LB 培地を作製した。抗生物質は、培地を使用する直前に、最終濃度が次のようになるように加えた。アンピシリンの場合 100 μ g/ml、カナマイシンの場合 50 μ g/ml。寒天培地は、750 mg Bacto Agar(BD)に 50 ml LB 培地を加え、オートクレーブにかけ、溶液が 60°C 程度にまで下がったら、上記の濃度となるように抗生物質を加え、10 cm シャーレ 2 枚に分注して作製した。

One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli(invitrogen)を用いて、マニュアルに従ってプラスミドをコンピテントセルにトランスフェクションした。そのコンピテントセルの入ったバイアルに、事前に 37°C に温めておいた 250 μ l の S.O.C. medium(invitrogen)を加えて、225 rpm、37°C の条件で、インキュベーター内で 1 時間振盪培養した。寒天培地に 20~200 μ l の培養を行った S.O.C. medium を播き広げ、プレートを上下さかさまにして、37°C のインキュベーター内に一晩置いた。プレートに生えたコロニー

をそれぞれ滅菌したつまようじでピックアップし、4 ml の 抗生物質入り LB 培地に播き、225 rpm、37°C で 8 時間程度振盪培養した。その後、GenElute Plasmid Miniprep Kit(Sigma-Aldrich)を用いて、マニュアルに従って、プラスミドの抽出を行った。

大量培養の際には、1 時間培養した S.O.C medium を抗生物質入りの 100 ml LB 培地に播き、225 rpm、37°C で一晩培養した後に、Plasmid Midi Kit(QIAGEN)を用いて、マニュアルに従ってプラスミドの抽出を行った。抽出したプラスミドの濃度は nanodrop 1000 で測定した。

2.11 ルシフェラーゼアッセイ

H1299 細胞から DNeasy Blood and Tissue Kit(Qiagen)を用いて、マニュアルに従って、total DNA を抽出した。抽出した total DNA と Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs)を用いて、forward primer(5'-TCGAAAGCTTCCCAAATCGACCATAAAGGGTG-3') と reverse primer (5'-TCGAACTAGTTCCAGAAAAGGATATTTTTTTTATTCAAG-3')を使い、GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems)により、以下の温度条件と時間条件で、miR-26a binding site を含むヒト HMGA1 3' UTR 領域を増幅した。

- 1) 98°C、30 秒
- 2) 98°C、10 秒
- 3) 65°C、30 秒
- 4) 72°C、1 分 30 秒
- 5) 72°C、10 分

6) 4°C、Hold

※2)~4)は 30 サイクル繰り返し行った。

増幅した PCR 産物に 10×Loading buffer(Takara)を加え、2%アガロースゲルを用い電気泳動によって分離し、UV Transilluminator(TOYOBO)により、DNA を可視化した。そして、同時に流した 20bp DNA Ladder(Dye Plus)(Takara)を参考に、ゲルから目的のバンド部分を切り出し、QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN)を用いて精製し、Hind III(Takara)、Spe I (Takara)および 10×M buffer(Takara)を加え、37°C で 1 時間以上反応させることで制限酵素処理をし、Alkaline Phosphatase(Takara)を使い、マニュアルに従い脱リン酸化処理を行った後、再び QIAquick PCR purification kit によって精製した。上記 PCR 産物と同様に制限酵素処理を行った pMIR-REPORT miRNA Expression Reporter Vector(Thermo Fisher Scientific)と脱リン酸化処理をした PCR 産物を、DNA Ligation Kit(Takara)を用い、マニュアルに従ってライゲーションさせ、Wild type ルシフェラーゼ発現ベクターを作製した。

KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Toyobo)を使い、forward primer (5'-ATGAACTATAAAAAAATATCCTTTTCTGGAA-3')と reverse primer (5'-CTGCAAATAGGAAACCAGAGAGGG-3')を用い、以下の温度条件と時間条件で PCR を行うことによって、Wild type ルシフェラーゼ発現ベクターから、miR-26a binding site にミューテーションを入れた Mutant ルシフェラーゼ発現ベクターを作製した。

1) 94°C、2 分

2) 98°C、10 秒

3) 68°C、6 分 30 秒

6) 4°C、Hold

※2)と 3)は 20 サイクル繰り返し行った。

Wild type ルシフェラーゼ発現ベクターおよび Mutant ルシフェラーゼ発現ベクターの挿入配列は、サンガーシーケンスを行うことによって確認した。サンガーシーケンスはファスマックに依頼した。また、プラスミドの導入効率の差を補正するために、Renilla ルシフェラーゼ発現ベクター pRL-TK vector(Promega)をインターナルコントロールとして使用した。

Wild type ルシフェラーゼ発現ベクターもしくは Mutant ルシフェラーゼ発現ベクター、miR-26a 発現ベクター(pcDNA-miR26a2) もしくはコントロールベクター(pcDNA3.1)、さらに renilla ルシフェラーゼ発現ベクターを H1299 細胞にトランスフェクションした。48 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて、マニュアルに従いサンプルを調製し、Centro LB 960 (BERTHOLD TECHNOLOGIES)によってルシフェラーゼ活性を検出した。

3. 結果

3.1 26種類のヒト肺腺がん由来細胞株における miRNA と mRNA の発現解析

次世代シーケンサーHiSeq2500を用いて、26種類のヒト肺腺がん由来細胞株における small RNA 発現解析を行った。トータルで 1,341 種類の small RNA 発現を解析し、発現レベルを ppm(parts per million)の単位で評価した。non-coding RNA 等も含む 57,100 種類の RNA 発現レベルは、rpkm(reads per kilobase per million)の単位で解析した。ppm とは 100 万リードあたりのシーケンスタグ数のことで、各遺伝子領域にマッピングされたシーケンスタグを全シーケンスタグ数でノーマライズしたものである。さらに遺伝子の長さでノーマライズしたものが rpkm の単位で表され、rpkm は 1kb あたりに何 ppm のシーケンスタグが存在するかを表している。

26種類のヒト肺腺がん由来細胞株間での miRNA と mRNA の関係性を評価するため、small RNA 発現解析および RNA 発現解析の結果から得られた miRNA の発現量と mRNA の発現量について細胞株間での相関係数を算出した。ヒト肺腺がん由来細胞株中で miRNA が mRNA の分解を促進していた場合、両者の発現量には負の相関関係が見られると考えられる。

RNA 発現解析を行った際、mRNA の発現量と non-coding RNA の発現量のデータを同時に得ることができたが、non-coding RNA は 3' UTR を持たないために、相関係数を計算する際に用いなかった。また、全ての miRNA と mRNA の発現量の相関係数を算出すると、強い負の相関を持つ miRNA と mRNA の組み合わせのほとんどが非常に発現の低いものばかりで占められてしまう。そのため、本研究では、細胞株を通じて一定の発現が見られた

全ての miRNA と mRNA (発現量の平均値が mRNA は 40 rpkm 以上、miRNA は 100 ppm 以上)の発現量の相関係数を算出し、このデータをその後の解析で使用した。条件に当てはまる mRNA の総数は 1921 種類、miRNA の総数は 131 種類であった。

mRNA 発現量と miRNA 発現量の相関係数の値で作製したヒートマップを図 1 に示す。また、同様に相関係数の値の分布を表したグラフを図 2 に示す。miRNA と mRNA の組み合わせの数が、相関係数 0 の周辺に最も多く、0 から離れるにつれて減少していくことがわかる。また相関係数の分布の山の中心が 0 よりも左側にずれており、負の相関を持つものの方が正の相関を持つものよりも多い。実際に正の相関をもつものと負の相関を持つものの総数を計測すると、負の相関をもつものの方が、正の相関を持つものよりも、全体の割合で約 13%多かった。これは、miRNA が mRNA の発現を負に制御することに起因している可能性が考えられる。

3.2 26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株における miR-26a 発現量と HMGA1 発現量の負の相関

26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株間での small RNA と mRNA の相関解析をすることで、肺腺がん細胞において重要な働きをしている miRNA と標的 mRNA 候補の探索を行った。そのような miRNA と mRNA を探索する際に、本研究ではまず、発現量について、多くの mRNA と強い負の相関を持つ miRNA を探索した。多くの mRNA と負の相関を持つ miRNA は、多くの遺伝子の発現を抑制しており、肺腺がん細胞株において機能することで重要な役割をはたしている可能性が高いと考えられる。

具体的な手順としては、miRNA および mRNA の発現解析データをもと

に、ある 1 種類の miRNA と全ての mRNA の発現量について、26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株間での相関係数の平均値を計算した。この計算を 131 種類全ての miRNA において行った。そのデータをもとに、1 次元散布図を作製したものが図 3 である。また、mRNA と強い負の相関の見られた miRNA TOP10 を表 2 に示す。

図 3 に示す 1 次元散布図において、hsa-mir-26a-1 という miRNA が、あらゆる miRNA の中で最も下端のドットにプロットされ、多くの mRNA と強い負の相関を持つことが明らかになった。hsa-mir-26a-1 は、肺腺がんにおいて多くの遺伝子の発現量に対して影響を与えている重要な miRNA である可能性が考えられた。

mRNA の 3' UTR に hsa-mir-26a-1 と配列の相補性を持ち、26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株間で hsa-mir-26a-1 の発現量と強い負の相関を持つ遺伝子は、hsa-mir26a-1 の標的である可能性が高い。また、そのような遺伝子は肺腺がんにおいて重要な働きをしている可能性が高いと考えられる。

3' UTR に hsa-mir-26a-1 との配列相補性を持ち、26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株において hsa-mir-26a-1 発現と強い負の相関を持つ mRNA をリストアップした。hsa-mir-26a-1 発現量と強い負の相関が見られた遺伝子 TOP10 を表 3 に示す。表 3 に示されるように、HMGA1 という遺伝子が hsa-mir-26a-1 と最も強い負の相関を持つということが分かった。

また、hsa-mir-26a-1 と同じ配列の mature-miRNA にプロセシングされる miR-26a ファミリー hsa-mir-26a-2 や hsa-mir-26b の発現量も、HMGA1 発現量と強い負の相関が確認された。そのため、HMGA1 は miR-26a(hsa-mir-26a-1、hsa-mir-26a-2、hsa-mir-26b をまとめて以後このように表現する)によってその発現を抑制されている可能性が高いと考えら

