

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第	557号	学位申請者	内田 章文
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査	佐藤 雅美
	副査	古川 龍彦	副査	久保田 龍二

### Regulation of *KIF2A* by Antitumor *miR-451a* Inhibits Cancer Cell Aggressiveness Features in Lung Squamous Cell Carcinoma

(肺扁平上皮癌において癌抑制型 *miR-451a* は *KIF2A* を制御して肺癌細胞の進展を抑制する)

学位申請者は、microRNAによる癌の制御に着目し、有効な治療選択肢が限られている肺扁平上皮癌の病態解明に関する研究を継続している。今回、肺扁平上皮癌において重要な癌抑制型 microRNA である *miR-144-5p*、*-3p* と cluster を形成している *miR-451a* に着目し、*miR-451a* の機能解析と *miR-451a* が制御する機能性 RNA ネットワークの解析を行った。

肺扁平上皮癌手術検体を用いて、肺扁平上皮癌部 (n=30) および非癌正常肺組織 (n=20) から全 RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *miR-451a* の発現を解析した。肺扁平上皮癌細胞株である EBC-1、SK-MES-1 に *miR-451a* を核酸導入し、増殖能、遊走能、浸潤能の評価を行った。公共のデータベース (TargetScanHuman、Gene Expression Omnibus) と *miR-451a* を核酸導入した肺扁平上皮癌細胞株での遺伝子発現データを統合し、*miR-451a* が制御する標的遺伝子候補を選出した。臨床データベース解析には、TCGA database、cBioPortal、OncoPrint を利用し、統計学的手法にて解析した。*miR-451a* による標的遺伝子の抑制効果は、qRT-PCR 法、Western blotting で評価した。*miR-451a* と標的遺伝子の直接的な結合は、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより検証した。臨床検体における標的遺伝子の蛋白発現を免疫染色にて評価した。また、標的遺伝子の siRNA を核酸導入した細胞株を用いて機能解析を行い、さらに標的遺伝子によって制御を受ける分子経路について KEGG pathway categories を利用して探索した。

その結果、本研究では以下の知見を明らかにした。

- 1) 肺扁平上皮癌部では、非癌正常肺組織と比較して *miR-451a* の発現は有意に低下していた。
- 2) TCGA database による解析で、*miR-451a* の発現低下は、生存予後不良、再発に関与していた。
- 3) *miR-451a* を核酸導入した肺扁平上皮癌細胞株において、増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。
- 4) 公共のデータベースと *miR-451a* を核酸導入した肺扁平上皮癌細胞株での遺伝子発現データから、肺扁平上皮癌において *miR-451a* により制御を受ける標的遺伝子候補として、*KIF2A* (kinesin family member 2A) を選出した。
- 5) TCGA database による解析で、*KIF2A* の発現亢進は、生存予後不良、再発に関与していた。
- 6) *miR-451a* を核酸導入した肺扁平上皮癌細胞株では、mRNA、蛋白レベルで、*KIF2A* の発現が抑制された。
- 7) ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*miR-451a* が *KIF2A* の 3'UTR に直接結合することを確認した。
- 8) TCGA database による解析で、臨床検体での *miR-451a* と *KIF2A* の発現には、負の相関がみられた。
- 9) 肺扁平上皮癌臨床検体での免疫染色で、正常部と比較して癌部での *KIF2A* の高発現を確認した。
- 10) siRNA を用いて *KIF2A* を knock down した肺扁平上皮癌細胞株では、増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。
- 11) *KIF2A* を knock down した肺扁平上皮癌細胞株での遺伝子発現データから、*KIF2A* が制御する分子経路として、cell cycle、p53 signaling pathway、DNA replication が選出された。

本研究により、肺扁平上皮癌において、*miR-451a* は癌抑制型 microRNA として機能し、癌促進遺伝子である *KIF2A* を直接制御すること、*miR-451a* の発現低下、*KIF2A* の発現亢進は、肺扁平上皮癌の予後不良因子となることが明らかになった。今回の解析のように、癌抑制型 microRNA を起点とした癌関連遺伝子の探索は、肺扁平上皮癌の病因や進展の機序を解明でき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。