

論文内容要旨

Downregulation of lncRNA *PVT1* inhibits proliferation and migration of mesothelioma cells by targeting *FOXM1*

(lncRNA *PVT1* のダウンレギュレーションは、*FOXM1* を標的として中皮腫細胞の増殖と遊走を抑制する)

Oncol Rep. 2022 Feb;47(2):27. in press

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：宮内睦美教授

(医系科学研究科 口腔顔面病理病態学)

副指導教員：AMATYA VISHWA JEET 講師

(医系科学研究科 病理学)

藤井 祐太郎

(医系科学研究科 博士課程)

はじめに

悪性中皮腫は職業性あるいは環境的なアスベスト曝露と関連が強い悪性腫瘍であり、その多くは予後不良である。発生数は増加傾向にあるが、中皮腫の発生・進展メカニズムは未だ十分にはわかっていない。long non-coding RNA (lncRNA)とは、タンパク質に翻訳されないRNAのうち200ヌクレオチドよりも長いものの総称である。lncRNAの一部は細胞増殖などに関与する遺伝子発現の調節を介して、細胞の分化や発がん、免疫などに関与することが知られている。lncRNA PVT1は様々ながんで発現が亢進しており、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の発現を調節することで腫瘍形成を引き起こすことが知られている。中皮腫でも高発現を示すことは報告されているが、その発現意義は未だ十分に解明されていない。我々は中皮腫細胞におけるlncRNA PVT1の機能の解明を目的とした。

対象と方法

はじめに、ヒトがん細胞株の遺伝子発現データをまとめたものである、CCLEプロジェクトのデータセットを用いて、中皮腫細胞株でのlncRNA PVT1発現を調べた。次に、4種の中皮腫細胞株(ACC-MES01、ACC-MES04、CRL-5915、CRL-5946)を用いて機能解析を行なった。リアルタイムRT-PCRを行い、中皮腫細胞株でのlncRNA PVT1の発現を確認した。次に、これらの細胞株にPVT1 siRNAをトランスフェクションしてlncRNA PVT1をノックダウンした細胞群を準備し、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細胞群との比較実験を行なった。細胞増殖アッセイは、Cell Titer-Glo 2.0 試薬を用いて培養細胞に由来するATPを24時間おきに測定した。細胞周期アッセイは、ヨウ化プロピジウムを含むGuava Cell Cycle Reagentを用いて細胞のDNAを標識することにより識別した。遊走アッセイは、細胞培養プレート上に細胞を除去したギャップエリアを作成し、この領域の減少の様子を、面積を調べることにより測定した。細胞浸潤アッセイは、マトリゲルでコーティングした8 μ mの孔を有するカルチャーインサート内に細胞を培養し、一定時間後に浸潤した細胞のみをHoechst 33324で染色した。蛍光顕微鏡像を撮影し、画像内の染色された細胞の数をCellProfiler cell imaging softwareを用いて数えた。さらに、他の悪性腫瘍において、lncRNA PVT1のターゲットとして報告のあるFOXM1の発現の変化を、リアルタイムRT-PCRとWestern Botを行い調べた。また、lncRNAとFOXM1の関係を詳しく調べるために、PVT1 siRNAのみ、FOXM1 siRNAのみ、PVT1 siRNAとFOXM1 siRNAの両方、ネガティブコントロール siRNAをそれぞれトランスフェクションし、4種類の細胞群を準備した。これらの細胞群において増殖アッセイ、リアルタイムRT-PCR、Western Botを行い、増殖能の変化、FOXM1の発現の変化を調べた。

結果と考察

遺伝子発現データの解析の結果、lncRNA PVT1は様々な悪性腫瘍で発現が高く、悪性中皮腫では特に発現が高いことがわかった。また、リアルタイムRT-PCRの結果、中皮腫細胞株において、lncRNA PVT1は肺腺癌細胞株より高発現であることがわかった。増殖アッセイの結果、lncRNA

PVT1 の発現を抑制すると中皮腫細胞株の増殖能が有意に減少した。また、細胞周期圧政の結果、細胞周期の G1 期の細胞の割合が有意に減少し、G2/M 期の細胞の割合が有意に増加した。さらに遊走アッセイでは、遊走能が有意に減少したが、浸潤アッセイでは浸潤能とは有意な関連は見られなかった。リアルタイム RT-PCR と Western Blot により FOXM1 の発現が抑制されることもわかった。FOXM1 siRNA をトランスフェクションすると、PVT1 siRNA をトランスフェクションした細胞株と同様に増殖が抑制され、PVT1 siRNA と FOXM1 siRNA を両方同時にトランスフェクションすると、さらに増殖が抑制された。PVT1 siRNA と FOXM1 siRNA を両方同時にトランスフェクションすると、FOXM1 の発現が PVT1 siRNA のみをトランスフェクションした細胞群よりも低下したが、その発現は FOXM1 siRNA のみをトランスフェクションした細胞群での FOXM1 の発現と同程度であった。

FOXM1 は、細胞の生存率に関連しており、発がん経路の重要な遺伝子と考えられている。これまでの研究では、FOXM1 は様々ながんで高発現であることが報告されており、薬剤耐性、発がん、がんの転移に関与していることが指摘されている。また、卵巣がんや胃がんでは lncRNA PVT1 との相互作用により腫瘍の進展を促進すると報告されている。我々は、中皮腫細胞株における PVT1 のノックダウンが FOXM1 の発現を低下させ、細胞増殖を抑制することを明らかにした。

結語

我々は、中皮腫細胞株において lncRNA PVT1 が発現上昇しており、lncRNA PVT1 をノックダウンすることで、中皮腫細胞の増殖能と遊走能が抑制され、FOXM1 の発現が低下することが明らかになった。さらに、中皮腫細胞株において、lncRNA PVT1 と FOXM1 を同時にノックダウンすると、lncRNA PVT1 または FOXM1 を単独でノックダウンした場合に比べて、より増殖が抑えられることがわかった。lncRNA PVT1 と FOXM1 は、悪性中皮腫の治療のためのターゲット候補として考えられる。