

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 金野 陽輔

### 学 位 論 文 題 名

#### Elucidating the role of microRNA-101 as a new therapeutic target for aggressive endometrial cancer

(高悪性度子宮体癌における新たな治療標的候補としての microRNA-101 の機能に関する研究)

#### 【背景と目的】

子宮体癌は欧米では最も頻度の高い婦人科癌であり、近年、日本においても生活習慣の欧米化にともなって、その頻度が増加してきている。子宮体癌の各進行期、組織型を含めた全体としての5年生存率は約80%とほかの婦人科癌と比べて比較的予後良好であるが、高浸潤、高転移能を有し予後が悪い組織型も報告されており、予後の悪い子宮体癌のサブグループに対する新たな治療戦略がより重要であると考えられる。

microRNAはnon-coding RNAの一つで、細胞内に存在する長さ20から25塩基ほどの1本鎖RNAであり、他の遺伝子の発現を調節する機能を有する。MicroRNA-101(miR-101)は多くの癌腫で腫瘍抑制的に機能すると報告されている。しかしながら、miR-101が子宮体癌の進行に与える影響やメカニズム、その標的遺伝子は現時点では不明である。本研究では、miR-101が高悪性度体癌において腫瘍抑制 microRNA として機能しているのではないかと考え、miR-101が高悪性度子宮体癌細胞株の細胞機能に与える影響、miR-101の直接標的遺伝子を検討し、miR-101が子宮体癌に対する有用な治療標的になりうるかを明らかにする。

#### 【材料と方法】

ヒト子宮体部高悪性度体癌細胞株(漿液性腺癌細胞株: SPAC-1-LとSPAC-1-S、低分化類内膜腺癌細胞株: HEC-50とHOUA-I)、対照となるヒト子宮内膜由来不死化細胞株EMを用い、以下の検討を行った。

1. 高悪性度子宮体癌細胞株 (SPAC-1-L, SPAC-1-S, HEC-50, HOUA-I) の内因性の miR-101 の発現レベルを子宮内膜不死化細胞株 EM と qRT-PCR を用いて比較した。
2. SPAC-1-L、HEC-50 細胞に miR-101 を導入し、細胞増殖、アポトーシス、細胞老化に与える影響を cell counting kit-8 assay、Colony formation assay、TUNEL assay、Caspase-Glo 3/7 assay、SA-β-gal staining assay により検討した。それに伴う関連遺伝子の mRNA、タンパク発現の変化も qRT-PCR とウエスタンブロット法により検討した。
3. miR-101 過剰発現、または発現抑制による細胞運動能、浸潤能、上皮間葉移行 (EMT) / 癌幹細胞形質に及ぼす影響を wound healing assay、transwell cell migration assay、matrigel invasion assay、sphere formation assay、paclitaxel resistant assay により検討した。それに伴う関連遺伝子の mRNA、タンパク発現の変化も qRT-PCR とウエスタンブロット法により検討した。

4. 複数の microRNA 標的予測プログラムと DNA microarray を用いることにより、microRNA-101 の標的候補遺伝子を絞り込んだ。これらの中で有望な遺伝子を Luciferase assay により直接標的であるかどうか検討した。
5. 特異的 siRNA を用いて miR-101 の標的候補遺伝子 *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* を抑制し、cell counting kit-8 assay、TUNEL assay、SA- $\beta$ -gal staining assay、invasion assay、sphere formation assay を用い細胞機能に与える影響を検討した。それに伴う mRNA、タンパク発現の変化も qRT-PCR とウエスタンブロット法により検討した。
6. 絞り込んだ microRNA-101 の標的候補遺伝子の中で、癌遺伝子との報告がある *NEK7*、*UBE2D1*、*FLRT3* が miR-101 過剰発現 SPAC-1-L 細胞と miR-101 発現低下 HOUA-I 細胞での mRNA の発現変化を qRT-PCR を用いて比較した。

#### 【結果】

1. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 の発現は低下している。
2. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 はアポトーシス、細胞老化を誘導し細胞増殖、コロニー形成能を抑制する。
3. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は細胞運動能、浸潤能、EMT/癌幹細胞形質を抑制する。
4. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* を直接制御し発現を抑制する。
5. 高悪性度子宮体癌細胞株において特異的 siRNA による *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の発現の低下が、細胞増殖、浸潤、癌幹細胞様形質を抑制させる。
6. 高悪性度子宮体癌細胞株において miR-101 は癌関連遺伝子 *NEK7*、*UBE2D1*、*FLRT3* の mRNA 発現も抑制する。

#### 【考察】

高悪性度子宮体癌細胞において、miR-101 を過剰発現させると、アポトーシス、細胞老化がおもな要因とおもわれる細胞増殖抑制効果を示し miR-101 の上昇が EMT 関連の特徴である細胞運動能、細胞浸潤能、パクリタキセル耐性、sphere 形成能を抑制し、miR-101 が腫瘍抑制的に機能していることがわかった。高悪性度子宮体癌細胞において、*EZH2*、*MCL-1*、*FOS* が miR-101 の直接標的であり、これら 3 遺伝子を特異的 siRNA によりノックダウンすると、miR-101 と同様の腫瘍抑制効果を示した。これらの結果により、高悪性度子宮体癌細胞における miR-101 の腫瘍抑制効果の一部は miR-101 が *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* を直接標的にして、発現を低下させることによってもたらされていることを示唆するものである。本研究は、高悪性度子宮体癌細胞において、miR-101 が少なくとも *EZH2*、*MCL-1*、*FOS* の発現を低下させることによって、細胞増殖、細胞運動能、浸潤能、癌幹細胞様形質を抑制することを証明した初めての報告である。本研究は、miR-101 の発現低下による、子宮体癌の発症と進行メカニズムに新しい知見を与えるものである。

#### 【結論】

高悪性度子宮体癌細胞において、miR-101 は複数の重要な腫瘍促進遺伝子を制御することによって、細胞増殖、浸潤、癌幹細胞様形質を抑制する重要な腫瘍抑制 microRNA である。MiR-101-*EZH2*/*MCL-1*/*FOS* 分子経路は子宮体癌における新しい治療標的となる可能性がある。