

論文審査の要旨

報告番号	総研第 362 号	学位申請者	俣木 浩子
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	佐藤 雅美	副査 橋口 照人
	副査	西尾 善彦	副査 畑中 一仁

Tumor-suppressive *microRNA-206* as a dual inhibitor of *MET* and *EGFR* oncogenic signaling in lung squamous cell carcinoma.

(腫瘍抑制性 *microRNA-206* は肺扁平上皮癌において *MET*、*EGFR* による腫瘍促進性シグナルを抑制する)

学位申請者らはマイクロアレイを用いた機能性 RNA 発現プロファイルを作成し、発現抑制が認められた *microRNA* (*miRNA*) についての機能解析と、制御する分子ネットワークの探索を行ってきた。今回、肺扁平上皮癌臨床検体における *miRNA* array による発現解析で、*microRNA-206* (*miR-206*) の発現は正常肺組織と比較して抑制されていた。そこで、発現が抑制されている *miRNA* が腫瘍抑制性 *miRNA* であるとの仮説をたて、*miR-206* の機能解析と *miRNA* の制御する分子ネットワークの探索を行った。

肺扁平上皮癌臨床検体 (n=32)、正常肺組織 (n=22) から RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *miR-206* の発現を解析した。肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1 細胞に *miR-206* を核酸導入し、細胞増殖アッセイや細胞周期解析などの機能解析をおこなった。公共のデータベース (TargetScan database、Gene Expression Omnibus、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics pathway categories) を用いた *in silico* 解析にて *miR-206* の制御する標的遺伝子を探索した。さらに、EBC-1 細胞に *miR-206* を核酸導入し、*miR-206* による標的遺伝子およびその下流経路の抑制を検証した。標的候補遺伝子の *miR-206* の予測結合配列をクローニングして、EBC-1 細胞に *miR-206* とともに遺伝子導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて *miR-206* と標的遺伝子の直接的な結合を検証した。

本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) *miR-206* は、正常肺組織に比べ肺扁平上皮癌臨床検体、肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1 細胞で有意に発現が抑制されていた ($p < 0.0001$)。
- 2) *miR-206* を EBC-1 細胞に核酸導入すると、アポトーシスが誘導され、G0/G1 期の cell cycle arrest を起こして細胞増殖が抑制された ($p < 0.0001$)。
- 3) *miR-206* の制御する分子ネットワークを探索した結果、癌関連遺伝子である *MET*、*EGFR* が標的候補遺伝子として見いだされた。
- 4) *miR-206* を EBC-1 細胞に核酸導入すると、mRNA レベル (qRT-PCR 法、 $p < 0.001$) 及び蛋白レベル (Western blotting) で *MET* 及び *EGFR* の発現が抑制された。さらに *MET* 及び *EGFR* とその下流経路の活性化を抑制すること (p-*MET*、p-*EGFR*、p-*AKT*、p-*ERK*) も明らかになった。
- 5) ルシフェラーゼレポーターアッセイで *miR-206* が *MET* および *EGFR* を直接制御することを示した。

本研究により、肺扁平上皮癌において *miR-206* は *EGFR* 及び *MET* を直接制御する腫瘍抑制性 *microRNA* であることが明らかになった。これらの結果から *miRNA* を起点とした分子ネットワークの解析は、病態形成に関与するメカニズムの解明や新規治療開発に繋がる可能性があることが示唆され、今後の発展が期待できる重要な研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。