

The miR-506-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition is Involved in Poor Prognosis for Patients with Gastric Cancer

崎村，正太郎

<https://hdl.handle.net/2324/1806875>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（医学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



KYUSHU UNIVERSITY

氏名：崎村 正太郎

論文名：The *miR-506*-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition is Involved in Poor Prognosis for Patients with Gastric Cancer
(*miR-506* 誘導性の上皮間葉転換は胃癌患者の予後不良に関係する)

区分：甲

論文内容の要旨

【背景】胃癌は世界で5番目に多い悪性腫瘍であり、癌死の3番目の原因である。発生率とそれに伴う死亡率は発展途上国を含め世界中で低下傾向であるが、東アジアではいまだ高い発生率・死亡率を維持している。胃癌は早期では症状が乏しく診断時には腹膜播種等を認め進行していることが多く、この腹膜播種に上皮間葉転換と呼ばれるプロセスの関与が示唆されている。上皮間葉転換は上皮細胞がその細胞極性、細胞間接着を失い、間葉系細胞となることで遊走能や浸潤能を得ることであり、様々な因子の関与が示唆されている。そのひとつである MicroRNA は 20~25 ヌクレオチドの短い非翻訳型 RNA で、標的とする複数の mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、それらの分解を進めたり翻訳を抑制したりすることで癌細胞の増殖、分化、遊走、上皮間葉転換の調節において重要な役割をもち、近年では卵巣癌と乳癌において *miR-506* が間葉系遺伝子 SNAI2 の発現を抑制することで上皮間葉転換を制御し、*miR-506* の低発現が予後不良と関連することが示唆されている。本研究の目的は、胃癌患者において予後や臨床病理学的因子、上皮間葉転換における *miR-506* の役割を明らかにすることである。

【方法】胃癌 141 症例において *miR-506* と *SNAI2* の mRNA の発現レベルを qRT-PCR 法を用いて測定し、*SNAI2* と上皮系遺伝子 E-cadherin のタンパク質発現レベルを免疫組織化学染色を用いて確認した。また *miR-506* の発現レベルにより患者を 2 群に分類し、臨床病理学的因子との関係を検討した。さらに 2 つのヒト胃癌細胞株 MKN-7、MKN-45 で pre-*miR-506* precursor を用いてルシフェラーゼ分析による *SNAI2* の 3' 非翻訳領域への *miR-506* の結合能を調べ、上皮間葉転換関連遺伝子の発現変化や細胞増殖能、遊走能を qRT-PCR、ウエスタンブロット分析、MTT assay、Migration assay を用いてそれぞれ評価した。

【結果】*miR-506* 発現と臨床病理学的因子の比較検討では、胃癌原発巣中の *miR-506* 低発現群に低分化や未分化な組織型が多く含まれたが ($P < 0.015$)、腹膜播種やリンパ管浸潤に関して差はみられなかった。また全生存率では *miR-506* の発現が低い患者は高い患者と比べ有意に生存率が低く ($P < 0.016$)、腹膜播種を認めなかった患者でのサブグループ解析でも同様の結果であった ($P < 0.096$)。全生存率における単変量解析、多変量解析ではともに *miR-506* の発現は独立予後因子となった（相対危険度 1.90, 95%信頼区間 1.05–3.59, $P = 0.033$ ）。

miR-506 の上皮間葉転換への関与を調べるため、まずオンラインツールである TargetScan で *miR-506* が *SNAI2* の 3' 非翻訳領域に結合可能かどうか調べたところ、結合可能な塩基配列が 3

ヶ所あることを確認した。In vitroにおいても、*miR-506* が *SNAI2* の 3' 非翻訳領域に結合することがルシフェラーゼ分析で明らかになった。また pre-*miR-506* の一過性遺伝子導入した細胞株では *SNAI2* の発現が mRNA レベルで抑制され、また *SNAI2* の標的遺伝子であり上皮間葉転換に重要な *E-cadherin* の発現が mRNA レベル、タンパク質レベルで増加することが qRT-PCR とウエスタンプロット分析からわかった。また臨床検体を用いて *SNAI2* の発現レベルを調べたところ、*miR-506* 高発現群では低発現群よりも有意に *SNAI2* の発現が mRNA とタンパク質レベルで低いことが qRT-PCR とウエスタンプロット解析からわかった。さらに切除胃癌標本の同一部位では *E-cadherin* の発現と *SNAI2* の発現は逆相関していた。以上の結果より、胃癌において *miR-506* は *SNAI2* の 3' 非翻訳領域に結合することでその発現を制御し、上皮間葉転換を誘導することが示唆された。

また *miR-506* の一過性遺伝子導入により細胞増殖能、遊走能が変化するかを調べたところ、pre-*miR-506* を遺伝子導入した細胞は導入しなかった細胞と比べ細胞増殖能と遊走能が有意に抑えられた ($P < 0.05$)。

【考察】*miR-506* の低発現は低分化・未分化な組織型と相關し、細胞増殖能や上皮間葉転換を介した遊走能への影響を与えることから、その発現低下が予後不良につながると考えられた。しかし腹膜播種との相関は本研究ではみられず、これは腹膜播種形成にエピジェネティックなものに加えてさらなる他の要因が必要不可欠であるためと思われる。肺癌において *miR-506* が活性酸素の蓄積やアポトーシスを誘導することが報告されており、本研究でも癌細胞の増殖能を抑制したことからも *miR-506* が胃癌の発育を抑える腫瘍抑制性 miRNA として働く可能性が示唆され、*miR-506* の制御に関わる遺伝子増幅、欠失、メチル化などのメカニズムの解明が今後求められる。また様々な疾患において miRNA が治療薬や治療標的となる可能性があることが近年認識され、全身投与や合成 miRNA が腫瘍の成長を抑えることが示されている。本研究からも *miR-506* が胃癌において治療分子となる可能性が示唆されており、その潜在的応用性や重要性をさらに調べる必要がある。

【まとめ】胃癌において *miR-506* は *SNAI2* に直接結合することで上皮間葉転換を制御し遊走能、細胞増殖能を抑制し、また *miR-506* の発現低下は胃癌の悪性度に関わっており、胃癌患者において独立予後因子となる。