

論文の内容の要旨

論文題目 肺腺がんにおける miR-26a 機能解析

氏名 関本 登

<背景・目的>

我が国において、肺がんはがん死亡原因の第1位であり、その数は年々増えている。中でも、肺腺がんなどの非小細胞肺がんは全肺がんの約85%を占めている。医療技術の進歩などによって、肺がん患者の生存率は良くなってきているが、変わらず予後はよくない。そのような現状を改善するためには、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等が必要になると考えられる。新規の治療法を考案するためには、肺がんにおける分子内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、未だ完全には把握されておらず、未知の部分が多い。

microRNA(miRNA)は、21-25の塩基からなる non-coding small RNA で、標的となる転写産物の3' UTR と結合することによって、その標的の分解、もしくは遺伝子発現の制御を行う機能性核酸である。過去の多くの研究において、miRNA は様々な細胞の増殖、分化、アポトーシスとかが関わっているという報告がなされており、また種々のがんにおいて異常な miRNA 発現等が見られたという研究成果も多数存在する。加えて、miRNA ががんに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ことから、がん細胞における特定の miRNA の機能解析研究は、がん細胞内の分子間ネットワークの解明につながり、新しいがん治療法開発に貢献することができると考えられる。

私の所属する研究室では、過去に肺腺がん由来細胞株26種を用いた次世代シーケンサーによるマルチオミックス解析を行った。本研究では、そこで得られたトランスクリプトーム解析

の結果に加えて、新たに small RNA シーケンスの結果を用いることによって、肺腺がんにおいて、がんに関与する miRNA およびその標的 mRNA の探索を行った。

<研究内容>

次世代シーケンサーによって、肺腺がん由来細胞株26種において57,100種の転写産物および1,341種の small RNA の発現解析を行った。miRNA は標的 mRNA と結合し、その mRNA の翻訳を抑制、もしくは分解を促進する働きを持っているので、もし miRNA が標的 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。実際、mRNA と miRNA の発現量から算出した相関係数で作製したヒートマップを見ると、全体として負の相関を持つ mRNA-miRNA ペアの方が、正の相関を持つものよりも多いということが判明した。これは miRNA が mRNA 発現を負に制御していることに由来していると考えられる。そのため、解析した遺伝子のうち、発現の見られた全ての mRNA および miRNA の発現量の相関係数を算出し、その mRNA と miRNA の組み合わせの中でも、強い負の相関がみられたものをリストアップし、miRNA およびその標的 mRNA 候補を探してきた。その結果、hsa-mir-26a-1 という miRNA が、全ての miRNA の中で、最も mRNA と強い負の相関を持つ傾向があるということが分かった。また、その中でも HMGA1 という遺伝子が hsa-mir-26a-1 と最も強い負の相関を持っていることが分かった。HMGA1 は標的遺伝子のプロモーターもしくは

はエンハンサー配列の AT-rich region と結合し、クロマチン構造を変化させることによって、標的遺伝子の発現を制御する働きを持つタンパクである。多くのがんにおいて発現の増加が確認されており、がんの進行に関与しているとの報告もある。また、*hsa-mir-26-1* と同じ配列の mature miRNA にプロセシングされる *hsa-mir-26a-2* や *hsa-mir-26b* も同様に HMGA1 発現と強い負の相関を持つことが分かった。以上のことから、本研究では miR-26a は HMGA1 を標的としてがんの進行に関与している可能性が高いと考え、miR-26a と HMGA1 に注目して実験を進めた。

