

【目的】

非小細胞肺癌治療において、ゲフィチニブおよびエルロチニブなどの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) は重要な位置を占めている。ゲフィチニブは、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異を有する肺癌患者において、標準的化学療法に比べ約 2 倍の無増悪生存期間の延長が証明され、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の初回治療薬として位置づけられた。しかしながら、EGFR-TKI 耐性の出現が臨床上的問題点になっている。近年、細胞接着の喪失と細胞の表現型の転換を引き起こす現象である上皮間葉移行 (EMT : epithelial-mesenchymal transition) が、腫瘍の発生や浸潤、転移および薬剤耐性に関わることが明らかになっており、EMT が EGFR 変異有無に関わらず、EGFR-TKI に対する耐性のメカニズムの 1 つである可能性が示唆されている。Micro RNA (miRNA) は遺伝子発現制御メカニズムを有する低分子 RNA の 1 つで、癌抑制遺伝子または癌遺伝子の発現を制御することで発癌に関与していることが知られている。今回我々は肺腺癌細胞株を用いて、肺腺癌における EMT および EGFR-TKI 耐性に関与する miRNA とその標的遺伝子の同定を試みた。

【方法】

EMT 陽性肺腺癌細胞群 (A549, LC-2/ad) と陰性細胞群 (PC9, PC3) を用いて、TaqMan miRNA array による網羅的 miRNA 発現解析と定量的 RT-PCR 法にて、TGF- β 暴露 48 時間後に発現が変化する miRNA を探索した。MicroRNA.org および TargetScan などのデータベースにより EMT 関連 miRNA の標的遺伝子をスクリーニングし、Luciferase assay により標的遺伝子との結合を検証した。A549 細胞株を用いて EMT 関連 miRNA の過剰発現および抑制によるゲフィチニブに対する薬剤感受性の変化を MTT assay を用いて解析した。

【結果】

TaqMan miRNA array と定量的 RT-PCR 解析にて、14q32 領域に位置する miR134/487b/655 cluster が EMT 陽性細胞群において TGF- β 暴露後に有意に発現上昇を認め、EMT に関係する miRNA と考えられた。A549 細胞株に TGF- β 暴露下に、Pre-miR134/487b により miR-134/487b を過剰発現させると、EMT を示す形態変化および上皮系マーカー E-cadherin の発現減少、間葉系マーカー Vimentin の発現増強がみられ、EMT 変化がより増強された。一方 Anti-miR-134/487b により miR-134/487b を抑制すると、TGF- β 誘導 EMT 変化が阻害され、miR-134/487b が TGF- β 誘導 EMT を制御していることを明らかにした。次に、MicroRNA.org および TargetScan によるデータベース検索で、miR-134/487b/655 cluster の標的遺伝子として Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 2 (MAGI2) が見いだされ、Luciferase assay により MAGI2 遺伝子との結合を確認した。A549 細胞株を用いた MAGI2 の定量的 RT-PCR およびウェスタンブロット解析において、Pre-miR-134/487b による過剰発現により MAGI2 の発現は低下し、Anti-miR-134/487b による抑制により TGF- β 暴露による MAGI2 減少は抑制された。また、MAGI2 は phosphatase and

tensin homolog (PTEN) の安定化に関与することが報告されており、TGF- β 暴露および Pre-miR-134/487b による MAGI2 抑制により、PTEN 不活性化が認められた。最後に、A549 細胞株を用いた MTT assay にて TGF- β 暴露または Pre-miR-134/487b による miR-134/487b 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を示し、Anti-miR-134/487b による miR-134/487b 抑制にて、TGF- β 暴露によるゲフィチニブ耐性の回復を認めた。

【考察】

EGFR-TKI 耐性機序として、EGFR 遺伝子 Exon 20 T790M 点変異、MET 遺伝子増幅等が報告されている。今回我々は EGFR 遺伝子変異陰性の肺腺癌細胞株 A549 において、14q32 領域に位置する miR-134/487b/655 cluster が EMT および EGFR-TKI 耐性を引き起こすことを明らかにした。MiR-134/487b/655 が標的とする MAGI2 は、潜在的に他のタンパク質と結合できる 9 つのドメインをもつスクフォールド因子であり、近年前立腺癌の腫瘍発生や肝細胞癌株の転移/増殖に関与することが報告されている。MAGI2 の PDZ 領域に結合するタンパク質の 1 つが PTEN である。PTEN の欠失または発現減弱は、EGFR-TKI 耐性メカニズムの 1 つとして報告されている。PTEN は MAGI2 との結合により安定性が增強され、PI3K/Akt pathway を抑制することが知られている。今回の結果から、miR-134/487b/655 cluster による MAGI2 の発現抑制が PTEN 不活性化を導くことで PI3K/Akt pathway を増強し、EMT 変化および EGFR-TKI 感受性低下が起こったと考えられる。以上この miR134/487b/655 cluster を標的とした肺腺癌における EMT の制御は、新たな EGFR-TKI 耐性克服の治療戦略の 1 つに成り得ると考えられる。

【結語】

肺腺癌細胞株において、miR134/487b/655 cluster が MAGI2 を標的遺伝子として PTEN の不活性化を介して EMT および EGFR-TKI 感受性低下を起こすことを明らかにした。MiR-134/487b/655 cluster および MAGI2 を標的とした肺腺癌における EMT の制御は、新たな EGFR-TKI 耐性克服の治療戦略の 1 つに成り得る。