

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 1520 号	学位申請者	大迫 洋一
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 武田 泰生
	副査	谷口 昇	副査 速見 浩士

**Potential tumor-suppressive role of microRNA-99a-3p in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells through the regulation of RRM2. (スニチニブ耐性腎細胞癌における *RRM2* の制御を介した *microRNA-99a-3p* の腫瘍抑制効果の可能性)**

スニチニブは VEGF キナーゼ活性を阻害することで強力な血管新生阻害作用を有し、進行腎癌に対する一次治療として特に IMDC (International mRCC Database Consortium) 分類で低リスク群、中リスク群で広く使用されている。臨床においてはその耐性獲得が重大な問題であり、スニチニブ治療抵抗性腎癌に対する新規治療戦略の確立は重要である。学位申請者らは泌尿器癌において、発現抑制が認められた microRNA についての機能解析とそれら microRNA が制御する分子ネットワークの探索をおこなってきた。今回、過去の報告からスニチニブ投与により発現が低下した *microRNA-99a-3p* に着目し、癌抑制型 microRNA であると仮説を立て、その機能解析と標的分子ネットワークの探索を行った。

過去に当科で作成し報告したスニチニブ耐性 786-o 腎癌細胞株 (SU-R-786-o) を含めた複数の腎癌細胞株と正常腎細胞を用いて、RT-qPCR 法により、*microRNA-99a-3p* の発現を測定した。腎癌細胞株 (ACHN, 786-o) と SU-R-786-o 株にこの microRNA を核酸導入し、細胞機能解析を行った。公共データベースを用いた *in silico* 解析と RNA シークエンス解析を用いて *microRNA-99a-3p* の標的遺伝子を探索し、腎癌細胞株、スニチニブ耐性株における発現解析とさらに標的遺伝子ノックダウンによる機能解析を行った。またこの標的遺伝子のコードする蛋白の阻害剤を使用して、腎癌細胞株、スニチニブ耐性株において機能解析を行った。その結果、以下の知見が明らかにされた。

- 1) SU-R-786-o 株において *microRNA-99a-3p* は 786-o 株に比べて有意に発現が抑制されていた。
- 2) 腎癌細胞株 (ACHN, 786-o)、また SU-R-786-o 株に *microRNA-99a-3p* を核酸導入すると癌細胞の増殖能、colony 形成が抑制され、また apoptosis を有意に誘導した。
- 3) *in silico* 解析と RNA シークエンス解析より SU-R-786-o 株における *microRNA-99a-3p* の標的候補遺伝子として *RRM2* (*ribonucleotide reductase regulatory subunit M2*) を抽出した。
- 4) 腎癌細胞株 (ACHN, 786-o)、また SU-R-786-o 株に *microRNA-99a-3p* を核酸導入すると *RRM2* の発現が有意に抑制された。
- 5) ルシフェラーゼアッセイにより *microRNA-99a-3p* が *RRM2* を直接制御することが示唆された。
- 6) *RRM2* の siRNA を使用して loss of function study を行うと、腎癌細胞株ならびに SU-R-786-o 株において増殖能さらに colony 形成が抑制され、また apoptosis を有意に誘導した。
- 7) *RRM2* の阻害剤 Didox を投与し、腎癌細胞株ならびに SU-R-786-o 株において増殖能さらに colony 形成の抑制、また apoptosis の有意な誘導を確認した。

本研究により、*microRNA-99a-3p* はその標的遺伝子である *RRM2* の制御を介してスニチニブ耐性腎癌細胞株において癌抑制的作用を有することが明らかとなった。また癌抑制型 *microRNA-99a-3p* から探索したスニチニブ耐性腎癌細胞株における新規分子ネットワークの解析は、治療困難となっている進行性腎癌の新規治療に繋がることが期待できる。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。