

論文内容要旨

miR-182 and miR-183 Promote Cell Proliferation and Invasion by Targeting FOXO1 in Mesothelioma

(悪性中皮腫における miR-182、miR-183 および
標的遺伝子 FOXO1 の機能解析)

Frontiers in Oncology, 8:446, 2018.

主指導教員：武島 幸男教授

(医系科学研究科 病理学)

副指導教員：安井 弥教授

(医系科学研究科 分子病理学)

副指導教員：有廣 光司教授

(広島大学病院 病理診断学)

鈴木 瑠偉

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景・目的】

悪性中皮腫（以下中皮腫）は代表的なアスベスト関連疾患である。日本では過去の大量のアスベストの輸入および使用を背景とし、現在中皮腫の発生数は増加傾向にあり、少なくとも 2020 年代までは高い水準になると考えられている。また中皮腫は早期診断が困難であること、十分に効果的な治療法が確立していないことなどから予後の悪い悪性腫瘍としても知られている。現在進行期中皮腫に対する治療としてシスプラチンとペメトレキセドの併用療法が一般的であるが、十分な治療効果を有するとは言えず、新規の治療法の確立が求められている。

一方 microRNA は 19 から 24 塩基長の短鎖 RNA であり、標的とする mRNA の 3' 非翻訳領域と不完全に結合し、その発現を抑制する生体内分子である。microRNA は標的遺伝子の発現抑制を介して細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、分化など様々な重要な生物学的機構を調整している。そのため一部の microRNA はがん促進的、あるいはがん抑制的に働くということが知られている。

本研究室での過去の研究で、中皮腫における microRNA の発現を網羅的に解析している。その結果、一部の microRNA は非腫瘍性の中皮組織と比較し、中皮腫細胞株において有意に発現が上昇、あるいは低下していた。その中でも特に発現が上昇していた microRNA として miR-182 および miR-183 が同定されていたが、その詳細な機能についてはまだ不明であった。そこで本研究ではこれらの microRNA の中皮腫における機能解析を目的とした。

【方法・材料】

30 例の中皮腫症例のパラフィン包埋組織からティッシュマイクロアレイを作成し、miR-182 および miR-183 に対するプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、発現状態の検討をした。ポジティブコントロールとして U6 を、ネガティブコントロールとして Scramble miRNA を用いた。

機能解析は 2 種類の中皮腫細胞株、ACC-MESO1 および CRL-5915 を用いて検討した。これらの細胞株に対し、ネガティブコントロールのインヒビターを導入した群、miR-182 に対するインヒビターを導入した群、miR-183 に対するインヒビターを導入した群、両者のインヒビターを同時に導入した群のそれぞれ 4 つのサブタイプを作成した。細胞増殖、接着アッセイは細胞の内在性の ATP 活性を利用して間接的に生細胞数を測定した。浸潤アッセイにはマトリゲルを含むカルチャーインサートを用いて、蛍光顕微鏡で浸潤細胞数を測定した。また細胞の遊走能は Wound Scratch アッセイによって検討した。

標的遺伝子の候補は解析ツール TarBase v7.0 によって抽出した。RT-qPCR はサイバークリーン法で行った。RT-qPCR、ウェスタンブロットにおいてコントロールとして GAPDH を用いていた。

【結果】

まず miR-182 および miR-183 に対するプローブを用いて in situ ハイブリダイゼーションを行い、ヒト中皮腫組織におけるこれらの microRNA の発現を確認した。その結果、上皮型中皮腫、肉腫型中皮腫いずれの組織型においても、ヒト中皮腫組織でこれらの microRNA が強く発現しているということが明らかになった。

また miR-182 あるいは miR-183 に対するインヒビターを導入すると中皮腫細胞の増殖、浸潤、遊走および接着が抑えられるということが示された。細胞増殖、遊走については両者の microRNA に対するインヒビターを同時に導入することにより最も強く抑制されるということも示された。

さらに本研究ではこれらの microRNA の標的遺伝子についても検討を行った。データベース上の microRNA 標的遺伝子解析ツールで解析を行なった結果、いくつかの遺伝子が両者に共通の標的遺伝子の候補として抽出された。その中でも中皮腫細胞において発現が低下していて、がん抑制的に機能すると知られている FOXO1 に着目した。

RT-PCR およびウエスタンブロットによる解析の結果、miR-182 や miR-183 を抑制すると中皮腫細胞株における FOXO1 の発現が、それぞれ mRNA レベル、タンパク質レベルで増加するということが明らかになった。

そこで FOXO1 が機能的に重要な標的遺伝子であるか否かを調べるために、FOXO1 の siRNA を用いた実験を行なった。その結果、FOXO1 の発現を siRNA の導入により抑制すると、miR-182 や miR-183 に対するインヒビターの導入によって低下した中皮腫細胞株の増殖能、浸潤能が再び高い状態に戻るとことが示された。また FOXO1 の下流シグナルとして代表的な p21、p27 についてもその発現状態をウエスタンブロットにより確認し、これらの発現が miR-182 や miR-183 の抑制により増加することを示した。

【考察】

miR-182 や miR-183 を抑制することで中皮腫細胞株の進展が抑えられることから、これらの microRNA が中皮腫の進展を促していると考えられる。またこれらの microRNA の標的遺伝子として同定された FOXO1 を siRNA により抑制することで、miR-182 や miR-183 の抑制により低下した中皮腫細胞の増殖、浸潤が再び高まることから、FOXO1 は機能的に重要な標的遺伝子であることが示唆される。また miR-182 や miR-183 を抑制すると FOXO1 と同様に p21、p27 も発現が増加することから、これらが FOXO1 の下流シグナルとして働いていることが示唆される。これらの miR-182/183-FOXO1 経路は中皮腫細胞の進展と密接に関連していると考えられるため、今後中皮腫に対する新規治療法のターゲットとなる可能性があることが示された。