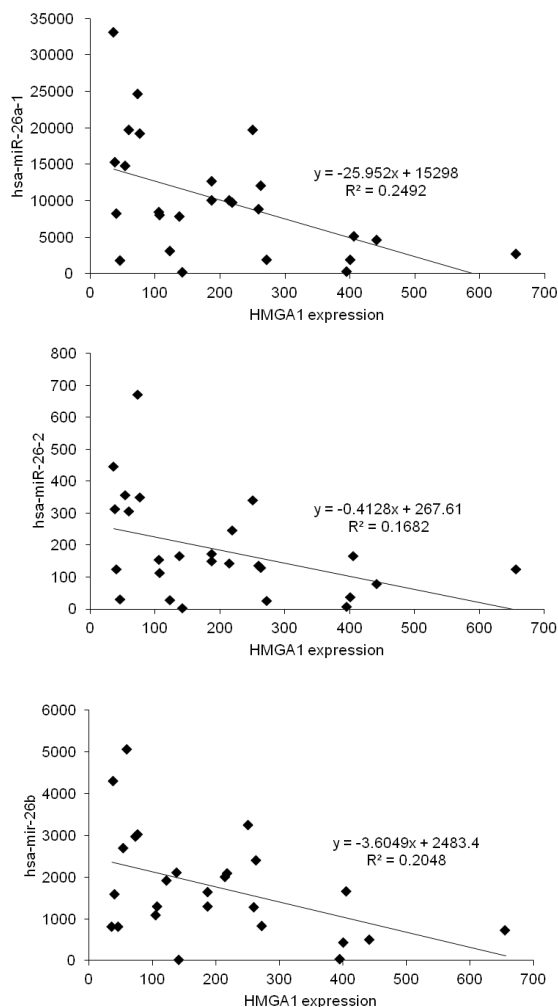


Figure1. 肺腺がん由来細胞 26 種における *hsa-mir-26a-1*、*hsa-mir-26a-2*、*hsa-mir-26b* と HMGA1 発現の相関

次世代シーケンサーによる解析の結果見つかった miR-26a と HMGA1 の負の相関が偶然に見られたものではなく、miR-26a が HMGA1 発現を抑制した結果起こったものだとすることを示すために、細胞に miR-26a を過剰発現させた際の HMGA1 発現の変化を確認した。実験には H1299 細胞を用いた。H1299 細胞では HMGA1 発現が他の細胞株と比べて高く、逆に miR-26a の発現は低い。miR-26a 発現ベクターを H1299 細胞にトランスフェクトすることによって、miR-26a の発現量を 500 倍以上に増幅することができた。また、その際の HMGA1 発現をウェスタンブロットによって確認したところ、HMGA1 の発現量は miR-26a の過剰発現によって著しく減少していた。

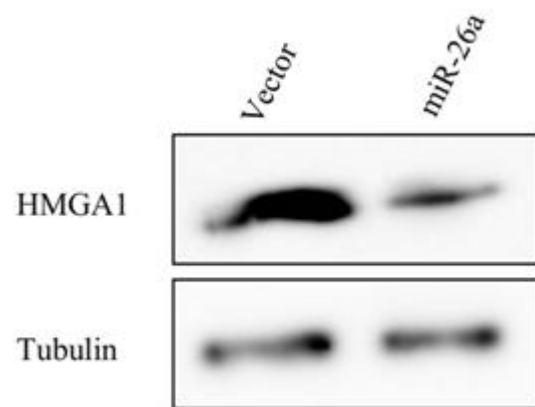


Figure2. miR-26a 過剰発現時のウェスタンブロット結果

続けて、リアルタイム PCR 法を用いることによって、miR-26a が過剰発現している際の HMGA1 mRNA 量を計測した。もし、miR-26a が HMGA1 mRNA の分解を促進していた場合、miR-26a 発現の増加に伴い HMGA1 mRNA 量は減少すると考えられる。その結果、下図に示す通り、HMGA1 mRNA 量は miR-26a 過剰発現時に、平常時と比べて約 3 分の 1 にまで減少していた。左右の 2 種類のグラフでは、それぞれ異なるプライマーセットを用いた。

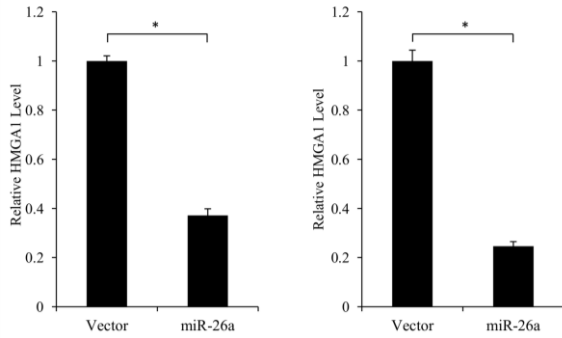


Figure3. miR-26a 過剰発現時のリアルタイム PCR 結果

加えて、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果からも、miR-26a が HMGA1 発現を抑制するということがわかった。以上のことから、miR-26a は HMGA1 mRNA 分解を伴い、HMGA1 発現量を制御しているということがわかった。

