



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Synthetic miR-143 Inhibits Growth of HER2-Positive Gastric Cancer Cells by Suppressing KRAS Networks Including DDX6 RNA Helicase(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	徳丸, 剛久
Report No.(Doctoral Degree)	博士(医学) 甲第1134号
Issue Date	2020-04-15
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79513

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	徳丸 剛久	（愛知県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1134号	
学位授与日付	令和2年4月15日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Synthetic miR-143 Inhibits Growth of HER2-Positive Gastric Cancer Cells by Suppressing KRAS Networks Including DDX6 RNA Helicase	
審査委員	（主査）教授	古家 琢也
	（副査）教授	中島 茂 教授 竹内 保

論文内容の要旨

【背景と目的】

進行再発胃癌の予後は今なお不良で、年間約72,000人の胃癌関連死を認める。一方、HER2は癌遺伝子EGFRファミリーの一つであり、胃癌では約20%の症例が陽性である。HER2陽性胃癌に対する標準治療として、抗HER2薬であるトラツズマブが投与されている。しかし、細胞増殖促進シグナルであるPI3K/AKT経路の亢進によるトラツズマブ耐性、あるいは同じく細胞増殖シグナルERK経路の恒常活性化による胃癌の浸潤・転移が生じるため、これら細胞増殖促進シグナルのコントロールが、HER2陽性胃癌に対する治療戦略として重要である。

マイクロRNA(miR)は翻訳阻害によって標的遺伝子制御を行っているが、miR-143は癌抑制遺伝子としての機能も有している。以前我々の研究グループでは、結腸直腸癌に対する合成miR-143の抗腫瘍効果とKRASシグナルの抑制効果を明らかにした。また、Human DEAD/H-boxに属しRNAヘリカーゼであるDDX6が、胃癌細胞における転写後レベルでHER2発現亢進に関与していることも明らかにした。本研究では、HER2陽性胃癌におけるmiR-143の意義、DDX6-HER2-KRAS-AKT/ERKシグナルネットワークに対するmiR-143の作用、合成miR-143の抗腫瘍効果と治療応用の可能性を検討するため、以下の実験を行った。

【方法】

- ①胃癌細胞株におけるmiR-143, HER2, KRASとエフェクター分子の発現状況の確認
胃癌細胞株(MKN-7, MKN-45, MKN-74, KATO-III, SNU-16)におけるmiR-143の発現を、定量的リアルタイム-PCR(qRT-PCR)にて解析した。さらに、HER2, KRAS, SOS1, AKT, ERK1/2タンパク質の発現はウエスタンブロット法(WB)を用いて確認した。
- ②合成miR-143導入およびKRAS-siRNAノックダウンによる細胞増殖への影響の検討
MKN-7およびKATO-III(miR-143低発現株)に合成miR-143を導入後、トリパンブルー色素排除試験法にて細胞増殖抑制を判定した。miR-143標的遺伝子(DDX6)とエフェクター分子(HER2, KRAS, SOS1, AKT, ERK1/2)の発現は、WB, qRT-PCRにて確認した。合成miR-143とDDX6遺伝子の結合は、DDX6野生型および変異型配列を組み込んだベクターをMKN-7に導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて評価した。
- ③*In vivo*での合成miR-143の抗腫瘍効果の検討(ヌードマウスアッセイ)
KATO-III細胞を移植したヌードマウスに、合成miR-143投与群を投与し抗腫瘍効果を検討した。

【結果】

- ①定常状態において、HER2 増幅細胞株の MKN-7 と FGFR2 増幅細胞株の KATO-III では、HER2 とエフェクター分子である KRAS, AKT, ERK1/2 の発現が亢進していた。一方で両細胞株とも、miR-143 の発現は顕著に低下していた。
- ②合成 miR-143 導入により、MKN-7, KATO-III の約 50%の細胞増殖抑制効果を認めた。また、標的遺伝子 KRAS, AKT, ERK1/2 のタンパク質レベルでの発現低下を認めた。ルシフェラーゼレポーターアッセイにて DDX6 野生型では miR-143 が結合し、ルシフェラーゼ活性が 40%に低下したが、変異型では活性の低下を認めなかった。MKN-7, KATO-III への合成 miR-143 強制発現により HER2 タンパク質発現は抑制された。
- ③ヌードマウスアッセイでは、最終腫瘍体積はコントロール群と比較して、合成 miR-143 投与群において有意に縮小した ($P = 0.03$)。

【考察】

本研究で、HER2 陽性胃癌に対する合成 miR-143 の抗腫瘍効果が明らかとなった。MiR-143 は HER2 陽性胃癌において増殖シグナルである AKT 経路および ERK 経路を抑制することから、胃癌の増殖抑制因子と考えられる。導入 miR-143 は DDX6 に直接結合して HER2 の発現抑制することも確認した。これらの結果は、合成 miR-143 が HER2 陽性胃癌に対する治療戦略の一つとなりうることを強く示唆している。

【結論】

miR-143 は、DDX6 を含む KRAS ネットワークを系統的に抑制し、胃癌の細胞増殖を負に制御していることが明らかとなった。また、合成 miR-143 投与は HER2 陽性胃癌に対して抗腫瘍効果を示した。

論文審査の結果の要旨

申請者 徳丸剛久は、胃癌における miR-143 の発現を検討し、HER2 陽性胃癌では miR-143 が著明に低下していることを発見した。また、HER2 の過剰発現は PI3K/AKT 経路、あるいは MAPK/ERK 経路の恒常活性化を誘起し、胃癌の浸潤や転移を促進している。HER2 陽性細胞株である MKN-7 や KATO-III 細胞株では miR-143 の発現が低下しているが、合成 miR-143 を導入することにより腫瘍増殖抑制効果を認めたことから、miR-143 は AKT あるいは ERK シグナル経路の制御を介して胃癌の進展に深く関与していることを明らかにした。また、DDX6 を介した HER2 の発現も、合成 miR-143 が抑制することを示した。

本研究の成果は、HER2 陽性胃癌に対する miR-143 の体内動態や癌進行に対する役割、および合成 miR-143 による新規治療開発の可能性を示唆し、今後の胃癌研究および治療の発展に少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Yoshihisa Tokumaru, Toshihiro Tajirika, Nobuhiko Sugito, Yuki Kuranaga, Haruka Shinohara, Takuya Tsujino, Nobuhisa Matsushashi, Manabu Futamura, Yukihiro Akao, and Kazuhiro Yoshida: Synthetic miR-143 Inhibits Growth of HER2-Positive Gastric Cancer Cells by Suppressing KRAS Networks Including DDX6 RNA Helicase
Int. J. Mol. Sci. 20(7): 1697(2019)