れた。miR-26a と HMGA1 の発現量の比較を図 4 に示す。

miR-26a は、肺がんや肝細胞癌、乳がん等多くのがんにおいてその発現が抑制されている一方[46-49]、高悪性度神経膠腫、胆管癌では過剰な発現が見られる[50, 51]。miR-26a は、様々ながんにおいて、腫瘍抑制的もしくは亢進的に働くことで、発がんやがんの進行に関与していると考えられている。HMGA1 は遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの A/T リッチな DNA 配列と直接相互作用してクロマチンの構造を変化させることによって、遺伝子の発現を制御するタンパク質（転写因子）である[42]。また、乳がんや肺がんにおいて HMGA1 の過剰な発現が見られ、がんの悪性度への関与が示唆されていることから[43, 52]、miR-26a が HMGA1 の発現を抑制していた場合、miR-26a の発現は肺腺がん細胞のフェノタイプに影響を与える可能性が高いと考えられた。

3.3 H1299 細胞において miR-26a は mRNA の分解を伴って HMGA1 の発現を制御する

上述のように、次世代シーケンサーによる発現解析の結果、26 種類の肺腺がん由来細胞株において、HMGA1 発現量と miR-26a 発現量との間に負の相関が見られた。この負の相関が、miR-26a による HMGA1 発現抑制に起因するものなのかを調べるために、細胞に miR-26a を強制発現させ、細胞内 HMGA1 タンパク質量を計測した。

実験には、H1299 細胞を用いた。H1299 細胞では、他の肺腺がん由来細胞株と比較して、miR-26a 発現が低く、逆に HMGA1 の発現は高い。miR-26a 発現ベクターを細胞にトランスフェクションさせた際の、miR-26a 発現量をリアルタイム PCR で計測した。その結果、miR-26a 発現ベクターの導入に

よって、miR-26a 発現量が 500 倍以上に増加した(図 5)。miR-26a を過剰発現させた際の、HMGA1 タンパク質発現量をウェスタンブロットで計測した結果、HMGA1 タンパク質発現量が著しく減少した(図 6)。

miRNA は、mRNA の分解を介して標的遺伝子の発現を抑制する場合と翻訳を阻害するのみの場合がある。miR-26a はどのような機構で標的遺伝子の発現を抑制するのかを調べるために、miR-26a 強制発現時の HMGA1 mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって計測した。miR-26a が HMGA1 の翻訳を阻害するだけでは HMGA1 mRNA 発現量に変化は見られないが、HMGA1 mRNA 分解を促進していた場合、HMGA1 の mRNA 発現量は減少すると考えられる。実験の結果、タンパク質発現量と同様に HMGA1 mRNA 発現量も減少していた(図 7)。以上の結果から、miR-26a は、mRNA 分解を伴うことで HMGA1 の発現を抑制することが分かった。

続いて、ルシフェラーゼアッセイを行い、miR-26a が HMGA1 の 3' UTR の標的領域に結合し、発現を抑制する働きを持つかどうかを調べた。

TargetScanHuman(<http://www.targetscan.org/>)で予測した miR-26a 結合領域を含む HMGA1 の 3' UTR 領域をマルチプルクローニングサイトに組み込んだ Wild type ルシフェラーゼ発現ベクターと、miR-26a 結合領域にミュートーションを入れた Mutant ルシフェラーゼ発現ベクターを作製した(図 8)。それらルシフェラーゼ発現ベクターに加えて、miR-26a 発現ベクターもしくはコントロールベクターを細胞に同時にトランスフェクションし、48 時間後にライセートを調製し、ルシフェラーゼ活性を計測した。その結果、Wild type ルシフェラーゼ発現ベクターをトランスフェクションした細胞に、miR-26a 発現ベクターをトランスフェクションした際、ルシフェラーゼ活性が約 50%減少した(図 9)。しかし、コントロールベクターをトランスフ

エクシオンした際には、ルシフェラーゼ活性に大きな変化は見られなかった。また Mutant ルシフェラーゼ発現ベクターをトランスフェクションした細胞では、miR-26a 発現ベクターもしくはコントロールベクターをトランスフェクションした際に、ルシフェラーゼ活性に大きな変化は見られなかった。以上の結果から、miR-26a は HMGA1 の発現を抑制するということが示唆された。

3.4 H1299 細胞における、miR-26a の細胞の転移能、浸潤能、増殖能に対する影響

miR-26a の細胞における働きをより詳細に明らかにするために、H1299 細胞において、miR-26a を強制発現させた際の細胞のフェノタイプの変化を観察した。まず、miR-26a を強制発現させた際の、細胞の転移能、浸潤能の変化を調べるために、migration assay および invasion assay を行った。miR-26a 発現ベクターをトランスフェクションした細胞グループとコントロールベクターをトランスフェクションしたコントロール細胞グループを用意し、それら細胞を血清抜き培地で希釈し、96 well plate の上段のチャンバーに播き、12 時間後にチャンバーの底のポリカーボネート膜メンブレンを通過した細胞の数を計測することで、細胞の転移能、浸潤能を評価した。invasion assay では、底のメンブレンに基底膜マトリックス溶液がコーティングしてあるため、浸潤細胞のみが膜を分解して通過できる。実験の結果、invasion assay および migration assay 両アッセイにおいて、miR-26a 強発現細胞グループでは、コントロール細胞グループと比較して、移動細胞数が約 60%減少した(図 10)。このことから、miR-26a は細胞の転移能、浸潤能を抑制する働きを持つことが考えられた。

次に、細胞の増殖速度に対する miR-26a の影響について検討を行った。先ほどのアッセイ同様、H1299 細胞に miR-26a 発現ベクターをトランスフェクションした miR-26a 強発現細胞グループとコントロールベクターをトランスフェクションしたコントロール細胞グループを用意した。それら細胞を 96 well plate に播き、24 時間後、48 時間後、72 時間後にそれぞれ生細胞数を数えることで細胞の増殖速度を計測した。その結果、miR-26a 強発現細胞グループでは、コントロール細胞グループと比較して、細胞増殖速度が減少した(図 11)。このことから、miR-26a には細胞の増殖速度を抑制する働きがあるということが考えられた。

3.5 H1299 細胞における、HMGA1 タンパク質の細胞の転移能、浸潤能、増殖能に対する影響

HMGA1 の発現量を変化させた際の、細胞のフェノタイプの変化を調べた。まず、HMGA1 の発現を抑制した時の、細胞の転移能、浸潤能の変化を調べるために、invasion assay および migration assay を行った。

HMGA1 siRNA を細胞にトランスフェクションすることで HMGA1 タンパク質の発現を抑制した(図 12)。そして、HMGA1 をノックダウンした細胞グループに加え、ネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションしたコントロール細胞グループを用意し、実験を行った。migration assay の結果、HMGA1 ノックダウン細胞グループではコントロール細胞グループと比較して、移動細胞数が約 60%減り、また、invasion assay では、移動細胞数が約 50%減った(図 13)。このことから、HMGA1 は細胞の転移能、浸潤能を促進する働きを持つことが示唆された。

続いて、細胞の増殖速度に対する HMGA1 の影響について調べた。

HMGA1 ノックダウン細胞グループとコントロール細胞グループを用意し、それぞれで細胞の増殖速度を計測した。その結果、HMGA1 ノックダウン細胞グループでは、コントロール細胞グループと比較し、細胞の増殖速度が減少した(図 14)。以上のことから、HMGA1 は細胞の増殖速度を促進する働きを持つことが示唆された。

4 考察

4.1 本実験の総括

本研究では、26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株を用いて次世代シーケンサーによる small RNA 発現解析および mRNA 発現解析を行い、それらのデータを用いて細胞株間での相関解析をすることで、ヒト肺腺がん由来細胞株で重要な機能をもつであろう miRNA 同定を試みた。まず、我々は、miR-26a という miRNA の発現量が、mRNA の発現量と最も強い負の相関を持っていることを見出した。miR-26a は生体内の多くのタンパク質量の調節をする重要な因子であると考えられる。

次に、miRNA はその標的 mRNA の 3' UTR と配列相補性を持つことから、miR-26a の標的となりえる mRNA の中から miR-26a 発現と負の相関を持つものをリストアップした。その結果、HMGA1 遺伝子が、発現量において、miR-26a と最も強い負の相関を持っていることが明らかになった。この組み合わせの負の相関の強さは、配列相補性を考慮しない、全ての mRNA と miRNA の発現の相関係数の分布の中でも上位 0.3%以内に入っていた。

我々は、26 種類の肺腺がん由来細胞株間での miRNA と mRNA の発現量の相関係数という数値的なデータから、この miR-26a と HMGA1 の組み合わせを見出した。この組み合わせが、肺腺がん細胞株で何か意味のある機能を果たしているかは解析時点では不明であった。

その後の細胞を用いた実験の結果、これらの分子はヒト肺腺がん由来細胞株において、細胞の転移、浸潤、増殖に影響を与えていることを示すことができた。また、本実験結果は、一部のがん組織において miR-26a は腫瘍抑制因子として働くという報告[53, 54]や、HMGA1 は様々な細胞において腫

瘍性タンパク質として働くという報告[55]とも一致する。

4.2 miR-26a の HMGA1 以外の標的に対する考察

本研究によって、肺腺がん細胞において miR-26a が HMGA1 を標的として、その発現を抑制することを示したが、過去の研究において、肺がん細胞で miR-26a が PTEN の発現を抑制するという報告[56]や、EZH2 の発現を抑制するという報告[57]がある。本解析において、miR-26a と EZH2 の発現量には強い負の相関が見られたが、PTEN の発現量とは相関が見られなかった。これは、細胞株もしくは miR-26a による発現抑制機構の差によるものではないかと推測される。

