

論文審査の要旨

報告番号	総研第 600 号	学位申請者	美園 俊祐
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 佐藤 雅美
	副査	武田 泰生	副査 大塚 隆生

Molecular Pathogenesis of Gene Regulation by the *miR-150* Duplex: *miR-150-3p* Regulates *TNS4* in Lung Adenocarcinoma

miR-150 duplex による遺伝子制御: 肺腺癌において、*miR-150-3p* は *TNS4* を制御する。

学位申請者は、マイクロ RNA による癌の制御に着目し、肺腺癌を対象とする研究を行った。*miR-150-5p* と *miR-150-3p* は、頭頸部扁平上皮癌、食道癌において癌抑制型マイクロ RNA として機能することが報告されている。また、学位申請者らは肺扁平上皮癌において、*miR-150-5p* は癌抑制型マイクロ RNA として機能し、*MMP14* を制御することを以前に報告した。しかし、肺腺癌における *miR-150-5p* と *miR-150-3p* の機能についての報告は少ない。本研究では肺腺癌において二本鎖 *miR-150* の機能解析とパッセンジャー鎖である *miR-150-3p* が制御する標的遺伝子の探索、検証を行った。

肺腺癌手術検体を用いて、癌部 (n=18) および非癌部 (n=28) から RNA を抽出し、qRT-PCR 法により *miR-150-5p* /-*3p* の発現を解析した。肺腺癌細胞株である A549、H1299 に *miR-150-5p* /-*3p* 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と、*miR-150-3p* を核酸導入した A549 の遺伝子発現データとを統合し、*miR-150-3p* が制御する標的候補遺伝子を選出した。標的候補遺伝子に関して、*miR-150-3p* を核酸導入した A549 での mRNA とタンパク質の発現を qRT-PCR 法、Western blotting で評価した。Luciferase reporter assay により、*miR-150-3p* と標的候補遺伝子の直接的な結合を検証した。さらに A549 において、標的遺伝子の siRNA を用いて loss-of-function assay を、H1299 において、標的遺伝子の発現ベクターを用いて gain-of-function assay を行った。臨床検体における標的候補遺伝子の蛋白発現を免疫染色で評価した。

本研究では以下の知見が明らかになった。

- 1) *miR-150-5p* /-*3p* は正常肺組織と比較し、肺腺癌組織および肺腺癌細胞株 A549、H1299 で有意に発現が低下していた。
- 2) *miR-150-5p* /-*3p* を核酸導入した細胞株 (A549、H1299) において増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。
- 3) *miR-150-3p* を核酸導入した A549 の遺伝子発現データと、公共のデータベースから、*miR-150-3p* が制御する標的候補遺伝子として 26 個の遺伝子を抽出した。最終的に、肺腺癌において、高発現が予後不良と関連する Tensin 4 (*TNS4*) に着目した。
- 4) *miR-150-3p* を核酸導入した A549 において、*TNS4* の発現が抑制された。
- 5) Luciferase reporter assay で、*miR-150-3p* が *TNS4* の 3' UTR へ直接結合することを確認した。
- 6) si-*TNS4* を核酸導入した A549 において増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。
- 7) *TNS4* の発現ベクターを核酸導入して、*TNS4* を過剰発現させた H1299 において遊走能、浸潤能が亢進した。
- 8) 臨床検体の免疫染色にて、肺腺癌において非癌部と比較して、*TNS4* の高発現を確認した。

本研究では、肺腺癌において *miR-150-5p* /-*3p* は癌抑制型マイクロ RNA であり、パッセンジャー鎖である *miR-150-3p* は標的遺伝子である *TNS4* を直接制御することを明らかにした。解析の結果、肺腺癌において *TNS4* 癌促進遺伝子は *miR-150-3p* の低下を介して発現上昇することを示し、治療標的になりうると考えられた。

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。