続いて、細胞における miR-26a の機能解析実験を行った。miR-26a を H1299 細胞に過剰発現させた際の、細胞のフェノタイプの変化を見た。miR-26a 発現ベクターを細胞にトランスフェクトした際に、cell migration assay および cell invasion assay を行い、miR-26a の細胞の転移・浸潤能に対する影響を見た。その結果、miR-26a 過剰発現の状態では、移動細胞数が両アッセイで共にコントロールグループと比べて半分以下に減少していたことから、miR-26a は細胞の転移・浸潤能を抑制する働きを持つということがわかった。

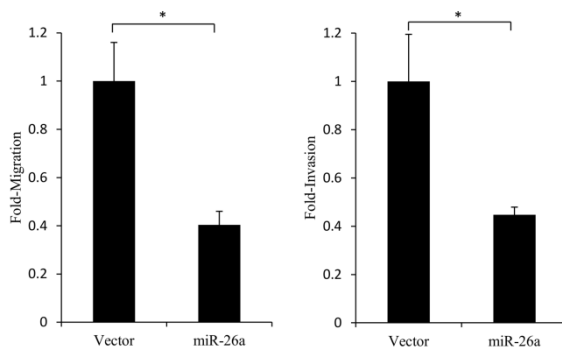


Figure4. miR-26a 過剰発現時の Migration assay と Invasion assay 結果

miR-26a を過剰発現させた際の細胞増殖速度を計測することによって、miR-26a の細胞増殖に対する働きを確認した。コントロールグループと miR-26a 過剰発現グループとで分けて、細胞を播いてから 24 時間後、48 時間後、72 時間後でそれぞれ細胞数を計測した。その結果、miR-26a を過剰発現させたグループでは、コントロールグループと比較して、細胞増殖速度の減少が確認された。

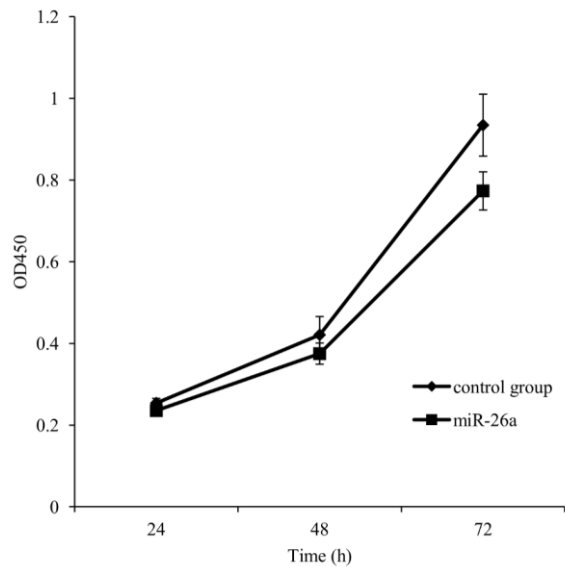


Figure5. miR-26a 過剰発現時の細胞数変化

以上の実験結果から、miR-26a は細胞の転移・浸潤能を抑制し、また細胞増殖を制御する働きを持つということがわかった。

続いて、HMGA1 発現量の変化に対する細胞のフェノタイプの変化の確認を行った。まず、invasion assay および migration assay を用いて、HMGA1 をノックダウンした際の細胞の転移・浸潤能を測定した。その結果、両アッセイにおいて、HMGA1 をノックダウンした細胞グループでは、コントロールグループと比べて、移動細胞数に減少が見られた。このことから、肺腺がん細胞株において、HMGA1 は細胞の転移・浸潤能を促進する働きを持つということが分かった。

