

主論文の要旨

**Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222
in non-small cell lung cancer cells**

〔 miR-221 と miR-222 の非小細胞肺癌における
増殖抑制効果について 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

山下 良

【背景】

microRNA は、細胞内に存在する non coding RNA の一つである。microRNA は長さおよそ 22 塩基の 1 本鎖 RNA で、他の遺伝子の発現を調節する機能を有する。microRNA は相補的な配列を持つ標的 RNA に結合し、RNA を切断、あるいは翻訳を阻害することで発現抑制作用を示す。癌においては、microRNA は癌抑制遺伝子の阻害による細胞増殖の促進作用を示す場合と、癌遺伝子の抑制による細胞増殖抑制作用を示す場合の両者が報告されている。

microRNA-221 (miR-221) と microRNA-222 (miR-222) は、染色体 Xp11.3 に連続して存在し高い相同性を示す。悪性腫瘍においては、発生する臓器の種類依存性に、癌抑制遺伝子もしくは癌遺伝子として相反する振る舞いを示すと報告されている。miR-221 と miR-222 の癌遺伝子としての機能は、乳癌で多く報告がある。例えば、miR-221 と miR-222 は乳癌細胞において、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p27 や p57 を抑制することにより細胞増殖を促進する。また、転写調節因子である TRPS1 の抑制を介して EMT 誘導遺伝子である ZEB2 の発現を増強することで癌遺伝子として働くとの報告もある。しかし、一方で、神経膠腫細胞株においては、miR-221 と miR-222 の模倣体を過剰発現すると、細胞周期 S 期増加を伴うアポトーシスを誘導する癌抑制遺伝子としての機能の報告がある。また、miR-221 は胆管細胞癌に対するゲムシタビンの感受性を高めると報告された。肺癌の細胞株である H460 を使用した研究では、miR-221 と miR-222 が癌抑制遺伝子である PTEN や TIMP3 の発現を抑制することで癌遺伝子として作用すると報告された。しかし、肺癌は癌の中でも多くの遺伝子的な多様性を有していることが知られており、肺癌における miR-221 と miR-222 の機能をより普遍的に検討するためには、複数の細胞株による検討が必要と考えた。

これらの背景により、我々は、6 つの肺癌細胞と正常ヒト気道上皮細胞 (HBEC4) に miR-221 と miR-222 の模倣体を過剰発現し、細胞増殖、アポトーシス、抗癌剤感受性への影響を検討することとした。

【方法】

6 つの肺癌細胞株と正常ヒト気道上皮細胞 (HBEC4) を用いた。miR-221、miR-222 の模倣体を 6 つの肺癌細胞株 (H460、H3255、HCC4006、HCC4011、H838、H1299) と HBEC4 に miR-221 と miR-222 の模倣体をトランスフェクションした。増殖アッセイは WST-1 アッセイと液体培地コロニー形成能、BrdU アッセイを用いた。FACS にて細胞周期を評価した。intra-S 期停止を判定するため、チェックポイントキナーゼ 1 (Chk1)、チェックポイントキナーゼ 2 (Chk2) と、それぞれのリン酸化をウエスタンブロット法で評価した。DNA 二本鎖切断を核内の γ H2AX 免疫染色で評価した。WST1 アッセイにてシスプラチンとゲムシタビンに対する薬剤感受性を評価した。

【結果】

不死化正常乳腺上皮細胞への miR-221 と miR-222 の導入は、TRPS1 の抑制を介して

ZEB2 の発現が増加し、その結果として EMT が誘導される。また、肺癌細胞においては miR-221 と miR-222 の H460 細胞への導入は浸潤能を増強する。そこで、不活化気管支上皮細胞 HBEC4 における miR-221 と miR-222 強制発現の影響を検討した。HBEC4 に miR-221 と miR-222 の模倣体を過剰発現すると、EMT を示唆するスピンドル様の形態変化と、EMT 関連遺伝子の増加が認められた。しかし、EMT の特性である足場非依存性の軟寒天培地でのコロニー形成能には影響を与えず、また、浸潤能については、むしろ抑制される結果であった。次に 6 つの肺癌細胞株 (H460、H3255、HCC4006、HCC4011、H838、H1299) と HBEC4 に miR-221 と miR-222 の模倣体をトランスフェクションし WST1 アッセイと液体培地コロニー形成能にて増殖能を評価した。過去の報告の通り、H460 では、それらのトランスフェクションにて増殖が促進したが、他の 5 つの細胞株では異なっており、miR-221 の模倣体をトランスフェクションした 4 つの細胞株 (H3255、HCC4006、HCC4011、H1299) で増殖が抑制され、1 つの細胞株 (H838) は変化を認めなかった。また、miR-222 の模倣体をトランスフェクションした 3 つの細胞株 (H3255、HCC4006、HCC4011) で増殖が抑制され、2 つの細胞株 (H838、H1299) で増殖が促進された (Figure1A、B)。

そこで、miR-221 と miR-222 の増殖抑制のメカニズムを検討するため、細胞周期とアポトーシスを FACS にて評価した (Figure2A)。miR-221 と miR-222 の模倣体をトランスフェクションすると、H460、H3255、HCC4011、H838、H1299 にて S 期の比率が増加した。また、H460、H3255、HCC4006 で sub-G1 期の比率が増加しており、アポトーシスが起きていることが示唆された。次に S 期の増加が、DNA の合成促進によるものか、intra-S 期停止を示しているかを確認するために、BrdU の取り込みを評価した (Figure2B)。S 期の割合が増加し、かつ増殖アッセイで抑制が見られた細胞株 (Figure2B の点線の囲い) の 6 つ細胞株のうち、5 つの細胞株で BrdU の取り込みが減少しており、さらにこれらの細胞株で、intra-S 期停止のマーカーである、リン酸化 Chk1 とリン酸化 Chk2 の発現が確認され、増殖抑制の見られた細胞株での S 期の増加は、intra-S 期停止によるものであることが示唆された。そこで我々は、intra-S 期停止が起こるメカニズムとして、miR-221 と miR-222 による G1/S チェックポイントの障害により DNA の障害が蓄積し、これが intra-S 期停止やアポトーシスを誘導すると仮定した。DNA 複製ストレスにより惹起される DNA 二本鎖切断の指標である核内 γ H2AX は、miR-221 と miR-222 の模倣体をトランスフェクションした H1299 と H3255 で増加が認められ、DNA 二本鎖切断を介した intra-S 期停止とアポトーシス誘導が示唆された (Figure3)。また、miR-221 と miR-222 模倣体をトランスフェクションした H1299 は S 期作用抗癌剤であるシスプラチンとゲムシタビンに対して、薬剤感受性が増加した (Figure4)。

【結語】

本研究は肺癌細胞において miR-221 と miR-222 が腫瘍増殖に対して抑制的に働くことを初めて報告した。また、この抑制は、DNA 二本鎖切断を介した intra-S 期停止と

アポトーシスが関与していると考えられた。さらに、miR-221 と miR-222 の過剰発現は、抗癌剤への薬剤感受性を高めた。以上より、miR-221 と miR-222 導入は肺癌の新規治療手段となる可能性があると考えた。