PTEN タンパク質は PIP3(ホスファチジルイノシトール 3 リン酸)の脱リン酸化を触媒する酵素で、PI3K-Akt 経路を負に制御する腫瘍抑制因子である[58]。肺がん細胞において miR-26a 発現が抑制されることによって、PTEN 発現が増幅し、その結果、がん性表現型が抑制されたという報告がある[56]。本実験において、肺腺がん細胞を用いて miR-26a を過剰発現させた際、細胞の転移能、浸潤能および増殖能が抑制されたことから、この実験結果は本実験データと矛盾していると考えられる。この矛盾は、両実験に使用した細胞株が異なっているために生じたのではないかと予想しているが確証はない。

EZH2 タンパク質は、ポリコーム抑制複合体 2 を構成する因子で、ヒストンのメチル化を促進する等、エピジェネティックな遺伝子発現調節に関与しており、がんの進行にも関わると言われている[59]。肺がん細胞において、miR-26a の発現を抑制すると、EZH2 の発現量が増加し、細胞の転移・浸潤能が増大するとの報告がある[57]。そのため、本実験において、miR-26a を

過剰発現させた際、細胞の転移能、浸潤能が抑制されたという結果が得られたが、このような結果が得られたのは、miR-26a による HMGA1 発現抑制だけでなく、EZH2 の発現抑制による可能性もある。

H1299 細胞に miR-26a を過剰発現させた際、上記した PTEN や EZH2 の発現の変化が細胞のフェノタイプにどの程度影響を与えるかは現時点では不明である。H1299 細胞株における PTEN の発現量は、HMGA1 発現量の約 50 分の 1 であり、また EZH2 の発現量は約 10 分の 1 であったことから、発現量という面からすれば、PTEN や EZH2 の細胞のフェノタイプに対する影響は、HMGA1 の影響よりもはるかに小さいように思える。しかし、mRNA の発現量とタンパク質の発現量は必ずしも比例しない。また、タンパク質によってはわずかな発現で細胞のフェノタイプに大きな影響を与えるものもあると考えられる。そのため、PTEN や EZH2 が発現変動した際の、細胞のフェノタイプに対する影響は今後検討していく必要があると考えられる。

4.3 本実験で得られた結果と過去の研究結果の比較と考察

過去の研究において、膀胱がんや乳がんにおける miR-26a と HMGA1 の関係性に言及した論文はある[60, 61]が、本研究は肺腺がんにおいて初めて両者の細胞における働きを示した。加えて、過去の研究では、がん細胞を使って miR-26a 発現もしくは HMGA1 発現どちらかに別々に注目した解析報告はあるものの、miR-26a と HMGA1 双方に注目し、その発現の相関を示したのは本研究が初めてである。本研究結果は、肺がん組織において、正常組織と比較して、hsa-mir-26a-1 発現が抑制されているという報告[47]、そして HMGA1 発現量が増大しているという報告[43]双方と矛盾しない。さ

らに、HMGA1 発現量が増大している肺腺がん患者は、他のがん患者よりも生存率が低く、また生存期間が短いという統計データがある[62, 63]。このことから、多くの肺腺がん組織において、miR-26a は HMGA1 発現を抑制することで、腫瘍抑制的に働くという可能性が考えられる。

加えて、本研究では、miR-26a が HMGA1 発現を抑制することで、H1299 細胞の転移能、浸潤能を抑制する可能性を示した。この結果は膵腺がんにおいて HMGA1 発現の低下は浸潤能を抑制するという報告[64]と一致している。また、本研究では、HMGA1 発現の低下が H1299 細胞の増殖抑制につながるということを示した。HMGA1 発現の抑制によって細胞増殖が阻害されるという報告は、過去に乳がんや骨肉腫においてなされている[65]。

近年、非小細胞肺がん組織において HMGA1 の発現量が、隣接する正常組織と比較して、過剰に増えているということが判明した。また、HMGA1 タンパク質量と非小細胞肺がん患者のクリニカルステージには、正の相関があることが分かった。HMGA1 が強く発現している非小細胞肺がん患者は、そうでない患者よりも生存期間が著しく短いということが判明した。

以上のことから、HMGA1 発現量は非小細胞肺がん患者の予後を予測する際の指標の一つとなることが示唆された[66]。本研究結果から、肺腺がん細胞における低レベルの miR-26a 発現が、結果的に高い HMGA1 発現に寄与している可能性が考えられた。非小細胞肺がん患者において高い HMGA1 発現が観察される原因の一つとして、低レベルに維持された miR-26a 発現が関与している可能性は少なくないと推測される。

4.4 今後の肺腺がん治療における miR-26a の可能性

近年、miRNA を標的とした新しいがん治療法が考案されている[67]。例

えば、antimiR という miRNA と配列の相補性を持つオリゴヌクレオチドを用いることで、腫瘍亢進的に働く miRNA の標的遺伝子に対する働きを阻害する手法がある。もしくは、がん細胞において発現の低下している腫瘍抑制的に働く miRNA を体内に導入するなどの手法がある。前者に関しては、Miravirsen と呼ばれるオリゴヌクレオチド型の C 型肝炎治療薬が開発されており、miR-122 に結合することでその機能を阻害する [68]。現在は臨床試験の段階にある。後者に関しては、MRX34 と呼ばれる miR-34 をベースとして開発されたがんを標的とした miRNA 治療薬があり、Miravirsen 同様現在臨床試験中にある [67]。将来的には、肺腺がんの新規治療法を考案する際、後者の方法を用いて、低下した miR-26a 発現を再生させる手法を使うことができるかもしれない。

また、近年 miRNA を様々な疾患におけるバイオマーカーにしようとする研究も進んでいる。miRNA は、疾患によって発現パターンが異なり、血中から検出が可能で、分子が安定しているため、バイオマーカーには適していると考えられる [69]。過去の調査で、悪性もしくは良性の孤立性肺小結節の認められた患者を対象に 3 種類の miRNA によるバイオマーカーパネルの感度の調査を行ったところ、80%以上の感度で悪性の患者を特定することができた [70]。しかし、この感度ではまだ実用化には不十分と考えられ、現パネルに加えて、新規のバイオマーカーを特定することが重要であると考えられる。本研究で機能が明らかになった miR-26a は、多くの肺がん組織において発現が低下しており [47]、非小細胞肺がんの悪性化に関与している HMGA1 の発現を抑制することから、肺腺がんにおける新規のバイオマーカーの候補となりえるかもしれない。

4.5 本研究に用いた解析手法に関する考察

本研究では、肺腺がんにおいて重要な miRNA と標的 mRNA 候補を探索するために、26 種類の肺腺がん由来細胞株における small RNA 発現解析データと RNA 発現解析データの比較解析を行った。本解析では、まず多くの mRNA と負の相関を持つ miRNA を特定し、その miRNA と強い負の相関を持つ mRNA を探索するという手法をとった。この手法を採用した理由は、多くの mRNA の発現量と負の相関を持つ miRNA は、多くの遺伝子発現を抑制することで、肺腺がんにおいて重要な働きを担っている可能性が高いと考えられたためである。そのような miRNA と強い負の相関を持つ mRNA は、miRNA の標的である可能性や、がんのフェノタイプに関与している可能性が高いと考えた。

今回用いた解析手法は、本解析で初めて採用した新規の手法である。本研究では、この解析手法を用いることによって、次世代シーケンサーの解析データから miR-26a と HMGA1 の組み合わせを絞り込むことができた。そして、細胞を用いた実験を行うことで、miR-26a は HMGA1 の発現を抑制し、肺腺がん細胞のフェノタイプに影響を与える可能性を示すことができた。

この手法は、肺腺がん由来細胞株だけでなく、他のがん細胞株を用いた解析にも応用がきくと考えられる。今後も、多数の同種類のがん細胞株間で miRNA と mRNA の発現量の相関解析を行うことで、そのがん細胞株群で重要な役割を果たしている miRNA とそのターゲット mRNA を新たに見出すことが可能であろう。また、似た手法で、あるがん細胞株群で重要な役割を果たしている mRNA のペアや non-coding RNA-RNA のペアなどを見出すことが出来ると期待される。

5 謝辞

本研究に関して、終始ご指導ご鞭撻をいただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻ゲノムシステム医科学分野 菅野 純夫 教授に心より感謝します。

次世代シーケンサーによる遺伝子解析にご協力いただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻情報生命科学講座の皆様、特に、鈴木 穰 教授、鈴木研究室出向研究員 堀内 映実 氏に謹んで感謝の意を表します。

試薬や機材の発注や使用において大変お世話になりました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻ゲノムシステム医科学分野 渡邊 学 准教授に深く感謝申し上げます。

貴重な細胞をご寄贈していただき、また研究に関しても多くの御助言などをいただいた国立がん研究センター 先端医療開発センター トランスレーショナルリサーチ分野 鈴木 絢子 博士に深く感謝いたします。

博士論文を書くにあたって、様々な御助言などをいただいた工学院大学工学部生命化学科 水島 純子 特任教授に心より感謝します。

ルシフェラーゼアッセイの際、必要になる機材等を貸して下さったメディカル情報生命専攻病態医療科学分野 渡邊 俊樹 教授、そしてサポートしていただいた同研究室の方々に深く感謝いたします。

最後になりましたが、研究室での生活において様々な御助言、ご協力を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻ゲノムシステム医科学分野に所属している全ての方々に深く感謝いたします。

6 参考文献

1. D'Addario, G., et al., *Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 5**: p. v116-9.
2. Couraud, S., et al., *Lung cancer in never smokers--a review*. Eur J Cancer, 2012. **48(9)**: p. 1299-311.
3. Feld, R., L.V. Rubinstein, and T.H. Weisenberger, *Sites of recurrence in resected stage I non-small-cell lung cancer: a guide for future studies*. J Clin Oncol, 1984. **2(12)**: p. 1352-8.
4. Hess, K.R., et al., *Metastatic patterns in adenocarcinoma*. Cancer, 2006. **106(7)**: p. 1624-33.
5. Huang, C.L., et al., *Tailor-made chemotherapy for non-small cell lung cancer patients*. Future Oncol, 2006. **2(2)**: p. 289-99.
6. Mitsudomi, T., K. Suda, and Y. Yatabe, *Surgery for NSCLC in the era of personalized medicine*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10(4)**: p. 235-44.
7. Mitsudomi, T., *Advances in target therapy for lung cancer*. Jpn J Clin Oncol, 2010. **40(2)**: p. 101-6.
8. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350(21)**: p. 2129-39.
9. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448(7153)**: p. 561-6.
10. Timm, A. and J.M. Kolesar, *Crizotinib for the treatment of*

- non-small-cell lung cancer*. Am J Health Syst Pharm, 2013. **70**(11): p. 943-7.
11. Kwak, E.L., et al., *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1693-703.
 12. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain*. PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e73.
 13. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
 14. Liloglou, T., et al., *Epigenetic biomarkers in lung cancer*. Cancer Lett, 2014. **342**(2): p. 200-12.
 15. Zhang, W., J.E. Dahlberg, and W. Tam, *MicroRNAs in tumorigenesis: a primer*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 728-38.
 16. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
 17. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
 18. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
 19. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
 20. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.

