

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 623 号	学位申請者	保坂 優斗	
審査委員	主査	井戸 章雄	学位	博士 (医学)
	副査	井上 博雅	副査	古川 龍彦
	副査	榎田 英樹	副査	山田 保俊

**Molecular pathogenesis and regulation of the miR-29-3p-family: Involvement of ITGA6 and ITGB1 in intrahepatic cholangiocarcinoma**

(miR-29-3p-family の分子病態と制御：—肝内胆管癌における *ITGA6* と *ITGB1* の関与—)

肝内胆管癌は原発性肝癌の中で肝細胞癌に次いで 2 番目に頻度の高い癌種である。外科的切除が第一選択肢であるが、診断時に根治切除の対象となる患者は全体の 30% 以下であり根治切除症例でも 5 年生存率は 30% 程度と極めて予後不良である。また外科的切除が望めない患者に対しては殺細胞性化学療法を行うが、十分な治療効果が得られていない。そのため、肝内胆管癌患者の予後改善には早期診断システムの開発と新たな治療選択肢が求められる。

そこで、本研究は microRNA (miRNA) が制御する肝内胆管癌の悪性化に関わる分子病態を解明することを目的とした。肝内胆管癌の miRNA 発現プロファイルから *miR-29-3p-family* (*miR-29a-3p*, *miR-29b-3p*, *miR-29c-3p*) に着目し、*miR-29-3p-family* の癌抑制機能とこれらが制御している癌遺伝子ネットワークを明らかにすることとした。

申請者は肝内胆管癌細胞株 (HuCCT1, RBE) に miRNA precursor および siRNA を用いて核酸導入を行い、肝内胆管癌細胞の増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。miRNA の標的分子の探索には公共のデータベース (TargetScanHuman, Gene Expression Omnibus (GEO) database, The Cancer Genome Atlas (TCGA)) を利用し、候補となる分子を選定した。*miR-29-3p* を核酸導入した肝内胆管癌細胞株から mRNA および蛋白を抽出し、q-PCR 法およびウェスタンブロット法で標的分子の抑制効果を確認した。またルシフェラーゼアッセイにより標的 mRNA と *miR-29-3p* との直接結合を評価した。標的タンパク分子の臨床検体における発現は免疫組織化学染色法で評価した。その結果、以下の知見が得られた。

- ① *miR-29-3p-family* それぞれの miRNA precursor を肝内胆管癌細胞株に核酸導入することで、癌細胞の浸潤能および遊走能が抑制されることを明らかにした。
- ② TargetScanHuman と TCGA のデータベースを用いて肝内胆管癌で *miR-29-3p-family* が制御する癌促進型 mRNA を探索し、888 個の mRNA と 20 の癌促進経路を明らかにした。
- ③ その中で多数の癌促進経路に関与する *ITGA6/ITGB1* に着目し、*ITGA6/ITGB1* が *miR-29-3p-family* により発現が直接制御されていることを確認した。
- ④ *ITGA6/ITGB1* を siRNAs でノックダウンすることで肝内胆管癌細胞の増殖能、浸潤能および遊走能が抑制されることを明らかにした。
- ⑤ Gene Codis と文献を基に *ITGA6/ITGB1* の 6 個の転写促進因子 (*SP1*, *CREB1*, *MAX*, *FHL2*, *RFX1* and *HIF1A*) が *ITGA6/ITGB1* の発現と相関を示すことを明らかにした。その中で *SP1* は *miR-29-3p* の結合部位をもち、*miR-29-3p* により発現が直接制御されていることを明らかにした。

本研究では肝内胆管癌における癌抑制型マイクロ RNA である *miR-29-3p-family* が *ITGA6/ITGB1* および転写因子である *SP1* の発現を直接制御している事を明らかにした。肝内胆管癌細胞では、*miR-29-3p-family* の発現抑制により、*ITGA6/ITGB1* を介した癌分子経路の活性化が起きていると考えられる。今後、この分子経路の詳細な解析から本疾患の治療標的分子が明らかになる可能性があることを示した。

癌抑制型マイクロ RNA を起点とした癌遺伝子および癌分子経路の探索によって、肝内胆管癌の悪性化の分子機序として *miR-29-3p* の抑制が *ITGA6* と *ITGB1* 発現亢進に作用している可能性を示した。新たな miR による診断方法の発展で期待できる。

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。