

## 論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 673 号		学位申請者	玉井 元規
審 査 委 員	主 査	橋口 照人	学 位	博士 (医学)
	副 査	井上 博雅	副 査	西尾 善彦
	副 査	家入 里志	副 査	大塚 隆生

***microRNA-99a-5p* induces cellular senescence in gemcitabine-resistant bladder cancer by targeting *SMARCD1***

(*microRNA-99a-5p* は *SMARCD1* を標的としてゲムシタピン抵抗性膀胱癌の細胞老化を誘導する)

進行性膀胱癌に対する一次治療としてゲムシタピン (GEM) とシスプラチン (CDDP) を用いた併用化学療法 (GC 療法) が推奨されている。しかしながら全生存期間の中央値は 14 か月程度であり、化学療法に対する耐性化が問題となっている。CDDP 耐性に関する研究は多く報告されているものの、GEM 耐性に関する報告は限られており、本研究は GEM 耐性に着目し、新たな治療法の可能性を検討した。

始めにヒト膀胱癌細胞株 (BOY, T24) を GEM 添加培養液で 12 ヶ月ほど継続して培養し、GEM 耐性株 (GEM-R-BOY, GEM-R-T24) を樹立した。IC50 に関しては異なる GEM 濃度を添加し、増殖アッセイにて確認した。親株、耐性株で small RNA シークエンス解析を行い、GEM 耐性に関与している microRNA (miRNA) を検索した。候補 miRNA を GEM 耐性株に形質導入して機能解析を行った。次に RNA 次世代シークエンス解析を用いて標的分子の検索を行い、標的 mRNA に関してノックダウンによる機能解析を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) GEM-R-BOY・GEM-R-T24 細胞株は親株と比べ IC50 で 7 倍以上の濃度差を認め、*in vitro* / *in vivo* ともに有意に GEM 抵抗性を示した。
- 2) 次世代シークエンス解析を含めた *in silico* 解析で *miR-99a-5p* を候補に挙げた。*miR-99a-5p* の過剰発現は増殖能、遊走能、浸潤能を抑制し、GEM 耐性株において GEM 感受性が改善することが示された。
- 3) *miR-99a-5p* の標的分子として、RNA シークエンス解析から *SMARCD1* に着目した。デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイでは、*miR-99a-5p* が *SMARCD1* を直接制御することが示された。
- 4) si-RNA を用いた *SMARCD1* のノックダウンでは増殖能、遊走能、浸潤能が抑制され、GEM 感受性が回復した。
- 5) *miR-99a-5p* の過剰発現や *SMARCD1* のノックダウンは *in vivo* においても増殖能を抑制した。
- 6)  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色により、*miR-99a-5p* の過剰発現と *SMARCD1* のノックダウンが、p21 の誘導を通じて細胞老化に寄与していることが示された。

膀胱癌細胞株において *miR-99a-5p* の過剰発現や *SMARCD1* の抑制により、細胞老化が誘導され、GEM 感受性が回復することがわかった。これらが GEM 耐性を克服する鍵となる分子であることが明らかになったことで、膀胱癌の理解が深まり、新たな治療戦略の開発につながる事が期待される。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。