21. Wu, F., Z. Yang, and G. Li, *Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **386**(4): p. 549-53.
22. Wang, V. and W. Wu, *MicroRNA-based therapeutics for cancer*. *BioDrugs*, 2009. **23**(1): p. 15-23.
23. Roush, S. and F.J. Slack, *The let-7 family of microRNAs*. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(10): p. 505-16.
24. Yu, F., et al., *let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1109-23.
25. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. *Cell*, 2005. **120**(5): p. 635-47.
26. Mayr, C., M.T. Hemann, and D.P. Bartel, *Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation*. *Science*, 2007. **315**(5818): p. 1576-9.
27. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
28. Lee, Y.S. and A. Dutta, *The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene*. *Genes Dev*, 2007. **21**(9): p. 1025-30.
29. Fujita, S., et al., *miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism*. *J Mol Biol*, 2008. **378**(3): p. 492-504.
30. Gabriely, G., et al., *MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators*. *Mol Cell Biol*, 2008.

- 28(17): p. 5369-80.
31. Boele, J., et al., *PAPD5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(31): p. 11467-72.
 32. Si, M.L., et al., *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2799-803.
 33. Diaz-Sanchez, S., et al., *Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety*. Poult Sci, 2013. **92**(2): p. 562-72.
 34. Atkinson, S.R., S. Marguerat, and J. Bahler, *Exploring long non-coding RNAs through sequencing*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(2): p. 200-5.
 35. Ziller, M.J., et al., *Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 477-81.
 36. Suzuki, T. and N. Miyata, *Epigenetic control using natural products and synthetic molecules*. Curr Med Chem, 2006. **13**(8): p. 935-58.
 37. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
 38. Orom, U.A., et al., *Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells*. Cell, 2010. **143**(1): p. 46-58.
 39. Feng, Z., et al., *Tumor suppressor p53 meets microRNAs*. J Mol Cell Biol, 2011. **3**(1): p. 44-50.
 40. Gulino, R., et al., *MicroRNA and pediatric tumors: Future perspectives*. Acta Histochem, 2015.

41. Suzuki, A., et al., *Aberrant transcriptional regulations in cancers: genome, transcriptome and epigenome analysis of lung adenocarcinoma cell lines*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. 13557-72.
42. Benecke, A.G. and S. Eilebrecht, *RNA-Mediated Regulation of HMGA1 Function*. Biomolecules, 2015. **5**(2): p. 943-57.
43. Kettunen, E., et al., *Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **149**(2): p. 98-106.
44. Huang, R., et al., *Overexpression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of breast cancer*. Mol Cell Biochem, 2015.
45. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
46. Ji, J., et al., *MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1437-47.
47. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.
48. Liu, X.X., et al., *MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11*. FEBS Lett, 2011. **585**(9): p. 1363-7.
49. Zhang, B., et al., *Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2*

- in breast cancer*. Carcinogenesis, 2011. **32**(1): p. 2-9.
50. Huse, J.T., et al., *The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo*. Genes Dev, 2009. **23**(11): p. 1327-37.
51. Zhang, J., C. Han, and T. Wu, *MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating beta-catenin*. Gastroenterology, 2012. **143**(1): p. 246-56 e8.
52. Huang, R., et al., *Overexpression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of breast cancer*. Mol Cell Biochem, 2015. **404**(1-2): p. 251-7.
53. Zeitels, L.R., et al., *Tumor suppression by miR-26 overrides potential oncogenic activity in intestinal tumorigenesis*. Genes Dev, 2014. **28**(23): p. 2585-90.
54. Zhao, S., et al., *MiR-26a inhibits prostate cancer progression by repression of Wnt5a*. Tumour Biol, 2014. **35**(10): p. 9725-33.
55. Pierantoni, G.M., et al., *High Mobility Group A1 (HMGA1) proteins interact with p53 and inhibit its apoptotic activity*. Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1554-63.
56. Liu, B., et al., *MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(11): p. 1692-704.
57. Dang, X., et al., *MicroRNA-26a regulates tumorigenic properties of EZH2 in human lung carcinoma cells*. Cancer Genet, 2012. **205**(3): p. 113-23.

58. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
59. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
60. Lin, Y., et al., *miR-26a inhibits proliferation and motility in bladder cancer by targeting HMGA1*. FEBS Lett, 2013. **587**(15): p. 2467-73.
61. Zhao, X.X., et al., *MicroRNA-26a inhibits proliferation by targeting high mobility group AT-hook 1 in breast cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(1): p. 368-73.
62. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. p11.
63. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.
64. Liau, S.S., A. Jazag, and E.E. Whang, *HMGA1 is a determinant of cellular invasiveness and in vivo metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11613-22.
65. Yuan, S., et al., *Silencing of HMGA1 expression by RNA interference suppresses growth of osteogenic sarcoma*. Mol Cell Biochem, 2011. **355**(1-2): p. 281-7.
66. Zhang, Z., et al., *Elevated expression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of non-small cell lung cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(2): p. 1213-9.

67. Ling, H., M. Fabbri, and G.A. Calin, *MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(11): p. 847-65.
68. Hildebrandt-Eriksen, E.S., et al., *A locked nucleic acid oligonucleotide targeting microRNA 122 is well-tolerated in cynomolgus monkeys*. Nucleic Acid Ther, 2012. **22**(3): p. 152-61.
69. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
70. Xing, L., et al., *Sputum microRNA biomarkers for identifying lung cancer in indeterminate solitary pulmonary nodules*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(2): p. 484-9.

7. 図表

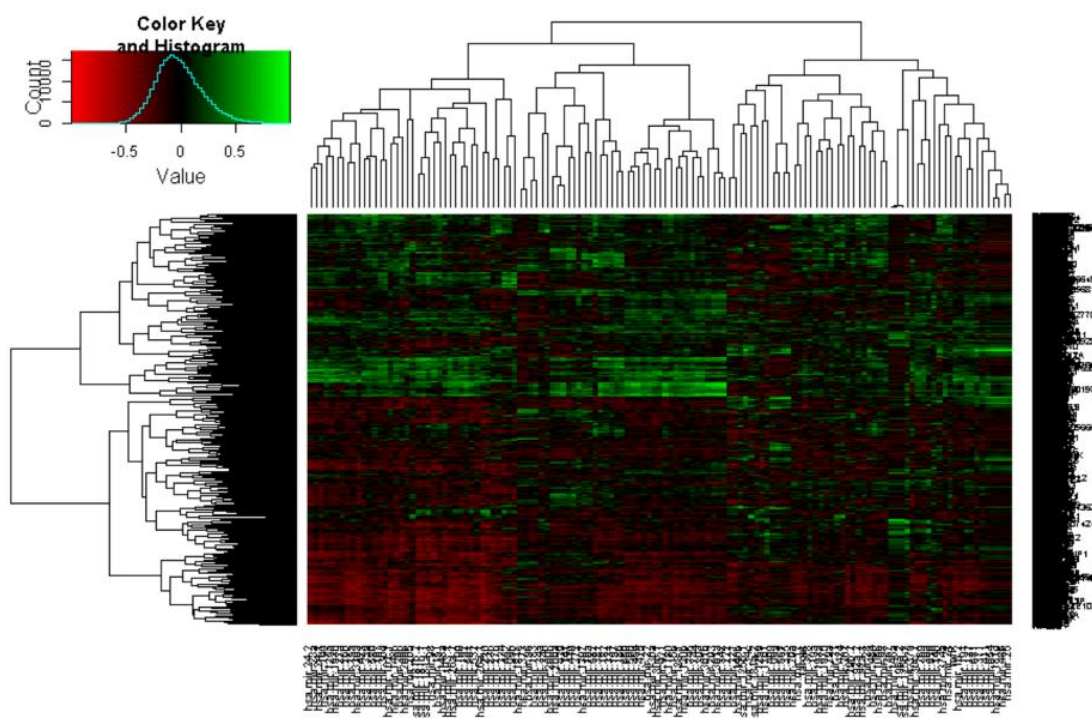


図 1. miRNA と mRNA の発現量の相関係数から作製したヒートマップ
次世代シーケンサーを用いて、26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株の miRNA と mRNA の発現量を解析し、その相関係数の値で作製したヒートマップ。縦軸は mRNA、横軸は miRNA を表している。mRNA の発現量は、reads per kilobase per million (rpkm)、miRNA の発現量は parts per million (ppm) でそれぞれ算出した。このヒートマップ上にある mRNA は、発現量の平均値が 40 rpkm 以上、miRNA は 100 ppm 以上のもので構成されている。

