

論文審査の要旨

報告番号	総研第 584 号	学位申請者	和田 真澄
審査委員	主査	中川 昌之	学位
	副査	井上 博雅	副査
	副査	谷本 昭英	副査
			博士 (医学)
			橋口 照人
			古川 龍彦

RNA sequencing-based microRNA expression signature in esophageal squamous cell carcinoma: oncogenic targets by antitumor miR-143-5p and miR-143-3p regulation

(RNA シークエンスによる食道扁平上皮癌・マイクロ RNA 発現プロファイルの作成：
癌抑制型 miR-143-5p と miR-143-3p が制御する癌促進型遺伝子の影響)

日本では食道癌患者の 90%以上が食道扁平上皮癌と診断されており、毎年約 23,000 人が新たに罹患し、10,000 人が死亡している。食道扁平上皮癌の臨床において、近年開発が相次いでいる分子標的治療薬も食道扁平上皮癌の再発症例・遠隔転移症例に対しては効果が乏しく、新しい治療選択肢が求められている。申請者は、食道扁平上皮癌の機能性 RNA ネットワークの探索は、食道扁平上皮癌の再発や遠隔転移の分子機序解明と、治療標的分子の探索に繋がると考えた。

本研究では、(1) RNA シークエンスを用いた解析から、食道扁平上皮癌の miRNA 発現プロファイルを作成すること、(2) プロファイルに基づいて、miR143-5p (passenger strand), miR-143-3p (guide strand)の癌抑制機能を明らかにすること、(3) miR-143-5p, miR-143-3p を起点として、食道扁平上皮癌に特徴的な癌促進的遺伝子を探索することを目的とした。

申請者は、食道扁平上皮癌のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、発現が抑制されていた miR-143-5p/3p を食道扁平上皮癌細胞株 (TE-1, TE-8) に導入し、細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を評価した。miRNA の標的分子探索は、マイクロアレイ遺伝子発現解析と公共のデータベース(The Cancer Genome Atlas (TCGA) 等) を利用し、ゲノム科学的手法で解析した。標的遺伝子の蛋白質(HMGA2 と KRT80)の臨床検体における発現は免疫染色で評価した。miR-143-5p, miR-143-3p による標的遺伝子の抑制効果は、miR-143-5p, miR-143-3p 導入細胞より蛋白・RNA を抽出し、Western Blotting, qRT-PCR により検討した。また、ルンフェラーゼアッセイにより miR-143-5p と予測結合配列 (標的遺伝子 mRNA) の結合を評価した。

その結果、以下の知見が得られた。

- ① 食道扁平上皮癌の miRNA 発現プロファイルから、47 種の miRNA が癌部において発現が抑制されていた。本研究では、miR-143 前駆体から派生する miR-145-5p (passenger strand) と miR-143-3p (guide strand) に着目した。
- ② miR-143-5p と miR-143-3p を食道癌細胞株 (TE-1, TE-8) に核酸導入することで、癌細胞の浸潤能、遊走能の顕著な抑制を認めた。
- ③ miR-143-5p と miR-143-3p が制御する機能性ネットワークの探索を行った結果、miR-143-5p については 6 つの遺伝子 (HNI, HMGA2, NETO2, STMN1, TCF3, MET) が、miR-143-3p については 1 つの遺伝子 KRT80 が食道扁平上皮癌の癌促進的遺伝子の候補であることを示した。
- ④ siRNA を用いて miR-143-5p の標的遺伝子である HMGA2, miR-143-3p の標的遺伝子である KRT80 をノックダウンすることで、扁平上皮癌の増殖能、遊走能、浸潤能の顕著な抑制を認めた。

本研究では、癌抑制型 miR-143-5p/3p が制御する遺伝子の探索から、両マイクロ RNA が制御する癌促進的遺伝子の探索を行い、HMGA2 および KRT80 を見出した。今回作成した食道扁平上皮癌の miRNA 発現プロファイルには、癌抑制型マイクロ RNA 候補が多数含まれており、食道扁平上皮癌の新たな予後予測マーカーや治療標的分子の探索において有効な情報を提供し、本プロファイルに基づいて、食道扁平上皮癌の新規分子ネットワークを発展させるなど食道癌の悪性化機構の理解に有用である。

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。