

# 高倉 修 論文内容の要旨

主 論 文

## Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells

(miR-17-92 クラスターの甲状腺未分化癌細胞における発癌分子機構)

高倉 修、光武 範吏、中島 正洋、難波 裕幸、  
ウラジミル サエンコ、タチアナ ログノビッチ、中沢 由華、  
林 徳真吉、大津留 晶、山下 俊一

(Cancer Science in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻

(主任指導教員：山下 俊一教授)

### 緒 言

マイクロ RNA(miRNA)は、細胞に内在する 20 塩基程度のノンコーディング RNA である。miRNA は標的メッセンジャーRNA(mRNA)に配列特異的に結合し翻訳抑制機能を有する。miRNA の中には細胞内に普遍的に存在するものから組織特異的に発現するものまで様々な存在様式が認められ、細胞分化や増殖、さらに発癌に至るまで広範囲な生命現象に関与すると考えられている。最近では特定の miRNA クラスターの悪性腫瘍発症への関与も報告されている。今回、甲状腺未分化癌細胞における miRNA 発現とその機能解析を行い、発癌分子機構の一部を明らかにしたので報告する。

### 対象と方法

まず、マイクロアレイ法でヒト甲状腺未分化癌(ATC)細胞株 ARO における miRNA の発現パターンを初代培養ヒト甲状腺正常細胞と比較した。

次に、ノーザンブロット法および TaqMan リアルタイム PCR キットを用い、ARO で高発現を示す miRNA の中でも、癌の増殖に関与する miRNA の発現を、他のヒト甲状腺癌細胞株も含み確認した。さらに、臨床症例における未分化癌 miRNA の発現は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織サンプルより RNA を抽出し検討した。

ARO で高発現している miR-17-92 クラスターに着目し、機能解析として、それぞれの miRNA に対して阻害作用のあるアンチセンスオリゴを ATC 細胞株(ARO,FRO)に導入し、細胞増殖等の検討を行った。

アポトーシス誘導の検討は、カスパーゼ活性、PARP についてローダミン試薬およびウエスタンブロット法を用いた。また、老化様細胞増殖停止の検討は老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色を用いた。

標的 mRNA はコンピュータソフトウェアを用いて予測し、ウエスタンブロット法を用いて発現を確認した。

## 結 果

マイクロアレイ解析により、正常細胞とは明らかに異なる、ARO に特徴的発現パターンを認めた。ノーザンブロット法およびリアルタイム PCR 法による癌関連 miRNA の検討では、ATC 細胞株で正常細胞と比較して miR-17-92 クラスター(miR-17-5p,miR-17-3p, miR-18a,miR-19a,miR-20a,miR-19b,miR-92-1)および miR-106a、miR-106b(miR-17-5p と miR-20a・miR-106a・miR-106b,miR-19a と miR-19b は相同配列を有する)の大幅な発現増強を認めた。また、臨床 ATC 症例の 6 例中 3 例で、このクラスターの発現上昇を認めた。

ATC 細胞株を用いた miR-17-92 クラスターの阻害実験では、miR-17-5p とその関連 miRNA を阻害した細胞(LNA-17-5p)、miR-17-3p を阻害した細胞(LNA-17-3p)、または miR-19a(miR-19b)を阻害した細胞(LNA-19a)で有意な細胞増殖抑制効果を認めた。中でも、LNA-17-3p では、カスパーゼの活性化や核の断片化、cleaved PARP の発現誘導など、アポトーシス所見が得られた。LNA-17-5p では、老化様細胞の有意な増加を認めた。これに対し、LNA-18a の増殖抑制効果は軽度であった。

さらに、miR-17-5p および miR-19a とその関連 miRNA の標的 mRNA は、それぞれ腫瘍抑制因子である RB1 および PTEN であることが予測され、LNA-17-5p および LNA-19a においてそれぞれの再発現誘導を認めた。

## 考 察

本研究結果から、miR-17-92 クラスターが ATC 細胞株で高発現し、細胞増殖に深く関与している事が明らかとなった。また臨床 ATC 症例の中にこのクラスターを高発現するものも含まれることから、臨床的意義も高いと考えられる。

さらに、miR-17-3p はアポトーシスの制御に関与し、ATC の増殖に極めて重要である事が示唆された。一方、miR-17-5p とその関連 miRNA は細胞老化制御に関与している事が示唆された。miR-17-5p の標的 mRNA は E2F1 であり、E2F の持続的活性維持が細胞老化を引き起こすとの報告があり、我々の知見を支持するものである。今回我々は、新たに RB1 が miR-17-5p の標的である可能性を見出した。即ち、ATC においては miR-17-5p とその関連 miRNA が RB1 の発現を抑制し、腫瘍増殖亢進に関与していると考えられる。また、miR-19a と miR-19b は腫瘍抑制因子である PTEN を標的とし、その発現を抑制し、細胞増殖促進に関与している可能性が示唆された。

以上、甲状腺未分化癌細胞の増殖における miR-17-92 クラスターの重要性が判明し、同一クラスター内における個々の miRNA がそれぞれ異なる生物活性を制御している可能性が示唆された。今後、miRNA の詳細な解析が進展することにより甲状腺癌の分子診断から分子標的治療の新しい臨床応用戦略が展開すると期待される。