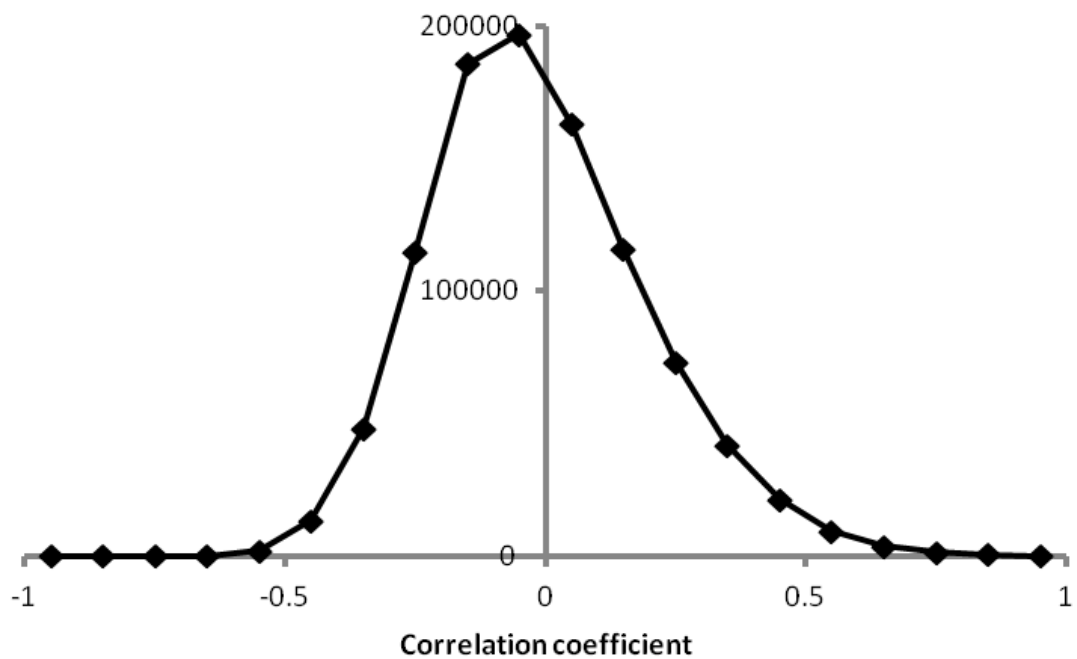


図 2. miRNA と mRNA の発現量の相関係数の分布

26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株における miRNA と mRNA の発現量の相関係数の値の分布を表した散布図。横軸は相関係数の値を表し、縦軸は miRNA と mRNA の組み合わせの数を表している。mRNA の発現量は、reads per kilobase per million (rpkm)、miRNA の発現量は parts per million (ppm) でそれぞれ算出した。この散布図の作製に使用した mRNA は、発現量の平均値が 40 rpkm 以上、miRNA は 100 ppm 以上のものである。

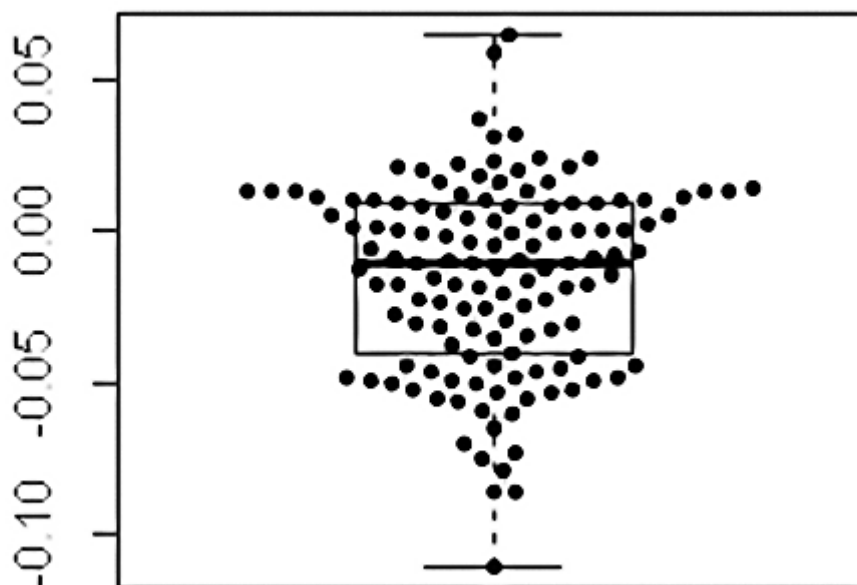


図 3. 特定の miRNA と mRNA の相関係数の平均値の分布

特定の miRNA と全ての mRNA の発現量の相関係数の平均値をプロットした 1 次元散布図およびそれを参考に作製した箱ひげ図。縦軸は相関係数の値を表している。1つのドットは、1種類の miRNA を表している。mRNA の発現量は、reads per kilobase per million (rpkm)、miRNA の発現量は parts per million (ppm) でそれぞれ算出した。この散布図の作製に使用した mRNA は、発現量の平均値が 40 rpkm 以上、miRNA は 100 ppm 以上のものである。

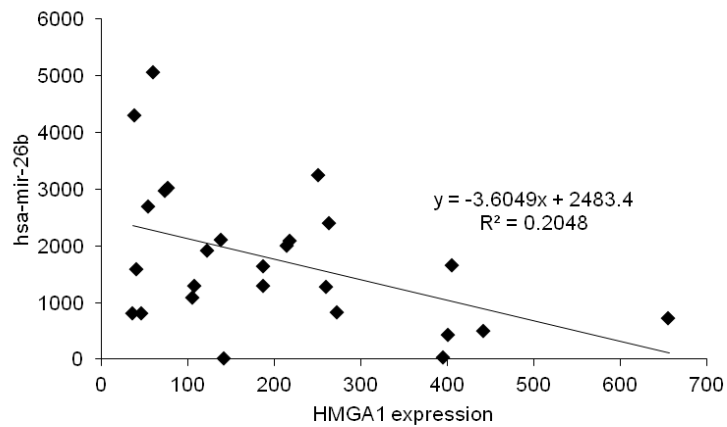
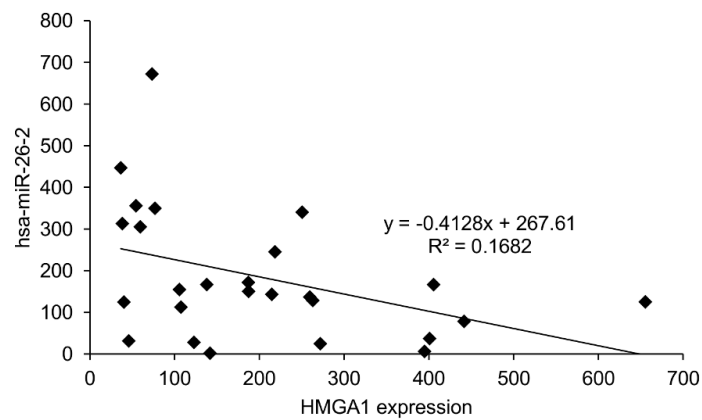
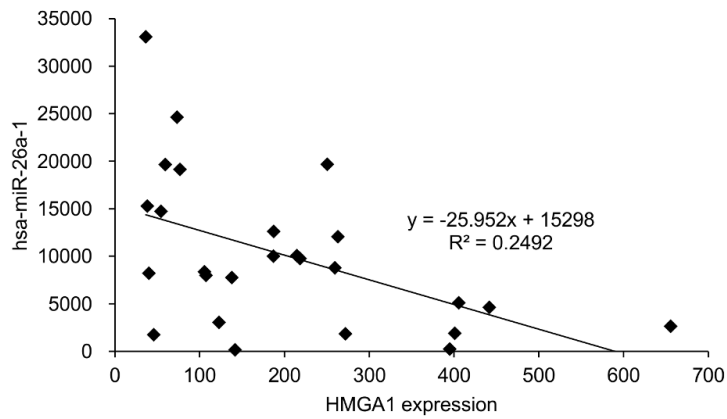


図 4. miR-26a と HMGA1 の発現量

26 種類のヒト肺腺がん由来細胞株における HMGA1 と miR-26a の発現量。横軸は HMGA1 発現量、縦軸は上のグラフから順に hsa-mir-26a-1、hsa-mir-26a-2、hsa-mir-26b の発現量を表している。詳細な発現量は表 4 参照。mRNA の発現量は、reads per kilobase per million (rpkm)、miRNA の発現量は parts per million (ppm) でそれぞれ算出した。

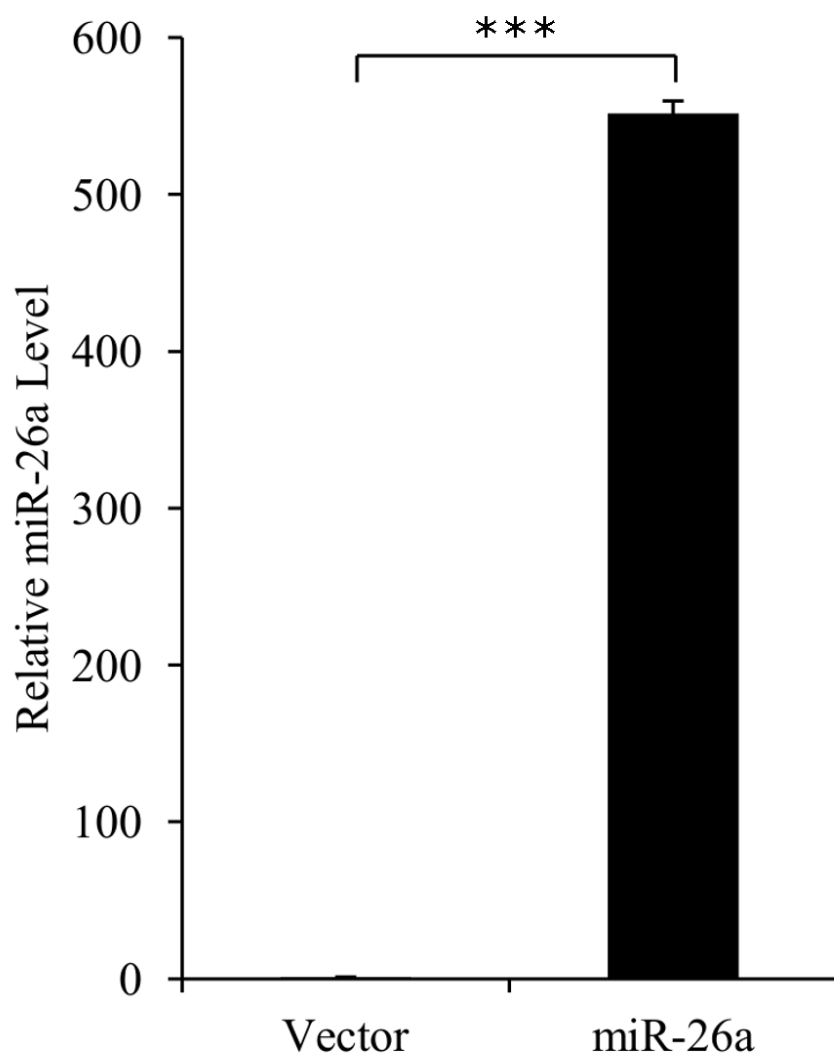


図 5. 細胞に miR-26a を過剰発現させた際の miR-26a 発現量
miR-26a 発現ベクターを H1299 細胞にトランスフェクションすることによっ
て、miR-26a の発現量が増加したことを定量 PCR によって示した
(***P <0.001)。

