



Title	非小細胞肺癌におけるmiR-130 familyの機能解析
Author(s)	廣野, 貴之
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72328
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (廣野 貴之)	
論文題名	非小細胞肺癌におけるmiR-130 familyの機能解析
論文内容の要旨	
<p>【背景・目的】</p> <p>肺癌の死亡率は日本だけでなく世界中で増加しており、年間160万人以上が命を落とす疾患である。この肺癌は組織学的に小細胞肺癌と非小細胞肺癌 (non-small-cell lung cancer: NSCLC) に分類され、後者は肺癌のおよそ85%を占める。NSCLCは化学療法や放射線療法の効果が得られにくく、外科的な切除が現在でも第一選択とされるが、当然患者のQOL低下を招くことになり問題視されている。NSCLCに対しては、ゲフィチニブやクリゾチニブ等、複数の分子標的治療薬が開発されてきたが、5年生存率はいまだ15%と極めて低い現状にある。さらに、近年注目を集めている免疫チェックポイント阻害薬も奏効率が3割にも満たないなど、NSCLCに対する薬物治療は困難を極め、難治性癌として広く認知されている。これは、NSCLCがメラノーマに続き変異が多く、薬剤耐性を獲得しやすい非常にヘテロな集団から構成されること、肺癌の持つ遺伝子変異が多岐に渡るため、上記分子標的薬の効果を得られる患者が全体の数%に留まってしまうことに起因すると考えられる。以上のことから、これらのヘテロな集団に対してはone-drug and one-targetの治療戦略は限界に近いと思われたため、私はNSCLCに対する創薬標的には多様に遺伝子発現を制御できる分子こそが最適だと考えた。miRNAは20-25塩基からなるnon-coding RNAの一種であり、ひとつのmiRNAはおよそ200もの標的遺伝子を有していると考えられており、哺乳類では30-60%の遺伝子がmiRNAの標的となっているとされる。つまり、NSCLCにおいて高発現するmiRNAは複数の癌抑制遺伝子の発現を抑えることで、癌促進的に働くいくつかのシグナル経路を活性化していると考えられる。miRNAの中には、共通なシード配列をもつmiRNA familyが存在し、miRNA familyを構成するmiRNAは一部機能的重複が報告されているものの、幅広い遺伝子を制御している。すなわち、miRNA familyの共通なシード配列を標的とすることで、単独阻害時よりも、同時により多くの癌促進的シグナル遮断が可能であり、より強力に癌の進展抑制が期待される。我々は先行研究において腎孟尿管癌あるいは膀胱癌において高発現するmiRNA-130 familyのmiR-130b、miR-301a、miR-301b (miR-130 family) いずれもがoncogenic miRNA(oncomiR)として機能していることを明らかとしている。さらに共通のシード配列を標的とした核酸であるLocked nucleic acid(LNA)がin vivo膀胱癌背部皮下移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示した。これらのことから、膀胱癌でoncomiR familyとして機能するmiR-130 familyが治療標的となる可能性を示唆する結果を得ている。今回私は癌腫を変え、NSCLCにおけるmiR-130 familyの発現とその機能を以下の1~3に分けて検討した。</p> <p>【方法・結果】</p> <p>1. NSCLC組織臨床検体におけるmiR-130 familyの発現量を定量した。その結果、非癌部と比較し癌部においてmiR-130b、miR-301a、miR-301b (miR-130 family) いずれも高発現していることを見出した。腎孟尿管癌および膀胱癌で高発現がみられ、oncomiRとして機能しているmiR-130 familyがNSCLC臨床検体においても高発現が認められたことから、NSCLCにおいてもmiR-130 familyはoncomiRとして機能する可能性を見出した。しかしながらmiRNAは組織や癌腫によって異なる機能を有している可能性があるため、続いてNSCLCにおけるmiR-130 family個別の機能解明を目指すことにした。</p> <p>まず、内在性のmiR-130b発現量が低いA549細胞を用いて、miR-130b安定高発現細胞を作製した。この細胞を用いて表現型解析を行った結果、empty vectorを導入したmock細胞と比較して細胞増殖能や遊走能に変化は認められなかつたものの、細胞浸潤能の亢進と癌細胞が浸潤する際に重要な役割を担うMatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)の活性化が観察された。さらにmiR-130bの標的遺伝子同定のために、Ago2免疫沈降 gene array解析を行い、網羅的なトランスクリプトーム解析からTissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)を同定した。Luciferase reporter assay やwestern blot解析を利用し評価した結果、TIMP-2はmiR-130bの標的遺伝子のひとつであることを証明した。さらには、NSCLC組織におけるmiR-130b発現量と血清中のTIMP-2量の間には逆相関関係があることを見出し、in vitroだけ</p>	

なくNSCLC組織においてもmiR-130bはTIMP-2を制御している可能性を示した。

2. 次にNSCLC細胞株を用いたmiR-301a/bの機能解明に着手した。*in vitro*解析ではmiR-301a/b低発現NSCLC細胞株においてmiR-301a/bを高発現させると、癌細胞の増殖能と遊走能が亢進することを示した。さらに、癌抑制遺伝子として機能するTAp63遺伝子を標的として発現抑制することも発見し、NSCLC臨床検体におけるmiR-301a/bの発現が高い検体ほどTAp63遺伝子のタンパク質レベルでの発現量は低いことを明らかとした。以上のことからmiR-301a/bはNSCLCにおいて癌抑制遺伝子であるTAp63を標的とし、発現抑制することでoncomiRとして働くと考えられる。

