

論文審査の要旨

報告番号	総研第 399 号	学位申請者	米森 雅也
審査委員	主査	小澤 政之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 有田 和徳
	副査	小林 裕明 印	副査 速見 浩士

Dual tumor-suppressors *miR-139-5p* and *miR-139-3p* targeting *matrix metalloprotease 11* in bladder cancer. (膀胱癌において癌抑制型 *miR-139-5p*, *miR-139-3p* は共に *MMP11* を標的とする)

学位申請者らは、次世代シーケンサーを用いた膀胱癌・全ゲノム網羅的機能性 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それら miRNA が制御する分子ネットワークの探索を行ってきた。今回、臨床検体における全ゲノム網羅的解析で、*pre-miR-139* から派生する *miR-139-5p* (guide 鎖)、*miR-139-3p* (passenger 鎖) は共に膀胱癌検体では正常膀胱検体と比べて抑制されていた。そこで膀胱癌においてこれら miRNA は共に癌抑制型 miRNA であるとの仮説を立て、その機能解析と標的分子ネットワークの探索を行った。

膀胱癌検体 (n=62)、正常膀胱検体 (n=23) から抽出した RNA を用いて qRT-PCR 法により *miR-139-5p*、*miR-139-3p*、及びその host 遺伝子である *PDE2A* の発現を測定した。これら miRNA と *PDE2A* の発現低下の理由を探索するために、膀胱癌細胞株 (T24、BOY) に脱メチル化剤 (5-Aza-CdR) を添加して膀胱癌におけるこれら miRNA の発現と DNA メチル化との関連について検討した。また膀胱癌細胞株にこれら miRNA を核酸導入して機能解析を行った。公共データベース (Gene Expression Omnibus、microRNA.org) を用いた *in silico* 解析にて *miR-139-5p*、*miR-139-3p* に共通の標的遺伝子を探索して、臨床検体における発現と臨床病理学的所見との関係を検討した。ルシフェラーゼアッセイにてこれら miRNA と標的遺伝子の直接的な結合を検証した。その結果以下の知見が明らかにされた。

- 1) *miR-139-5p*、*miR-139-3p* 及びその host 遺伝子である *PDE2A* の発現は、正常膀胱組織に比較して膀胱癌組織・癌細胞株では有意に抑制されていた。またこれら miRNA と *PDE2A* の発現は互いに正の相関が認められた。
- 2) 膀胱癌細胞株に脱メチル化剤を添加すると *miR-139-5p*、*miR-139-3p* 及び *PDE2A* の発現は回復した。これら miRNA と *PDE2A* の発現低下は DNA メチル化が関与している可能性が示唆された。
- 3) *miR-139-5p*、*miR-139-3p* を膀胱癌細胞株に核酸導入すると、癌細胞の遊走、浸潤は有意に抑制された。
- 4) *miR-139-5p*、*miR-139-3p* の制御する分子ネットワークを探索した結果、細胞外基質の分解に関与する遺伝子群 matrix metalloprotease family に属する *MMP11* を miRNA の共通の標的候補遺伝子として抽出した。
- 5) *MMP11* の発現を small interfering RNA (siRNA) によりノックダウンすると、癌細胞の遊走、浸潤は有意に抑制された。
- 6) ルシフェラーゼアッセイにてこれら miRNA が *MMP11* を直接制御することが明らかにした。
- 7) *MMP11* の発現は、正常膀胱と比較して膀胱癌にて有意に発現が亢進していた。また *MMP11* の発現はリンパ節転移群 (P=0.013)、遠隔転移群 (P=0.022) で有意に高値であり、さらに高発現群では全生存率の有意な低下が認められた (P=0.029)。

本研究により、膀胱癌において *miR-139-5p* (guide 鎖) 及び *miR-139-3p* (passenger 鎖) は *MMP11* を直接制御する事により癌抑制型 miRNA として機能していることが明らかになった。また癌抑制型 *miR-139-5p*、*miR-139-3p* を起点とした膀胱癌の新規分子ネットワークの解析は、発癌メカニズムや新しい治療法の開発につながる可能性が示唆された。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。