

論文内容要旨

論文題目

肝臓における miR-224 の発現異常と癌発生・進展について (Aberrant Expression of miR-224 and Its Potential Role in the Progression of Liver Cancer)

責任講座： 外科学第一 講座

氏名： 藤 亮

【内容要旨】

【目的】肝臓の発生や進展は、複数の癌関連遺伝子の発現異常が関与する多段階プロセスであり、その機序は未だ不明な点が多い。近年、non-coding RNA の一つである microRNA (以下 miRNA) の発現異常が多くのがんにおいて認められ、その機能異常と発がんや癌の転移との関連が注目されている。そこで、我々は複数の肝臓細胞株を用いて、肝臓細胞における miRNA の発現異常と、肝臓の発症・進展への関与を検討した。【方法】リアルタイム RT-PCR を用いて、HuH-7 など 7 種類の肝臓細胞株について 5 つの miRNA (miR-21, miR-224, miR-25, miR-93, miR-106b) の発現プロファイルを検討した。肝臓細胞株に Pre-miR-224 をトランスフェクトし、in vitro で細胞の増殖能ならびに遊走能・浸潤能などの変化を観察・解析し、miRNA の機能を解析した。また、Pre-miR-224 を用いて標的遺伝子の発現の変化を解析し、miRNA による標的遺伝子の制御機構を明らかにした。さらに、HOXD10-siRNA を用いて HuH-7 に導入し、細胞遊走能を解析した。【成績】7 種類の肝臓細胞株すべてにおいて、これら 5 つの miRNA の発現異常を認めた。特に miR-224 は、7 種の細胞株中、4 種類で発現が極めて低レベルであった。Gain-of-function 実験により、Pre-miR-224 を HuH-7 細胞に導入すると、HuH-7 細胞の遊走能と浸潤能は著明に亢進したが、増殖能に影響はなかった。また、HuH-7 細胞と由来が異なる別の肝臓細胞株 SK-Hep-1 (内皮由来) に miR-224 を導入した場合、同様に細胞浸潤能が促進された。さらに、Bioinformatics を用いて miR-224 の標的遺伝子を探索し、Western Blotting など方法により癌抑制遺伝子 HOXD10 を同定した。また、HOXD10-siRNA を用いて HuH-7 細胞の遊走能を亢進することを解明した。【結論】各種肝臓細胞株中において、miRNA の発現パターンは異なった。miR-224 は癌抑制遺伝子 HOXD10 を転写後レベルで抑制し、肝臓細胞の遊走および浸潤能を制御すると考えられた。他の miRNA の肝臓発症・進展への関与も報告されており、今後は miR-224 をターゲットとした肝臓治療の開発が期待される。

平成23年 1月27日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 藤 亮

論文題目： **Functional Analysis of miR-224 in hepatocellular carcinoma cell in vitro.** (肝癌における miR-224 の発現異常と癌発生・進展について)

審査委員：主審査委員

山崎 健太郎



副審査委員

一瀬 白彦



副審査委員

鈴木 民夫



審査終了日：平成 23年 1月 5日

【論文審査結果要旨】

MicroRNA(miRNA)は 1990 年代に発見され、近年生体機能や構造発現に関与する複数の遺伝子を制御していることが明らかにされている。さらに miRNA が悪性腫瘍の発現や抑制に関与しているとの報告も見られるが、発見されている miRNA の数は多く、遺伝子制御過程が複雑なためその機能には未知な部分が多い。

本研究では、肝細胞癌にみられる miRNA の発現異常と、miRNA が肝細胞癌の転移にどのような影響を与えるか、さらに miRNA の標的遺伝子が肝細胞癌にどのように作用するかを、肝細胞癌の培養細胞を用いて検討した。その結果、肝細胞癌内 miRNA では、miR-224 発現が正常肝細胞に比べて著しく低かった。そして、miR-224 を肝細胞癌の培養細胞 HuH-7 に導入したところ、増殖能には影響を与えず、遊走能と浸潤能は促進されることが判明した。さらに、miR-224 の標的遺伝子を検索したところ HOXD10 が標的遺伝子であることが明らかになった。一方、Small interfering RNA(siRNA)で HOXD10 発現を抑制したところ、遊走能が促進されることも明らかになった。

肝細胞癌の転移に関する基礎的なアプローチには数多くの手法があるが、本研究では悪性腫瘍、特に肝細胞癌、との関わりで未知の部分が多い miRNA を用いて、まず肝細胞癌の培養細胞内での発現をみて複数の miRNA の中で miR-224 の発現が特に抑制されていることを確認して、そこから miR-224 に着目して実験を進めている。次いで「転移」という現象を培養細胞の増殖能(細胞数の変化)、遊走能、浸潤能という観点から評価している。さらに、miR-224 が制御している標的遺伝子に HOXD10 があり、HOXD10 が肝細胞癌の培養細胞の遊走能に関与している事にまで言及し、その上で miRNA の機能の他に miRNA が制御している遺伝子の機能まで実験を通じて検討している。これらの議論の展開をみると複数の実験を実施し、miRNA の複雑な機能を段階的に広範囲にみている。

miRNA と肝細胞癌との関連についての研究報告は数少なく、miRNA や肝細胞癌に関わる遺伝子の種類や機能が複雑であることから、審査の過程で用語の使用方法、実験データの表現方法等について様々な意見が出され議論された。さらに本研究は培養細胞を用いていることから、生体の肝細胞癌組織内における miR-224 の発現や作用に言及した他の文献の内容との相違についても議論が交わされた。

これらの議論の結果、実際の肝細胞癌臨床症例の研究に発展させるには、解決すべき課題は残っているが、本研究が肝細胞癌の転移における miRNA の役割、あるいは標的遺伝子の役割について重要な知見を見出していることから、本論文は学位(医学博士)に値するものと判断した。
(1,200 字以内)