

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	CHEN HUI WEN
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 大和 修
	副査 鹿児島大学 教授 白石 光也
	副査 鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査 鹿児島大学 教授 矢吹 映
	副査 山口大学 教授 谷 健二
審査協力者	鹿児島大学 教授 三浦 直樹
題 目	Analysis for differential expression profiles of microRNA in canine mammary gland tumor 犬の乳腺腫瘍におけるマイクロ RNA 発現差異の解析
<p>獣医領域でも人医領域でも腫瘍は大きな問題であり、国内外を問わず多くの研究が活発に行われている分野である。犬の腫瘍は、多くの面で人の腫瘍に類似していることが知られており、新規腫瘍関連の診断治療の適切なモデルとも考えられる。しかし、すべてが同じというわけではなく、犬の特異的な現象を的確にとらえ、比較することが獣医療研究として重要である。例えば、人では多くが悪性の乳癌であるが、犬の乳腺腫瘍では良性と分類されるものが約半数にみられる。また、人では乳癌は遺伝子関連マーカーなどによる分類も進んでおり、遺伝子関連マーカーが予後や治療の反応性に関与することも知られている。一方で獣医領域では病理学的な分類が主であり、未だ遺伝子関連マーカーは十分には確立されていない。</p> <p>近年では、次世代シーケンサーの技術改革も伴い、より多くの遺伝子情報を利用した研究が急増している。特に腫瘍分野では、coding RNA のみならず、non-coding RNA と呼ばれるたんぱく質に翻訳されない分子の重要性が明らかになっている。これらの広義の RNA 分子群が密接に関連することで疾患が発生し、また、そこに治療法が潜在していると考えられる。これらの non-coding の中で、マイクロ RNA は最も研究が進んでおり、特に特定の腫瘍に密接に関与する oncomir (癌性マイクロ RNA) も同定されてきている。また、人の腫瘍の研究では細胞株や遺伝子改変動物、さらにはヌードマウスに移植するような人工産物での研究が多い。一方で、獣医療機では日常的に犬の腫瘍疾患を診察するが、これらは自然発症したものである。犬の腫瘍の遺伝子やその発現形式の詳細なデータは人医療分野程多くはないことで、従来あまり比較されていない。</p> <p>本研究では、犬の腫瘍の中で乳腺腫瘍 (Mammary gland tumor: MGT) に着目して研究を展開した。犬の乳腺腫瘍を病理学診断分類に基づき RNA 分子発現を次世代シーケンス解析でスクリーニングし、標的となるマイクロ RNA の特異的変化を選出した。特に特定の乳腺腫瘍で発現が特徴的</p>	

に変化するマイクロ RNA の検出 (第一章) とより多くの乳腺腫瘍サンプルを利用した次世代シーケンス解析では比較的大きめなコホート研究で、乳腺腫瘍のマイクロ RNA 発現の多様性 (第二章) に分けて、解析した。

【第一章】次世代シーケンサーを用いて、犬の MGT で発現変化するマイクロ RNA を同定し、その後、ターゲットとした遺伝子をリアルタイム PCR 解析で確認することを目的として研究が行われた。乳腺組織は、健康な犬 (n=7) および腫瘍が疑われる犬 (n=80) から採取された。各腫瘍群で代表的なサンプルで次世代シーケンス解析し、*in silico* の解析ソフト CLC Genome WorkbenchRNA を使用してターゲットのマイクロ RNA を同定した。TargetScan により、マイクロ RNA の標的遺伝子を予測し、遺伝子オントロジー (GO) と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベース (DAVID) を用いてターゲットマイクロ RNA の標的とする遺伝子の機能の予測解析を検討した。結果として、4つのマイクロ RNA (cfa-miR-1-3p, cfa-miR-133a-3p, cfa-miR-133b-3p, cfa-miR-133c-3p) が、正常乳腺組織に比較して腫瘍でダウンレギュレートされていることを同定した。KEGG 解析の結果、cfa-miR-1-3p の標的遺伝子は Rap1 シグナル伝達経路、adherence junction、Ras シグナル伝達経路に関連し、miR-133 ファミリーは TGF- β シグナル伝達経路、シナプス小胞サイクル、スフィンゴ糖脂質シグナル伝達経路に関連していることが判明した。これらの標的遺伝子を組み合わせると、転写調節や DNA 結合転写 (GO 解析)、Hippo シグナル伝達経路、adherence junction、エンドサイトーシス (KEGG 解析) に関連することが予測された。

【第二章】マイクロ RNA の網羅的な発現パターンと組織学的分類との関連について検討した。第一章のサンプルに加え、犬の MGT 細胞株からも得た (n=5)。転移性腫瘍組織と非転移性組織および正常組織とで発現が異なるマイクロ RNA を対象とした。次世代シーケンス解析から 6つのマイクロ RNA (cfa-miR-187-3p, cfa-miR-202-5p, cfa-miR-424-5p, cfa-miR-450a-5p, cfa-miR-450b-5p, および cfa-miR-542-3p) を選択し、追加のリアルタイム PCR 解析を行った。リアルタイム PCR 解析により、マイクロ RNA の発現変化は再現性をもって確認された。さらに、病理学的診断が確定したサンプル (79 例) を用いて、選択されたマイクロ RNA に基づく階層的クラスタリング解析を実施した。その結果、79 の乳腺腫瘍は 5つのクラスターに分類された。リアルタイム PCR による階層型クラスタリングでは、少数の代表的なサンプルを抽出して解析した次世代シーケンス解析によるクラスタリングに比べて、病理学的診断の散らばりが著しく、階層型クラスタリングの分類が病理組織学的サブタイプ分類と一致していないことが示された。

結論として、申請者の研究では、これまでの報告はない比較的大規模な犬の MGT のマイクロ RNA 発現プロファイルの発現パターンの網羅的解析を実施できた。犬乳腺腫瘍における cfa-miR-1-3p および cfa-miR-133 ファミリーの発現低下を示し、転移性および非転移性 MGT における全マイクロ RNA 発現パターンを報告した。また、組織学 MGT サブタイプ診断とマイクロ RNA 発現の多様性を確認した。これらの知見は、犬の MGT に関する既存の知見に加え、人の医療と同様に分子マーカーの必要性を示唆するものであり、また、選出されたマイクロ RNA は今後の診断や治療の改善につながる可能性を示唆するものであった。

これら一連の研究は、適正な手法で実験が行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を適切に引用しながら科学的に考察されていた。本研究の成果は獣医臨床領域と人医療領域の診断と病態解明に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位に十分に値すると判断された。