

論文審査の要旨

報告番号	総研第 707 号	学位申請者	安留 龍太郎
審査委員	主査	上野 真一	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	井上 博雅	副査 榎田 英樹
	副査	水野 圭子	副査 山田 保俊

Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer: Impact of Oncogenic Targets Regulated by Tumor Suppressive *miR-139-3p*

(大腸癌の分子病態: 癌抑制型マイクロ RNA (*miR-139-3p*) により制御される癌促進型遺伝子の影響)

大腸癌は世界で3番目に多い癌で、癌関連死亡の第2位の原因である。大腸癌は早期に診断されれば比較的予後良好だが、進行例では5年生存率は約14%と予後不良である。初診時、大腸癌患者の約14~18%が転移を有しており、切除不能例に対するさらなる治療戦略の獲得が望まれる。

本研究では、大腸癌 miRNA 発現プロファイルより *miR-139-3p* (*pre-miR-139* の passenger strand) に注目し、大腸癌細胞におけるその機能的意義と標的癌遺伝子について検討した。

申請者は大腸癌細胞株(HCT116、DLD-1)に miRNA precursor および siRNA を用いて核酸導入を行い、大腸癌細胞の増殖能、浸潤能および遊走能を評価した。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-139-3p* を核酸導入した大腸癌細胞株から 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。デュアルルシフェラーゼレポートアッセイおよび RNA immunoprecipitation(RIP)アッセイにより標的 mRNA と *miR-139-3p* との直接結合を評価した。標的蛋白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-139-3p* の miRNA precursor を大腸癌細胞株に核酸導入することで、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。
- ② TargetScanHuman と TCGA のデータベースを用いて大腸癌で *miR-139-3p* が制御する癌促進型 mRNA を探索し、29 個の mRNA を明らかにした。
- ③ その中から正常大腸組織でほとんど発現がなく、大腸癌組織のみで発現上昇している Keratin 80 (*KRT80*)に着目し、*KRT80* が *miR-139-3p* により発現が直接制御されていることを確認した。
- ④ *KRT80* を siRNA でノックダウンすることで大腸癌細胞の増殖能、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 大腸癌細胞株において *miR-139-3p* および *KRT80* siRNA の核酸導入により、AKT のリン酸化が抑制されることを明らかにした。
- ⑥ *miR-139-3p* 及び *KRT80* siRNA を核酸導入した大腸癌細胞株から抽出した mRNA をアレイ解析した結果より両分子により *HK2* の発現が制御されていることを明らかにした。また、*HK2* が *miR-139-3p* によって直接制御されることを明らかにした。

本研究では大腸癌における癌抑制型マイクロ RNA である *miR-139-3p* が *KRT80* および *HK2* の発現を直接制御している事を明らかにした。特に、*miR-139-3p* の核酸導入は大腸癌細胞の AKT のリン酸化を顕著に抑制した。また、*miR-139-3p* の直接の標的である *KRT80* の異常発現が大腸癌細胞の悪性化を促進することを明らかにした。大腸癌の発症に miRNA の passenger strand とその標的遺伝子が関与していることは、新しい概念であり、大腸癌の分子病態に新たな知見を与えるものである。

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。