




学位論文審査の結果の要旨

令和 2 年 7 月 3 日

審査委員	主査	辻 晃 仁 
	副主査	金西 賢 治 
	副主査	舛 形 尚 
申請者	野村 圭	
論文題目	Association between microRNA-527 and glypican-3 in hepatocellular carcinoma	
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)	

〔 要 旨 〕

- 研究開始当初の背景:90年代の急速な勢いでヒゲム7プロジェクトが進行した。その結果、予想に反してゲノムDNA30億からタンパクの翻訳に使用される遺伝子は、1.5%にすぎず、タンパク数にして2万2千を規定しているにすぎないということが判明した。さらに、意外な事に、ゲノムDNAの70%がRNAに転写されており、細胞内には膨大な未知のnoncodingRNAが存在することが判明した。マイクロRNA(miRNA)は、このnoncodingRNAの範疇に属しており、これらmiRNAの機能としては特異的なメッセンジャーRNA(mRNA)の3'非翻訳領域に部分相補的に結合し、そのmRNAの翻訳、遺伝子発現を抑制している。最近、種々の癌において発現しているmiRNAが、正常組織と比較し、著明に変化していることが報告されており、特定のmiRNAが、細胞の癌化・進展に関与しているのではないかと推測されている。このことからある種のmiRNAが、HCC特異的に発現増強・減弱し、HCCの発生、増殖、進展に関与している可能性がある。正常肝、慢性肝炎、肝硬変、HCCにおいてmiRNAの網羅的な発現プロファイリングを作成することは、発癌機序、予後予測、創薬などの新たな治療法開発の手がかりとなることが期待される。さらに、miRNAの研究は、将来的には癌のみならず、さまざまな疾病の診断、治療、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術となる可能性を秘めている。
- 研究の目的:HCCにおけるmiRNAの網羅的解析及び癌特異的miRNAの機能解析を行なう。
- 研究の方法:miRNAの網羅的解析は、アレイチップを用いて、検討しコンピューター解析を用いて、標的遺伝子を予測した。miRNA-527の結合部位を含むcDNAが入ったglypican-3の発現ベクターに、一過性発現に適した細胞株であるCOS7にリボソーム法で遺伝子導入し、12時間後にmiRNA-527を導入し、その12時間後のglypican-3の発現をWestern blotで調べる。
- 研究成果:miRNA網羅的解析において、そのクラスター解析において、肝硬変とHCCは異なるプロファイリングを形成していた。また、最も差異が認められた、miRNAは、miRNA-527であり、HCCにおいて、極めて減弱していた。次に、miRNA-527が、どのmRNA分子を制御するかを予測した。予測により、glypican-3が、miRNA-527の標的遺伝子の可能性を見出した。確かに、miRNA-527が減弱していたHCCにおいては、glypican-3の発現は亢進していた。まず、HCCにおいて減弱するmiRNA-527のターゲット分子がglypican-3遺伝子であることを次の方法で実験的に確認した。miRNA-527の結合部位を含むcDNAが入ったglypican-3の発現ベクターを、一過性発現に適した細胞株であるCOS7にリボソーム法で遺伝子導入し、

導入後、12時間後にmiRNA-527を導入し、その12時間後のglypican-3の発現をWestern blotで調べた。さらに、COS7にglypican-3発現ベクターを導入12時間後、コントロールmiRNAを導入し、その12時間後のglypican-3の発現をWestern blotで解析した。COS7のglypican-3の発現は、コントロールmiRNA導入群と比較し、miRNA-527導入群は、glypican-3のタンパクレベルは減弱した。また、HCCにおいてmiRNA-527の機能解析をする上で、リポソーム法によりmiRNA活性を上げる合成miRNA-527を癌細胞内に導入すると、MAPキナーゼカスケード亢進させていた。さらに、miRNA-527による遺伝子導入は、Huh-7細胞株におけるglypican-3の発現も阻害した。これは、HCC組織のmiRNA-527がglypican-3遺伝子発現を標的とする重要な新規miRNAである可能性を示している。miRNA-527によって調整されているglypican-3は、HCCの発生と進行に関与している可能性がある。

【審査時質問】

- ・実験に使用したHCC細胞株は複数あるようだが、実臨床に則したものであったか。分化度は低分化、中分化、高分化、未分化であり、ウイルスはB型、C型、nonB・nonCと実臨床を網羅できていると考えられる。
- ・今回の研究内容のうち現時点で臨床に応用されていることはあるか。glypican3はすでにある程度マーカーとしているいろいろな研究がされており、今後はmiRNAとあわせることによって新たなマーカーとして、それも早期発見や悪性度のマーカーを考えている。
- ・miRNA-527、glypican-3を臨床で簡便に測定することは可能か、コストはどうか。glypican3は検査が開発されており比較的安価で検査が可能となっているが、miRNAはまだコストがかかっているのが現状である。
- ・癌部と非癌部で4種類のmiRNA発現量に違いがあったが、そのなかでも減少していたmiRNAへ注目し実験を進めていった理由はなにか。上昇していたmiRNAのtarget geneは確認されているが、miRNA-527はまだ確認されていなかったため研究対象とした。上昇していたmiRNAはおそらくは腫瘍を抑制させるようなtarget geneであることが予測される。
- ・実際のHCC患者として4例を扱っていたが、このような実験系ではその症例数は妥当な数であるか。症例数は多いに越したことはないが、同意書所得が4例であったため今回は肝癌細胞株とあわせて評価を行った形となった。
- ・発現量の増加していたmiRNAに関しては既にある程度調べ尽くされているのでしょうか。Target geneは確認されているが、今後はこれらのmiRNAについても研究予定である。
- ・非癌部の組織背景はどうであったか。4症例とも非癌部は肝硬変でしたが、いずれも慢性肝炎から肝硬変となりHCCへと経過をたどったものである。今回肝硬変を選んだ理由として切除標本の正常肝部が肝硬変であったこと、また癌の状態が一番近いものとして肝硬変と比較を行った。
- ・C型肝炎以外を背景とする症例は使わなかったのか。今回はC型肝炎に注目して研究を行ったため今後はB型肝炎や他の肝疾患との比較なども含めて今後の研究課題である。
- ・NASHからの発癌にも同様なメカニズムがはたらいている可能性はあるのか。ぜひ今後の検討を。可能性は十分に考えられるため今後検討予定である。
- ・将来的にglypican3の腫瘍マーカーとしての応用の可能性はあるか。AFP、PIVKA II陰性のHCCに対するマーカーとして十分に期待がもてるものであり、miRNAも合わせるとことで悪性度や再発率などにも役立つものと考えている。
- ・ほかの癌腫についてglypican3関連の研究はあるのか。悪性黒伝腫、卵巣細胞腺癌、肺扁平上皮癌、一部の小児がんなどにおいて特異的に発現が認められており、卵巣がんにおいてはUmezuraらの報告(Glypican-3 expression predicts poor clinical outcome of patients with early-stage clear cell carcinoma of the ovary. J Clin Pathol. 2010 Nov;63(11):962-6.)では転帰不良の予測する研究などが行われている。

以上のようにいずれの質問に対しても適切な回答が行われた。以上の結果を総合的に判断して、審査員は一致して本論文が博士論文としてふさわしいものであると判断した。

掲載誌名	Oncology Letters			第	巻, 第	号
(公表予定)	2020年1月	出版社(等)名	Spandidos Publications			
掲載年月	(掲載受理)					

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。