

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 353 号		学位申請者	松下 良介
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堂地 勉	副査	武田 泰生
	副査	夏越 祥次	副査	速見 浩士

**Tumour-suppressive *microRNA-144-5p* directly targets *CCNE1/2* as potential prognostic markers in bladder cancer.** (膀胱癌において癌抑制型 *microRNA-144-5p* は、予後マーカーとなる *Cyclin E1/E2* を直接的に制御する)

学位申請者らは、次世代シーケンサーを用いた膀胱癌・全ゲノム網羅的機能性RNA発現プロファイルを作成し、発現抑制が認められたmicroRNA (miRNA) についての機能解析と、制御する分子ネットワークの探索を行ってきた。今回、臨床検体における全ゲノム網羅的解析で、クラスターを形成する *miRNA-451a/144-3p/144-5p* の発現は膀胱癌検体では正常膀胱検体に比べて抑制されていた。そこでこれらのmiRNA が癌抑制型 miRNA であるとの仮説を立て、その機能解析と標的分子ネットワークの探索を行った。

膀胱癌検体 (n=60)、正常膀胱検体 (n=22) から抽出した RNA を用いて stem-loop PCR 法により *miRNA-451a/144-3p/144-5p* の発現を測定した。膀胱癌細胞株 (T24, BOY) にこれらの miRNA を核酸導入し、細胞機能解析を行った。公共データベース (miRNA.org, Gene Expression Omnibus) を用いた *in silico* 解析にて *miRNA-144-5p* の標的遺伝子を探索し、臨床検体における発現と臨床病理学的所見との関係を検討した。ルシフェラーゼアッセイにより *miRNA-144-5p* と標的遺伝子の直接的な結合を検証した。その結果、以下の知見が明らかにされた。

- 1) *miRNA-451a/144-3p/144-5p* は、正常膀胱組織に比べ膀胱癌組織と癌細胞株で発現が有意に抑制されていた ( $p < 0.0001$ )。
- 2) これらの miRNA を膀胱癌細胞に核酸導入すると、*miRNA-451a* では癌細胞の増殖は抑制されなかったが、*miRNA-144-3p/144-5p* では癌細胞の増殖を抑制した。さらに *miRNA-144-5p* は細胞周期において G0/G1 arrest を誘導することで癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。
- 3) *miRNA-144-5p* の制御する分子ネットワークを探索した結果、細胞周期関連遺伝子 (*CCNE1*, *CCNE2*, *CDC25A*, *PKMYT1*) が、この miRNA の標的遺伝子候補となった。さらにルシフェラーゼレポーターアッセイにて、*miRNA-144-5p* がこれら細胞周期関連遺伝子 (*CCNE1*, *CCNE2*, *CDC25A*, *PKMYT1*) を直接制御することを証明した。
- 4) *CCNE1*, *CCNE2*, *CDC25A*, *PKMYT1* の発現は、正常組織に比べ膀胱癌臨床検体や癌細胞株で有意に亢進していた ( $p < 0.0001$ )。
- 5) 臨床膀胱癌検体において *CCNE1*, *CCNE2* の高発現群では全生存率の有意な低下が認められた ( $p = 0.0251$ ,  $p = 0.0324$ )。

本研究により、膀胱癌において *miRNA-144-5p* は、細胞周期関連遺伝子 (*CCNE1*, *CCNE2*, *CDC25A*, *PKMYT1*) を直接的に制御することで癌抑制型 miRNA として機能していることが明らかとなった。また *CCNE1*, *CCNE2* は膀胱癌患者において、予後予測マーカーや新規治療標的分子となる可能性が考えられた。癌抑制型 *miRNA-144-5p* を起点とした膀胱癌の分子ネットワーク解析は、発癌メカニズムの解明や新しい治療法の開発につながる可能性が示唆された。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。