

## 新規老化関連 microRNA である miR-3140-3p は悪性胸膜中皮腫を抑制する

平成 28 年度入学 細胞分子生物学研究室 山本 佑樹

主指導教員 田原 栄俊

### 【研究背景】

正常細胞は、一定回数細胞分裂を繰り返すと不可逆的に増殖を停止し、細胞老化を引き起こす [L., Hayflick *et al. Exptl. Cell Res.*, (1961)]. また、がん遺伝子 Ras などの活性化に代表される過剰なストレスも、細胞に不可逆的な増殖停止を引き起こすことが分かっている [Serrano, S. *et al Cell*, (1997)]. このため、細胞老化は正常細胞が持つがん化に対する防御機構の一つとして考えられている。我々は細胞老化の誘導因子として、マイクロ RNA (miRNA) に注目し研究を行なっている。miRNA は、ゲノムから転写される small non-coding RNA で、ヒトでは約 3000 種類同定されている。1 種類の miRNA は 100 種類以上の遺伝子を標的とし、標的 mRNA の分解や翻訳抑制を介してタンパク質の発現を負に制御する。そのため、miRNA の発現変動は、細胞増殖や細胞死、細胞老化など様々な生命現象に関わる。一部の miRNA は細胞老化に伴い発現量が増加することが知られており、このような miRNA を老化関連 miRNA (Senescence-Associated microRNA; SA-miRNA) と呼ぶ。また、一部の SA-miRNA の発現量はがん細胞で減少していることが知られており、我々は SA-miRNA の発現量を補充することで、がん細胞の老化プログラムを再起動させ、腫瘍を抑制しようと考えている。これまでの研究により、miR-22 を SA-miRNA として同定しており、CDK6 や SIRT1 の発現抑制を介して乳がん・子宮頸がん細胞に抗腫瘍効果を示すことを報告している。

### 【研究目的】

本研究では、がん幹細胞や抗がん剤耐性がん細胞など多様ながん細胞に増殖抑制効果を示す SA-miRNA を同定することを目的とする。さらに、同定した SA-miRNA から臨床応用可能な核酸医薬シーズを見出し、その腫瘍抑制メカニズムについて明らかにする。最終的に、SA-miRNA を抗腫瘍核酸医薬としてがん治療へと臨床応用することを目指す。

### 【研究方法】

1. 細胞老化を評価する機能的スクリーニング系を構築する。
2. 2028 種類からなる miRNA library を正常線維芽細胞にトランスフェクションし、構築したスクリーニング系を用いて、細胞老化の表現型を示す SA-miRNA を網羅的に同定する。
3. がん細胞の生存率を指標にスクリーニングを行い、強い増殖を抑制する SA-miRNA を同定する。
4. 同定した SA-miRNA について、*in vivo* での腫瘍抑制効果の評価、標的遺伝子の解析を行う。

### 【実験結果】

#### 1. 強い増殖抑制効果を示す SA-miRNA の同定

細胞老化の表現型である細胞の増殖停止と扁平肥大化を細胞数と細胞の大きさにより評価する、新たな老化スクリーニング系を構築した。このスクリーニング系を用いて、以前当研究室で報告した miR-22 よりも強く老化表現型を示した miRNA を SA-miRNA 候補として 579 種類同定した。次にこれら SA-miRNA 候補について、細胞老化マーカーとして広く用いられる SA- $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を評価し、349 種類の SA-miRNA を同定した。続いて、これら 349 種類の SA-miRNA ががん細胞に与える影響を検討するため、7 種のがん細胞株を用いて細胞生存率を評価した。その結果、7 種全てのがん細胞株に対して有意に増殖抑制効果を示す SA-miRNA を 2 種類同定した。その中でも、より強い腫瘍抑制効果を示した miR-3140-3p について解析を進めた。

