

# 氏福 健太 論文内容の要旨

主 論 文

## **miR-195, miR-455-3p and miR-10a\* are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells**

(マイクロ RNA-195, -455-3p および 10a\*は神経膠芽腫の獲得薬剤耐性に関与する)

氏福健太、光武範吏、高倉修、松瀬美智子、ウラジミール・サエンコ、鈴木啓司、林健太郎、鎌田健作、松尾孝之、永田泉、山下俊一

Cancer Letters. 296 巻 2 号 241-248 頁 2010 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：永田 泉 教授)

### 緒 言

神経膠芽腫は全生存中央値 14.6 ヶ月と予後不良の原発性脳腫瘍であり、現時点での標準治療薬は Temozolomide (TMZ)である。TMZ は DNA 修復酵素である O6-methyl guanine methyltransferase (MGMT)が低発現であると治療効果が高いと報告されている。MGMT の発現は、プロモーターメチル化によるエピジェネティックな制御を受けており、メチル化解析を治療に応用する試みがなされつつある。しかし、腫瘍再発、薬剤耐性の獲得、といった問題点は未だ解決していない。

マイクロ RNA (miRNA)は、平均 22 塩基からなる一本鎖の機能性 RNA である。標的メッセンジャーRNA (mRNA)の、主に 3'側の非翻訳領域に結合して翻訳を阻害し、遺伝子の発現を負に制御する。一つの miRNA によって、同時に数多くの様々な遺伝子の発現が影響を受けることが分かっている。近年、miRNA の腫瘍発生など多くの生命現象への関与が報告されており、TMZ 薬剤耐性の獲得にも特定の miRNA が関与している可能性が考えられ、それを明らかにする研究を計画した。

### 対象と方法

U251MG など数種類の神経膠芽腫細胞株（野生株）を、継続的に TMZ に曝露し、耐性株を樹立した。メチル化特異的 PCR 法にて MGMT プロモーター領域のメチル化を検討した。マイクロアレイ解析にて野生株と耐性株の miRNA および cDNA のプロファイルと比較した。TaqMan リアルタイム PCR キットを用いて、マイクロアレイ解析で得られた miRNA の発現変化を検討した。標的 miRNA を特異的に knock-down する Locked Nucleic Acid (LNA)を組み込んだアンチセンス LNA-DNA オリゴヌクレオチド (LNA-DNA) をデザインした。リポフェクタミン 2000 を用いて LNA-DNA を導入し、TMZ 負荷と併せて生物学的効果を検討した。それぞれの miRNA についての標的 mRNA を、コンピュータを用いて予測した。

## 結 果

神経膠芽腫の野生株と、耐性株の MGMT メチル化に変化はなく、本獲得耐性は MGMT とは無関係であることを確認した。マイクロアレイ解析により、野生株と耐性株の間で明らかに異なる miRNA の特異的発現パターンを認めた。特に両群間で発現の変化が大きい miR-195, miR-455-3p および miR-10a\* を解析対象とした。これらの発現変化をリアルタイム RT-PCR 法にて確認した。LNA-DNA を用いた miRNA の knock down にて、TMZ の殺細胞効果が回復した。

データベースと cDNA マイクロアレイの結果を総合した予測では、標的遺伝子として、*SLAH1*, *WEE1*, *RANBP3* などが示唆された。

## 考 察

先行研究により、miR-455-3p は悪性中皮腫の喫煙者群で高発現であることが一報のみ報告されている。また、miR-10a\* は現時点で特筆すべき報告はない。

一方、miR-195 についてはいくつかの先行研究がある。舌扁平上皮がん、膀胱がん、胃がん、肝細胞がんで miR-195 の発現低下が報告されており、腫瘍細胞増殖を抑制する機能があるとする報告が多い。一方、本研究では、miR-195 の knock down で明らかに細胞増殖が抑えられており、miR-195 の機能は、がん細胞の種類によって異なることが示唆された。また、miR-195 は *WEE1* を介して幹細胞の維持を行う、とする報告もあり、薬剤耐性、再発に関与するとされる癌幹細胞の維持に何らかの役割を果たしている可能性もある。

一つの miRNA は 100 個以上の標的を持ち、様々な強さで結合し、mRNA を分解、阻害すると考えられている。従って、現時点で miRNA の標的 mRNA を一度に同定する手法は確立されていない。本研究では候補遺伝子を *in silico* で選別し、OMIM などの遺伝子データベースの記載を参照しつつ、薬剤耐性の観点から、生物学的に意味のある遺伝子を選出した。特に miR-195 の標的候補遺伝子を見ると、*SLAH1* は *p53* の標的遺伝子の一つで、*beta-catenin* を介した細胞周期停止、MDR/P-glycoprotein の発現低下、アポトーシス誘導に関与するとの報告がある。*WEE1* は細胞周期において G2/M の移行を阻害し、パクリタキセル、ビンブラスチンの感受性を上昇させると報告されている。*RANBP3* はがん抑制遺伝子であることが示唆されている。

以上より、TMZ に対する獲得薬剤耐性に miR-195, miR-455-3p および miR-10a\* が関与する可能性が示唆された。これらの miRNA を標的とする治療により、一度に様々な遺伝子発現を制御し、薬剤感受性を回復できる可能性も示唆された。標的 mRNA について、さらに分子機構を解明する必要があり、今後の研究課題と考えている。