

【要約】

MicroRNA-874 targets phosphomevalonate kinase and inhibits cancer cell growth via the mevalonate pathway

(マイクロRNA874 はホスホメバロン酸キナーゼを標的にし、メバロン酸経路を介してがん細胞増殖を抑制する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：田中 知明 教授)

ALIMASI AERSILAN

[背景]

乳がんの罹患率は増加傾向にあり、手術療法の進歩のほか、内分泌療法、化学療法、放射線療法、分子標的治療薬の開発やそれらを組み合わせた集学的治療により予後が改善している。しかし、転移性乳がんなど治療抵抗性のがんも存在し、乳がんによる死亡者数も増加しており、新たな治療法が開発が期待されている。がん細胞ではメバロン酸経路の亢進など代謝の変化(代謝リプログラミング)が生じていることが分かっている。スタチンはメバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA reductase (HMGCR)を阻害してコレステロールを低下させる薬剤であるが、近年多種のがんにおいてスタチンの使用が死亡率の減少と関連していることや、スタチンががん細胞の増殖抑制や細胞死誘導を引き起こすことが報告されている。

miRNAは19-25塩基程度の1本鎖RNA分子であり、遺伝子の転写後発現調節に関与し、細胞周期やアポトーシス、細胞分化の過程のみならず、疾患病態機序においても重要な役割を果たしていることが解明されてきている。miRNAとメバロン酸経路の関連性としては、miR-21やmiR-125aなどHMGCRを標的として作用するmiRNAも報告されている。miR-874は上顎洞扁平上皮癌において最も発現抑制されたmiRNAとして報告された。その後もPPP1CA、HDAC1、CDK9、E2F3、STAT3、ETS1などを標的として、様々ながん種においてがん抑制的に作用することが知られているが、細胞内代謝との関連については解明されていない。そこで我々は、乳がん細胞株を用いて、miR-874のがん抑制機能におけるメバロン酸経路の関わりについて検討した。

[方法]

乳がん細胞株MCF-7、並びにCRISPR-Cas9によりp53、c-Mycをノックアウトした株、またp53変異を有するMDA-MB-231細胞にmiR-874を遺伝子導入して、細胞周期や細胞死への影響を解析した。また、MCF-7にmiR-874を発現させてRNAシーケンスを行い、発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。そしてmiR-874導入により発現が抑制されたホスホメバロン酸キナーゼ(PMK)について、miR-874の標的であることを確認するためレポーターアッセイを行った。さらにMCF-7を用いてPMVKをノックダウンして、細胞周期や細胞死への影響を検討した。

[結果]

まず、MCF-7細胞にmiR-874を遺伝子導入して発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。発現変動遺伝子群をIngenuity Pathway Analysis(IPA)を用いてパスウェイ解析を行うと、miR-874により発現増加したパスウェイのうち、p53シグナル経路が最も有意に変動していた。またATMシグナル、HIPPOシグナル、Mycシグナルも有意に変動が認められた。一方、発現が低下した遺伝子群を解析すると、メバロン酸経路の複数の遺伝子の発現が低下しており、中でもphosphomevalonate kinase (PMVK)はmiR-874遺伝子導入により90%の発現低下が認められた。

次にmiR-874導入による細胞死と細胞周期の変化を検討した。MCF-7にmiR-874を遺伝子導入して、FACSを用いて細胞周期とアポトーシス誘導の変化を、タイムコースを追って解析した。細胞周期解析ではmiR-874を導入後、12時間後以降でS期の低下とG1停止が認められた。一方、アポトーシス誘導については、miR-874導入後、36時間以降にアポトーシス誘導が始まり、48時間後にはアポトーシスの著増が認められた。RNA-seqの結果、miR-874導入によりp53経路とc-Myc経路の亢進が認められたため、タイムコース実験に

における p53 と c-Myc のタンパク発現を western blotting により検討したところ、c-Myc は miR-874 導入から 24 時間後をピークに発現低下したのに対し、p53 は 36 時間後に発現がピークに達した。これらの結果から、miR-874 によるアポトーシス誘導には p53、c-Myc が重要である可能性が示唆された。そこで MCF-7 p53 KO 株、c-Myc KO 株における miR-874 による導と細胞周期の変化を検討した。興味深いことに、p53 野生型（以下 WT）では著明な細胞死が誘導されたが、p53KO では p53WT と比較して軽度であり、c-Myc KO では細胞死誘導は認められなかった。しかし、細胞周期解析においては、p53 KO や c-Myc KO においても、細胞周期停止がみられた。また、p53 変異株の MDA-MB-231 でも miR-874 により細胞死誘導は見られなかったが、細胞周期停止は認められた。したがって、miR-874 による細胞死は p53 依存的に生じるが、細胞周期停止は p53 非依存的であることが示唆された。