#### 2. 悪性胸膜中皮腫に対する miR-3140-3p の腫瘍抑制効果

抗がん核酸医薬として miR-3140-3p を開発していく上で、本研究では数あるがん種から悪性胸膜中皮腫に着目した。悪性胸膜中皮腫は胸腔内に発生する腫瘍であり、外科的手術による切除が困難かつ有効な薬剤も乏しいことから、非常に難治である。さらに、悪性胸膜中皮腫は発症までの期間が非常に長く、今後の患

者数増加が懸念される[Murayama, T. *et al*, *Am. J. Ind. Med.* (2006)]。以上のことから、悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍薬を開発することは臨床上非常に意義があると考えられ、miR-3140-3p を悪性胸膜中皮腫に対する抗がん核酸医薬として応用していくことを目指した。まず、悪性胸膜中皮腫における miR-3140-3p の発現量を解析した。臨床検体を用いた検討により、非がん組織と比較して悪性胸膜中皮腫において miR-3140-3p の発現量が低下していた。次に、*in vivo* における miR-3140-3p の腫瘍抑制効果を検討した。その結果、悪性胸膜中皮腫細胞をマウス胸腔内に移植したゼノグラフトマウスモデルにおいて、miR-3140-3p は腫瘍増殖を顕著に抑制し、マウスの生存率を向上させた。これらのことから、miR-3140-3p の発現を補充することで悪性胸膜中皮腫の腫瘍増大を抑制することが示唆された。

### 3. miR-3140-3p の標的遺伝子探索

標的遺伝子候補の絞り込みにはマイクロアレイ解析および *in silico* 解析を用いた。まずマイクロアレイ解析の結果から、miR-3140-3p によって TIG-3 細胞および悪性胸膜中皮腫細胞株 EHME5-10, MSTO-211H, Meso-9 において共通して発現が低下した遺伝子かつ TIG-3 細胞において十分に発現している遺伝子を絞り込んだ。さらに *in silico* 解析により miR-3140-3p の標的遺伝子であると予測された遺伝子を絞り込み、20 種類の遺伝子を標的遺伝子候補として同定した。これら 20 遺伝子に対する siRNA を用いて、再度老化スクリーニングおよびがん細胞の生存率の評価を行なった。その結果、miR-3140-3p の標的遺伝子候補として、ASF1B, PRC1, SGO1 が同定された。さらに、同定された標的遺伝子の悪性胸膜中皮腫での発現量を qPCR により解析した。その結果、ASF1B が悪性胸膜中皮腫で発現量が低下しており、miR-3140-3p の発現量と逆相関していた。以上のことから、miR-3140-3p は ASF1B を標的とすることで細胞老化誘導および悪性胸膜中皮腫の抑制に寄与することが示唆された。

#### 【総括】

本研究では、強い抗腫瘍効果を示す SA-miRNA を同定するため、まず老化表現型を指標としたハイコンテントスクリーニングを行なった。その結果、miR-22 よりも強く老化表現型を示した SA-miRNA を 349 種類同定した。さらに、様々ながん細胞に対して増殖抑制効果を評価し、いずれのがん細胞に対しても強い抗腫瘍効果を示す miRNA として miR-3140-3p と miR-657-3p を同定した。その中でも本研究では、より強く細胞増殖を抑制した miR-3140-3p に着目し、悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍核酸医薬として応用しようと試みた。その結果、miR-3140-3p は悪性胸膜中皮腫で発現が低下しており、miR-3140-3p 発現の補充は、悪性胸膜中皮腫の腫瘍増大を抑制することが示された。また、標的遺伝子解析の結果、miR-3140-3p は ASF1B を標的とすることで、正常細胞に細胞老化を誘導し、悪性胸膜中皮腫の細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

以上のことから、miR-3140-3p は悪性胸膜中皮腫に対する抗がん核酸医薬としての応用が期待される。現在はラットおよびサルを用いた非臨床試験を実施しており、今後臨床治験を進めていくことで、miRNA 型抗がん核酸医薬を用いた悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法を確立したい。