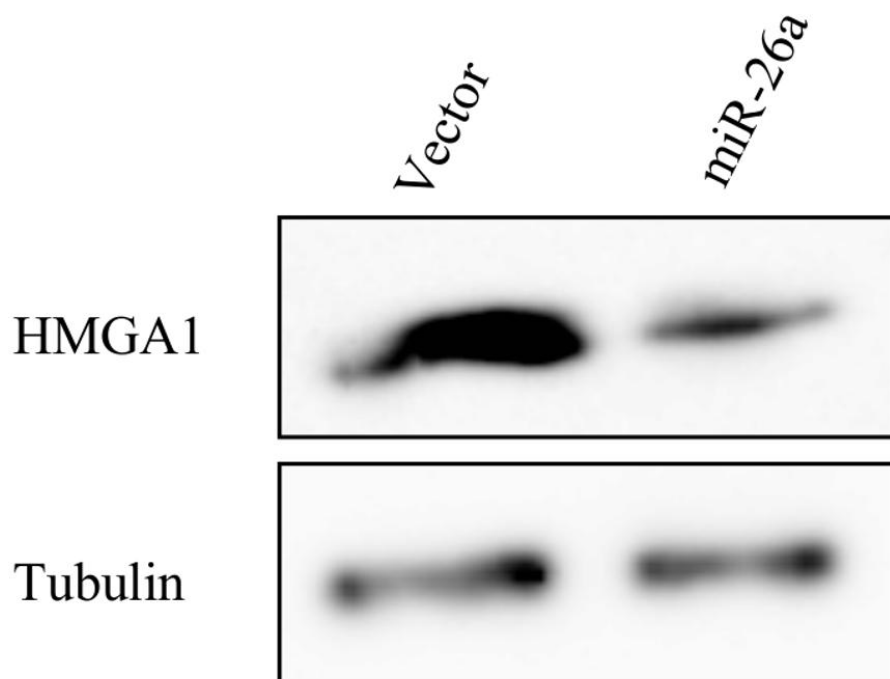


図 6. miR-26a を過剰発現させた際の HMGA1 タンパク質発現量
miR-26a 発現ベクターもしくはコントロールベクターを H1299 細胞にトランスフェクションした際の HMGA1 およびチューブリンタンパク質発現量(ウェスタンブロットによる解析)

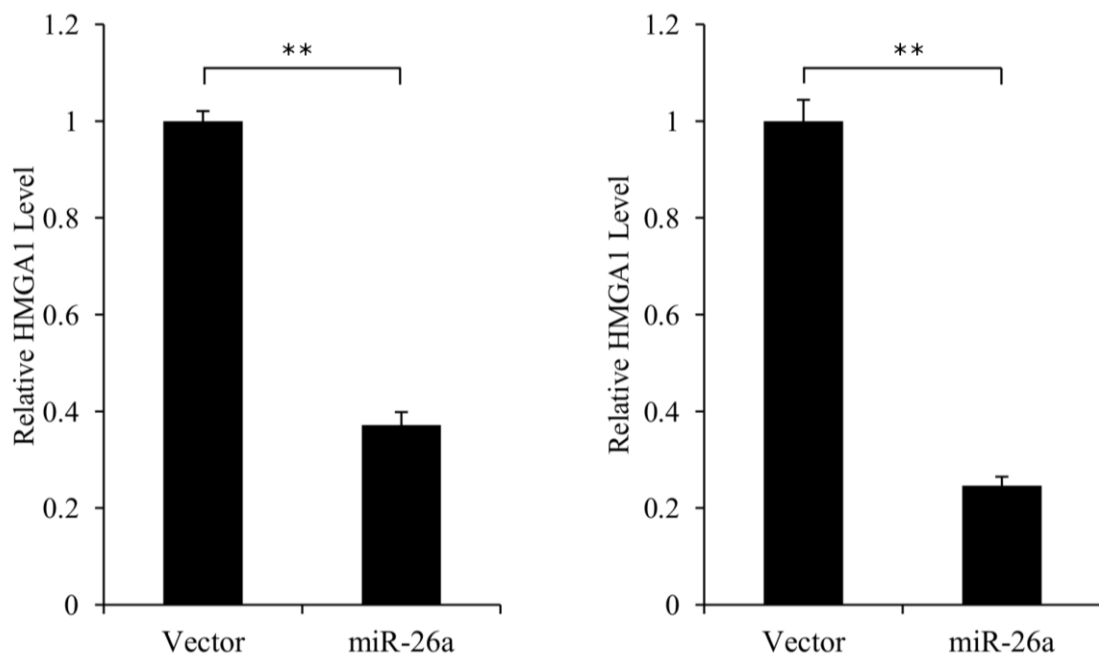


図 7. miR-26a を過剰発現させた際の HMGA1 mRNA 発現量

H1299 細胞に miR-26a 発現ベクターもしくはコントロールベクターをトランスフェクションした際の HMGA1 mRNA 発現量を定量 PCR によって解析した。左右の棒グラフでは、異なるプライマーペア(プライマーのシーケンス A(左)、B(右)は研究手法参照)を用いた(**P<0.01)。

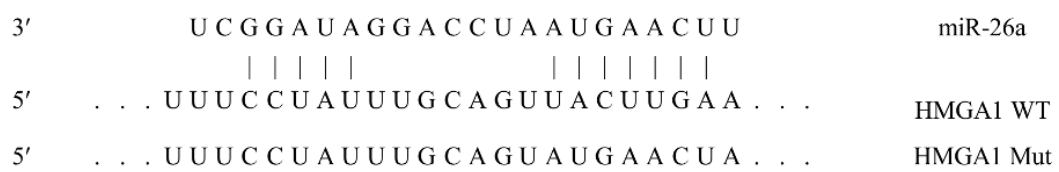


図 8. HMGA1 3' UTR と miR-26a の予測される結合様式

HMGA1 3' UTR と miR-26a のシーケンス。縦線で結んだ部分が相補的になっており、HMGA1 Mut では、下線部の部分の配列が HMGA1 WT と異なっている。

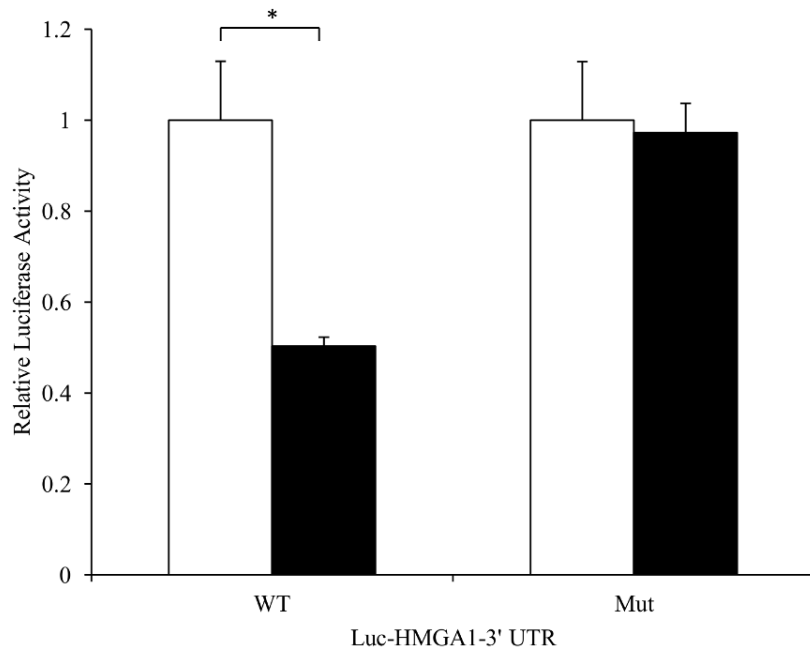


図 9. 細胞に miR-26a 発現ベクターをトランスフェクションした際のルシフェラーゼ活性変化

H1299 細胞に miR-26a 発現ベクター(黒棒グラフ)もしくはコントロールベクター(白棒グラフ)、Wild type もしくは Mutant ルシフェラーゼ発現ベクター、pRL-TK Renilla ルシフェラーゼ発現ベクターを同時にトランスフェクションした。細胞にベクターをトランスフェクションしてから 48 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。Renilla ルシフェラーゼ活性でノーマライズを行った (*P<0.05)。