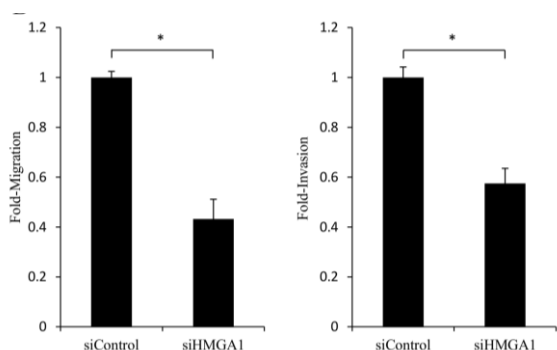


Figure6. HMGA1 をノックダウンした際の Migration assay および Invasion assay 結果

HMGA1 をノックダウンした際の、細胞の増殖速度を計測することで、HMGA1 の細胞増殖に対する影響を検討した。HMGA1 をノックダウンした細胞群およびコントロール細胞群の2種類を用意して、細胞を播いてから24時間、48時間、72時間後にそれぞれ細胞数を計測した。その結果、HMGA1 をノックダウンした細胞グループでは細胞増殖速度に減少が見られた。

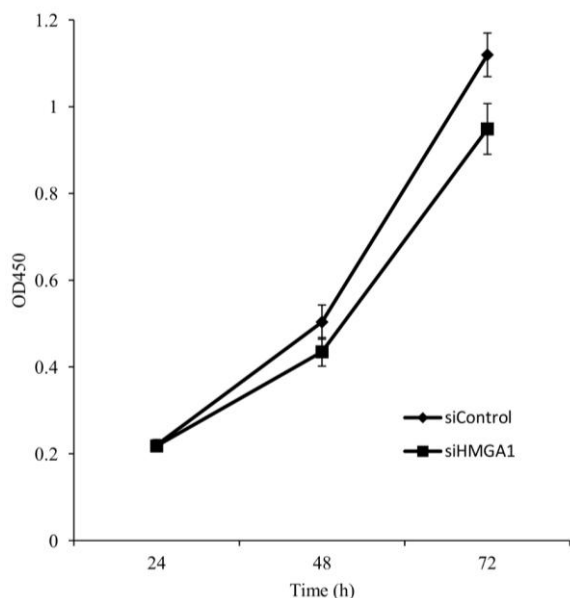


Figure7. HMGA1 ノックダウン時の細胞数変化

以上の結果から、肺腺がん細胞において、HMGA1 は細胞の転移・浸潤能を促進し、細胞数増殖を促進する働きを持つということがわかった。

<考察>

以上の結果から、肺腺がんにおいて、miR-26a は HMGA1 選択的に発現を抑制することによって細胞の転移・浸潤・増殖能を制御しているということがわかった。過去の研究で、肺がんにおいて PTEN と EZH2 という2つの miR-26a の標的遺伝子が報告されている。本研究においても、次世代シーケンサーの解析結果を分析し、それら遺伝子と miR-26a の発現には相関関係が見られるかどうかを確認した。その結果、miR-26a と PTEN には発現量の相関が全く見られなかったが、EZH2 とは強い負の相関が確認された。しかし、これら2種類の遺伝子は H1299 細胞を始め、26種類の肺腺がん由来細胞において、発現量が HMGA1 よりはるかに小さく、(EZH2 で10倍以上、PTEN で50倍以上の差が見られた) それら遺伝子の影響は少ないと考えられた。また、肺がんにおいて HMGA1 の発現が増加しているという報告と hsa-miR-26a-1 の発現が減少しているという報告が過去に別々にされている。本研究結果はそれら報告と矛盾せず、また、そのような発現傾向は miR-26a が HMGA1 発現を抑制しているから起こっているという解釈もできる。肺がんにおいて HMGA1 発現が高く、miR-26a 発現が低いという傾向が共通して見られるということは、それら遺伝子のがんの進行に及ぼす影響も多大であると推測できる。

本研究成果によって、肺腺がん細胞内の分子間ネットワークの解明に貢献することができたと考えられる。また、将来的には、miR-26 を標的とした新たな治療法の開発なども考えられる。