3. 肺癌の死亡率が高い理由として各分子標的治療薬の低い奏効率以外にも発見が遅れることが挙げられる。肺癌は自覚症状がほとんどなく、発見時にはすでにステージが進行している場合が非常に多いことから、今回私は、侵襲性の高いバイオプシーではなく、より簡便に、かつ非侵襲性であるリキッドバイオプシーに着目し、新たなバイオマーカー探索を目的とし実験に取り組むことにした。NSCLC患者血清を用いたmiRNA microarray解析を行ったところ、miR-130 familyのうちmiR-130bだけが血清中に検出されることを見出した。さらに、NSCLC細胞株を用いた検討で、miR-130bは extracellular vesicles (EVs) に搭載され放出されていることを解明した。続いてmiR-130bだけがEVsに搭載され放出されるメカニズムを探査したところ、miR-130bはExo-motifを有し、この配列を介してEVsに搭載されていることを明らかとした。miR-130bはNSCLC組織から滲み出るTissue exudated-EVs (Te-EVs) としても放出されており、血清中に検出されるmiR-130bはNSCLC組織由来である可能性を示唆した。

【結論・考察】

NSCLCで高発現するmiR-130 familyがtumor suppressor geneであるTIMP-2やTAp63の発現を抑制することで浸潤能、増殖能や遊走能亢進といった癌促進的な働きを有することを解明した。NSCLCにおいては、TIMP-2やTAp63の遺伝子レベルでの発現制御は報告されておらず、miRNAによって制御されている可能性は十分に考えられる。また冒頭でも述べた通り、miRNAは複数の標的を持つ分子であり、今回示した標的遺伝子以外にもいくつかの遺伝子の発現制御を行っているものと推察される。事実、肺癌においてPPAR γ やPTENを標的とし、抗アポトーシス作用やシスプラチニン耐性を誘導する等の報告がなされている。今回の検討からmiR-130bは浸潤能を、miR-301a/bは増殖能・遊走能を変化させたことから、それぞれが異なるシグナル系の制御に関与することを示し、癌細胞内で異常化した幅広いシグナル経路をグローバルに制御している可能性を示唆する。以上のことから膀胱癌だけでなくNSCLCにおいてもmiR-130 familyいずれもがoncomiRとして機能すると考えられる。

さらに、miR-130bに関してはNSCLC細胞内で機能するだけでなくEVsに搭載され細胞外にも放出されており、バイオマーカーとして利用できる可能性も示した。NSCLC以外にもmiR-130bは肝癌組織で高発現し、肝癌患者血清中にも検出されるとの報告があり、NSCLCを含む複数の癌腫でmiR-130bが血清中で検出できることを示唆しており、新たなバイオマーカーの可能性を提示するものと考えられる。また、EVsはそれ自身で機能を持っていることから、搭載されているmiR-130bもレシピエントとなる細胞内でなにかしらの働きをしていると考えられる。NSCLC細胞が放出するEVsの受け取り手となるレシピエント細胞候補は、癌微小環境中の間質細胞や転移先の細胞、あるいは免疫細胞等があり、miR-130bは癌細胞内だけでなく細胞外でも重要な働きをすると思われる。以上よりmiR-130bは癌細胞内だけでなく、レシピエント細胞内でも機能する、非常にユニークなmiRNAである可能性を示唆し、NSCLCにおける有望な創薬標的分子であるとの結論に至った。

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏　名　(　廣野貴之　)	
	(職)	氏　名
論文審査担当者	主　查　教授	辻川和丈
	副　查　教授	藤尾　慈
	副　查　教授	橋本　均

論文審査の結果の要旨

非小細胞肺癌は肺癌の約85%を占めており、EGFR変異を標的としたゲフィチニブやEML-ALK変異を標的としたクリジチニブなどが開発されてきたが、その5年相対生存率はいまだ15%であり、難治性癌となっている。また免疫チェックポイント阻害薬も奏効率が3割に満たないなど、非小細胞肺癌に対する薬物治療は困難を極めており、革新的な治療標的分子の創出が求められている。非小細胞肺癌は薬剤耐性を獲得しやすい非常にヘテロな細胞集団から構成されることや、遺伝子変異が多岐に渡るため、one-drug and one-targetの治療戦略は限界に近いと推測されている。そこでこの非小細胞肺癌に対する創薬標的分子には多様な制御遺伝子を有している分子が最適だと考えられた。

本学位申請者は、

1. 非小細胞肺癌臨床検体においてmiR-130 family (miR-130b, miR-301a, miR-301b) が非癌部よりも癌部で高発現している
2. 非小細胞肺癌細胞においてmiR-130bはTIMP2を1つの標的分子とし、MMP2を活性化させることにより細胞浸潤能を亢進させる。さらに非小細胞肺癌患者血清中のTIMP-2量は肺癌組織におけるmiR-130b発現量と逆相関している
3. miR-301a/bはTA p 63遺伝子の発現抑制することで非小細胞肺癌細胞の増殖能や遊走能を亢進する。また、miR-301a/bの発現が高い非小細胞肺癌組織においてTA p 63の低発現量を認めた
4. 非小細胞肺癌患者血清中において高いmiR-130bレベルが検出され、miR-130b のexo-motifを介した細胞外小胞への内包による細胞外放出が原因である

ことを明らかとした。これらの知見は、多様な遺伝子を制御するmiR-130 familyが非小細胞肺癌の有望な分子標的となることを示すものであり、非小細胞肺癌の治療薬創製に繋がることを期待させる研究成果であることから、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。