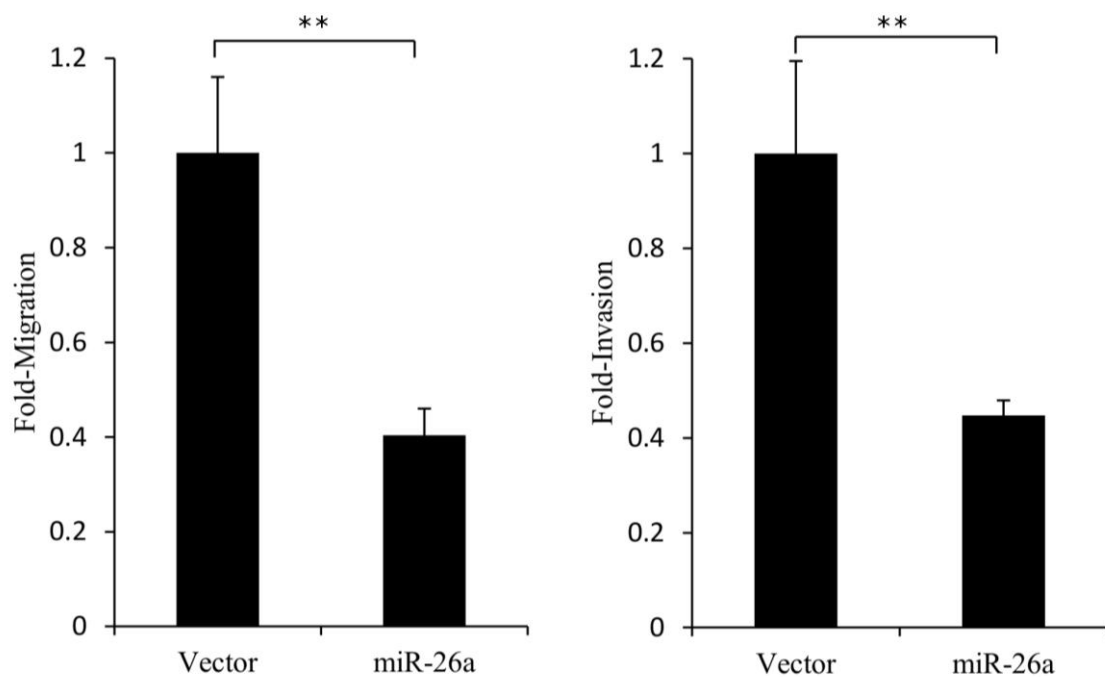


図 10. miR-26a を過剰発現させた場合の細胞の転移能、浸潤能の変化
 研究手法の項で記したとおりに migration assay(左棒グラフ)および invasion assay(右棒グラフ)を行った。H1299 細胞に miR-26a 発現ベクターもしくはコントロールベクターをトランスフェクションした際の細胞の転移、浸潤能を見た(**P<0.01)。

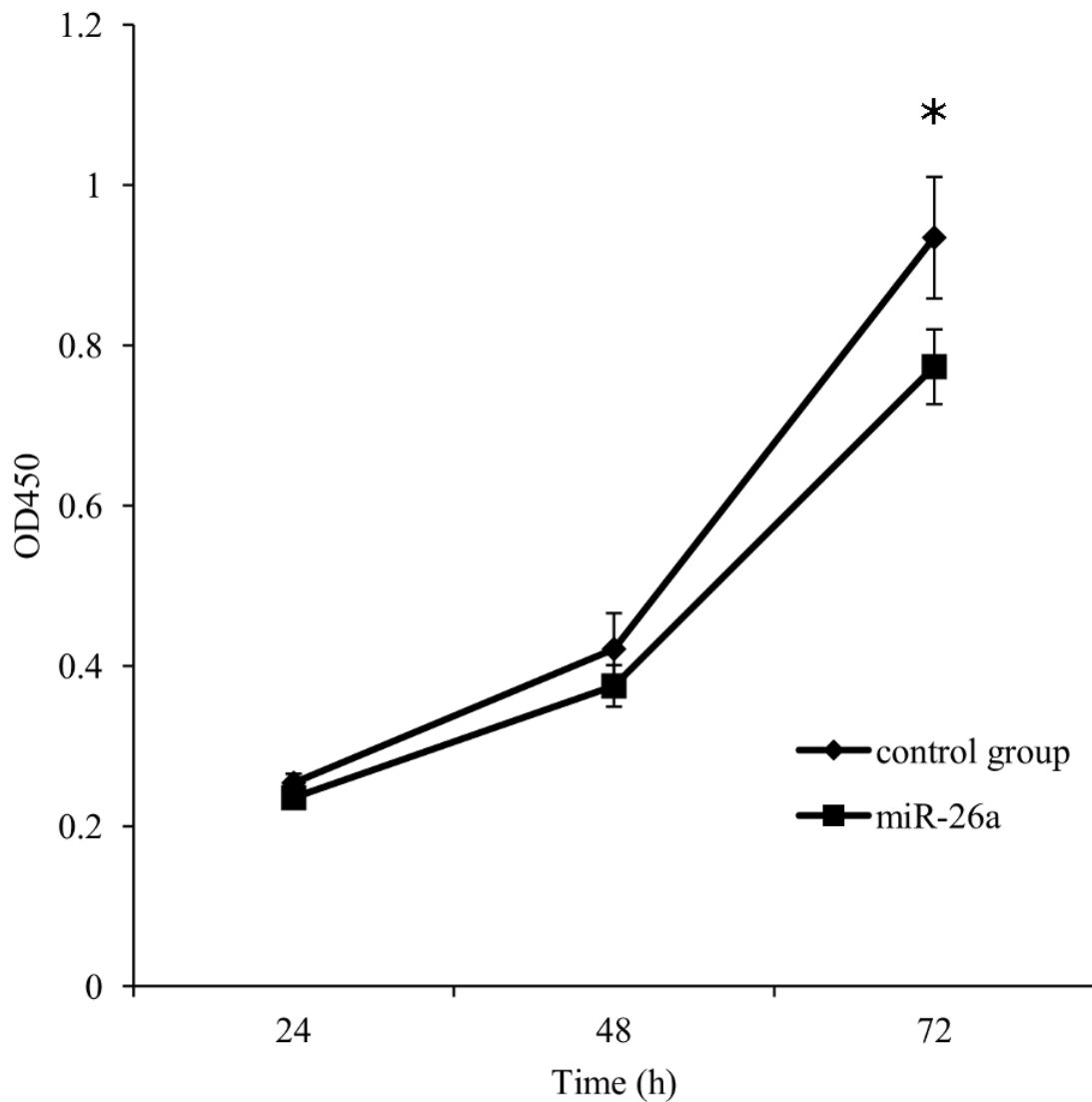


図 11. miR-26a を過剰発現させた際の細胞増殖速度の変化

研究手法の項で記したとおりに細胞増殖アッセイを行った。H1299 細胞を播き、miR-26a 発現ベクターもしくはコントロールベクターをトランスフェクションしてから 24、48、72 時間後に Cell Counting Kit 溶液を添加し、450 nm の吸光度の平均値±標準偏差の値をプロットすることで、生細胞数を計測した (*P<0.05)。

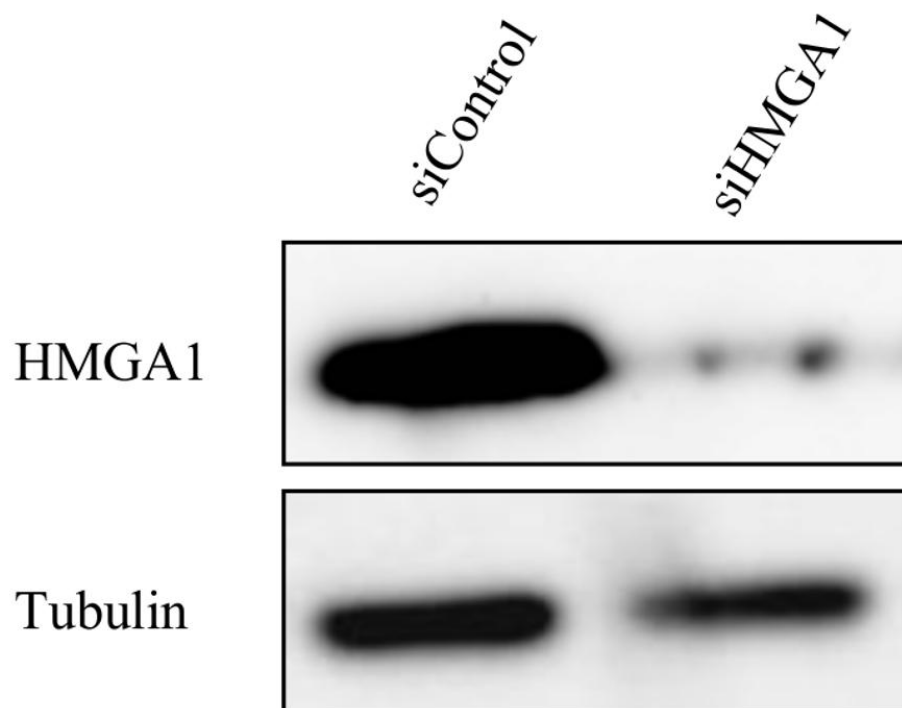


図 12. HMGA1 siRNA による HMGA1 ノックダウン

HMGA1 siRNA もしくはコントロール siRNA を H1299 細胞にトランスフェクションしてから 72 時間後に、HMGA1 とチューブリンのタンパク質量をウェスタンブロットで解析した。

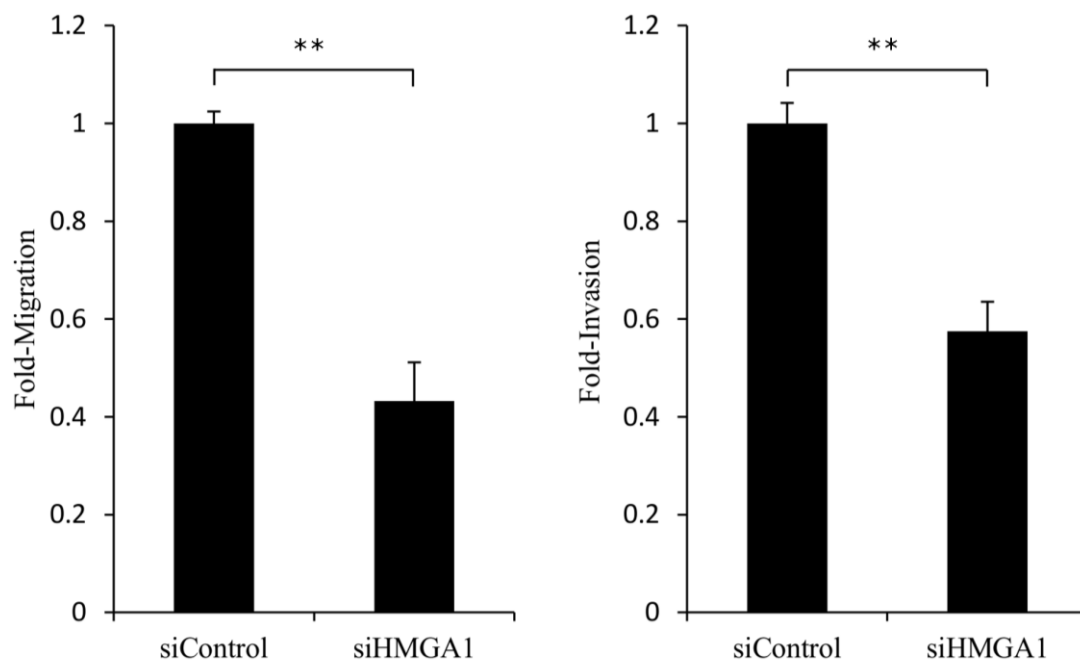


図 13. HMGA1 をノックダウンした際の細胞の転移能、浸潤能の変化
 研究手法の項で記したとおりに migration assay(左棒グラフ)および invasion assay(右棒グラフ)を行った。H1299 細胞に HMGA1 siRNA もしくはコントロール siRNA をトランスフェクションした際の細胞の転移、浸潤能を見た (**P<0.01)。