次に、RNA-seq で発現抑制された遺伝子群に着目した。miR-874 導入により、メバロン酸経路の遺伝子のうち HMGCS1、HMGCR、PMVK、MVD、FDPS の発現が抑制された。中でも PMVK の発現は 90%抑制されていた。2 種類のアルゴリズムを用いて、PMVK が miR-874 の標的遺伝子であるか調べたところ、PMVK mRNA の 3'UTR の 216-212 に miR-874 の予測結合部位が認められた。そこで psiCHECK2 ベクターに PMVK 3'UTR または PMVK 3'UTR から miR-874 予測結合部位を除いた配列をサブクローニングして、miR-874 とともにトランスフェクションしてレポーターアッセイを行った。

miR-874 は PMVK 3'UTR レポーターの活性を減少させたが、予測結合部位を欠いたベクターでは活性の減少は見られなかった。したがって、PMVK は miR-874 の新規の標的遺伝子であることが示された。

PMVK はメバロン酸 5 リン酸からメバロン酸ピロリン酸への変換を触媒する酵素である。次に、PMVK の機能的役割を調べるため、MCF-7 に PMVK をサイレンシングして細胞死や細胞増殖への影響を検討した。PMVK ノックダウンにより細胞死誘導は認められなかったが、細胞増殖は p53 依存的に抑制された。そこで、PMVK をノックダウンした際の p53 シグナル経路の変化を検討した。mRNA 解析では、PMVK ノックダウンに伴い、p21/CDKN1A の発現増加が認められたが、アポトーシス遺伝子の BAX、NOXA、PUMA の増加は認められなかった。また、western blotting では、p53、p21/CDKN1A の発現増加が認められた。以上から PMVK のサイレンシングにより p53 経路が活性化することが明らかになった。

さらに、MCF-7 細胞を用いて PMVK ノックダウンによる細胞周期の変化が GGPP、FPP 添加によりレスキューされるかを検討した。PMVK ノックダウンによる S 期の減少、G1 停止は GGPP と FPP 添加により回復した。そこで、miR-874 を遺伝子導入した場合のアポトーシスが GGPP、FPP 添加により変化するかどうかを検討した。その結果、miR-874 導入に GGPP と FPP を添加すると、miR-874 導入のみの場合と比べて後期のアポトーシスは減少するが、早期アポトーシス分画の増加により、細胞生存率の回復は認められなかった。

最後に、TCGA データベースを用いた、乳がん臨床サンプルにおける miR-874 ならびに PMVK の発現解析を行った。乳がん組織とがん近傍の正常組織の遺伝子発現を比較すると、miR-874 はがん部で発現が低く、PMVK はがん部で高発現が認められた。miR-874 と PMVK の遺伝子発現の相関を検討すると、弱い逆相関が認められた。また KM plotter を用いて PMVK の高発現群と低発現群に分けて予後解析を行ったところ、全死亡率には差は見られなかったものの、無増悪生存率は PMVK が高い群の方が予後不良であった。以上のことか

ら、乳がんにおいて miR-874 は PMVK を標的として、がん抑制的に作用することが示された。

[考察]

今回我々は、乳がん細胞株において miR-874 が PMVK を標的としてメバロン酸経路を抑制すること、p53 依存的な細胞死誘導と p53 非依存的な細胞周期調節を介してがん抑制的に作用することを明らかにした。メバロン酸経路は、がんの増殖や進展に重要なステロイドやイソプレノイドの生合成経路である。p53 はメバロン酸経路を抑制することが報告されている。ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの 1 つ、ABCA1 は p53 の下流遺伝子であり、p53 を介した ABCA1 の発現が SREBP-2 の成熟化が抑制され、メバロン酸経路の遺伝子群の発現が低下する (Moon et al., Cell, 2019)。一方、変異型 p53 はメバロン酸経路の遺伝子のプロモーターにリクルートされ、これらの遺伝子の発現を上昇させる (Freed-Pastor et al., 2012)。メバロン酸経路の下流にあるイソプレノイドは、Rho や Ras など低分子量 G タンパク質のファルネシル化やゲラニルゲラニル化を介して細胞増殖やがんの浸潤、転移を促進する。そのため、PMVK ノックダウンによりメバロン酸経路の代謝物が減少した結果、p53 経路の活性化が生じたことが推測される。miR-874 遺伝子導入により MCF-7 細胞において顕著な細胞死誘導がみられたのに対して、PMVK ノックダウンでは、増殖抑制は生じたが、細胞死は認められなかった。miRNA は miR-874 導入により PMVK のほか、HMGCR、MVD、FDPS などメバロン酸経路の多段階における遺伝子発現が抑制されていたほか、miRNA は数百の標的遺伝子を持つ場合もあり、異なる細胞応答を示したと考えられる。

PMVK は汗孔の角化異常をきたす疾患、汗孔角化症の原因遺伝子の 1 つとして報告されている。不全角化細胞に p53 の発現が増加していることが報告されている。がんと PMVK の関係についてはこれまでほとんどないが、卵巣がんでは PMVK 高発現群において無増悪生存期間が長いことが報告されている (Kim et al., Cancers 2020)。しかし、p53 ステータス自体が予後に影響を及ぼす可能性があり、より詳細な解析が必要である。以上より、本研究では乳がん細胞において、miR-874 が p53 依存的なアポトーシスと p53 非依存的な細胞周期停止を誘導し、また PMVK を抑制してメバロン酸経路の調節を介してがん抑制機能に関与することが明らかとなった。miR-874 が乳がんの病態解明、診断マーカーの開発につながることを期待される。