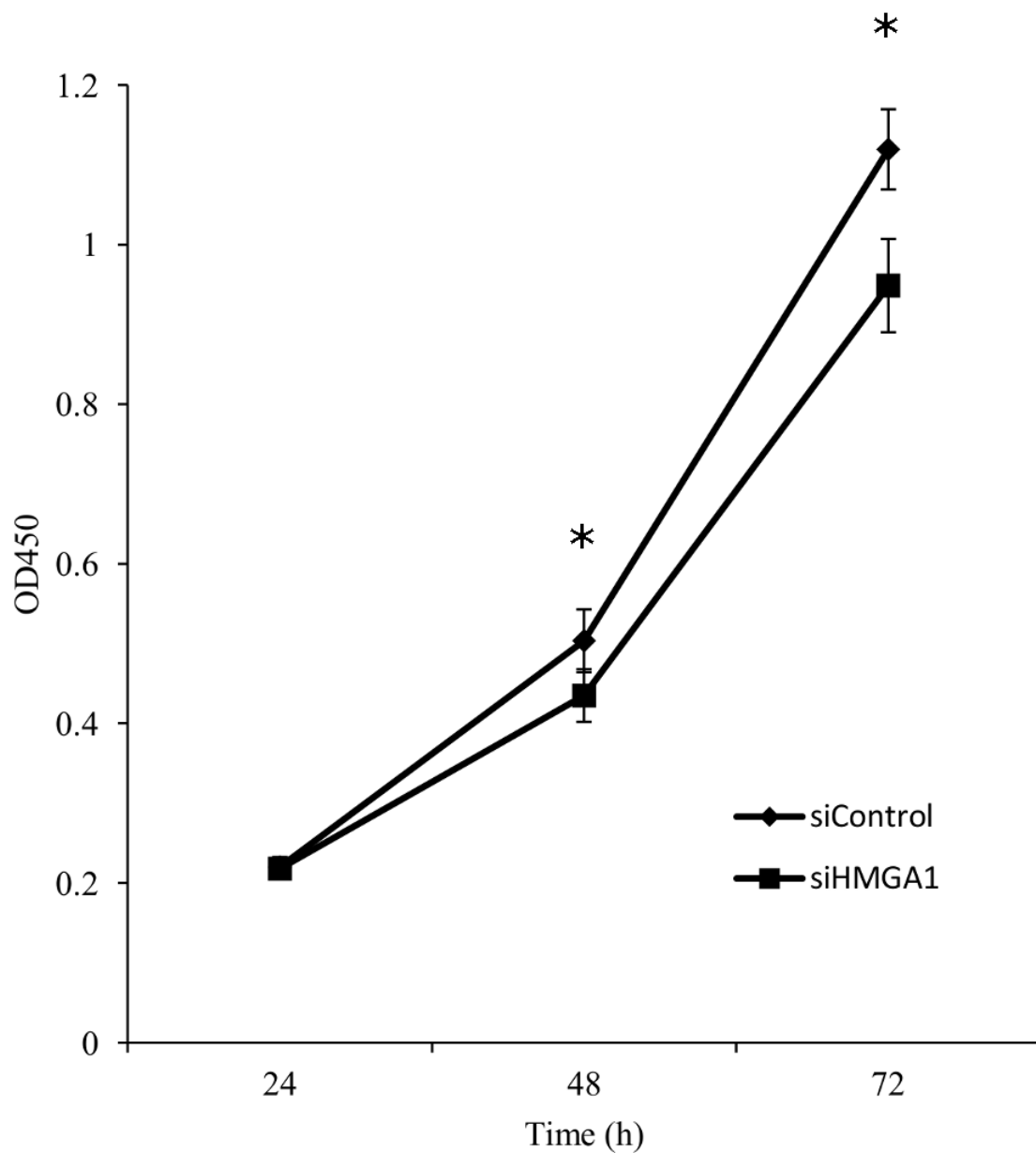


図 14. HMGA1 をノックダウンした際の細胞増殖速度の変化

研究手法の項で記したとおりに細胞増殖アッセイを行った。H1299 細胞を播き、HMGA1 siRNA もしくはコントロール siRNA をトランスフェクションしてから 24、48、72 時間後に Cell Counting Kit 溶液を添加し、450 nm の吸光度の平均値±標準偏差の値をプロットすることで、生細胞数を計測した(*P<0.05)。

表 1. 実験に使用した 26 種類の肺腺がん由来細胞株

Cell line	Distributor	Number
A427	ATCC	HTB-53
A549	ATCC	CCL-185
H322	ATCC	CRL-5806
H1299	ATCC	CRL-5803
H1437	ATCC	CRL-5872
H1648	ATCC	CRL-5882
H1650	ATCC	CRL-5883
H1703	ATCC	CRL-5889
H1819	ATCC	CRL-5897
H1975	ATCC	CRL-5908
H2126	ATCC	CCL-256
H2228	ATCC	CRL-5935
H2347	ATCC	CRL-5942
RERF-LC-Ad1	JCRB	JCRB1020
RERF-LC-Ad2	JCRB	JCRB1021
RERF-LC-MS	JCRB	JCRB0081
RERF-LC-OK	JCRB	JCRB0811
VMRC-LCD	JCRB	JCRB0814
ABC-1	JCRB	JCRB0815
PC-3	JCRB	JCRB0077
PC-9	RIKEN BRC	RCB4455
RERF-LC-KJ	RIKEN BRC	RCB1313
LC2/ad	RIKEN BRC	RCB0440
II-18	RIKEN BRC	RCB2093
PC-7	IBL	Upon request to us.
PC-14	IBL	Upon request to us.

ATCC, American Type Culture Collection. Refer to the ATCC webpage (<http://www.atcc.org/>); JCRB, Japanese Collection of Research Bioresources; RIKEN BRC, RIKEN Bio Resource Center; IBL, Immuno-Biological Laboratories.

表 2. mRNA 全体と発現の強い負の相関が見られた miRNA トップ 10

Ranking	miRNA	相関係数
1	hsa-mir-26a-1	-0.1105
2	hsa-mir-24-2	-0.0861
3	hsa-mir-210	-0.0859
4	hsa-mir-23b	-0.079
5	hsa-mir-320a	-0.0754
6	hsa-mir-24-1	-0.0728
7	hsa-mir-181b-2	-0.0705
8	hsa-mir-26b	-0.0654
9	hsa-mir-501	-0.0603
10	hsa-mir-98	-0.0588

上記「相関係数」とは、特定の miRNA と全ての mRNA 発現量の相関係数の平均値を表している。

表 3.hsa-mir-26a-1 と発現の強い負の相関を持つ遺伝子 TOP10

symbol	hsa-mir-26a-1 (相関係数)	hsa-mir-26a-2 (相関係数)	hsa-mir-26b (相関係数)
HMGA1	-0.4927	-0.3758	-0.4479
SRSF3	-0.4845	-0.364	-0.3273
PRDX3	-0.4844	-0.3977	-0.2189
COPS6	-0.4755	-0.3022	-0.2725
TMEM222	-0.472	-0.3032	-0.3651
MCL1	-0.4546	-0.4291	-0.4659
MAP2K2	-0.381	-0.2176	-0.3801
MATR3	-0.3426	-0.1367	-0.0594
EIF5A	-0.315	-0.1595	-0.1158
CKS2	-0.31	-0.1851	-0.1886

上記の遺伝子は全て miR-26a と配列の相補性が見られた。

表 4. 26 種類の肺腺がん由来細胞株における hsa-mir-26a-1、hsa-mir-26a-2、
hsa-mir-26b、HMGA1 の発現量

Cell line	HMGA1 (rpkm)	hsa-mir-26a-1 (ppm)	hsa-mir-26a-2 (ppm)	hsa-mir-26b (ppm)
LC2/ad	259.46	8783.11	136.66	1279.87
PC-9	214.6	10064.79	143.15	2007.12
PC-14	271.86	1839.67	24.69	821.56
RERF-LC-Ad1	187.24	12611.13	150.3	1638.22
RERF-LC-Ad2	36.35	33088.83	446.77	814.06
RERF-LC-KJ	40.06	8210.37	124.6	1598.97
PC-3	394.92	236.21	6.22	28.5
II-18	218.35	9760.12	245.16	2100.16
PC-7	141.68	150.08	1.88	15.46
RERF-LC-MS	59.37	19648.7	305.18	5066.08
RERF-LC-OK	54.3	14726.07	355.79	2702.36
VMRC-LCD	122.73	3042.91	27.86	1910.82
ABC-1	105.58	8365.73	154.68	1097.36
A549	137.85	7758.11	166.68	2116.85
H1650	38.17	15278.56	313.01	4296.95
A427	263.01	12057.88	128.49	2398.6
H322	76.69	19137.18	349.67	3024.76
H1437	107.39	7985.98	112.45	1302.17
H1648	250.44	19675.11	340.35	3244.76
H1975	186.94	10008	171.78	1296.33
H2126	45.77	1745.25	31.36	811.48
H1299	400.87	1896.35	37.03	425.56
H2228	655.55	2634.11	125.04	719.33
H2347	441.6	4622.47	78.27	505.63
H1703	405.61	5101.17	166.53	1654.8
H1819	73.21	24630.17	672	2981.72

rpkm, reads per kilobase per million; ppm, parts per million.