

学位論文審査の結果の要旨

令和 5年 11月 20日

審査委員	主査	岡野 圭一			
	副主査	辻 晃 仁			
	副主査	大島 俊 樹			
願出者	専攻	医学	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)	
	学籍 番号	19D717	氏名	小山 裕紀子	
論文題目	Role of Mir-452-5p Overexpression in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Early-stage Colorectal Cancer				
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〕

【背景と目的】近年、microRNA (miRNA) がタンパク質の発現を制御することによって様々な癌の発生・進展に関与していることが報告されている。我々は、早期大腸癌におけるmiRNA発現の変化を調査し、大腸癌におけるこれらのmiRNAの役割を検討することを目的とした。

【方法】1) 早期大腸癌に対してESDを施行した15例において腫瘍部、非腫瘍部から各々15サンプルを採取し、total RNAを抽出し、miRNA array解析を行い、miRNAの発現量を比較した。有意な変化を示したmiRNAについてリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応(real-time PCR)によって再検証し、特定のmiRNAを同定した。2) 大腸癌細胞株を用いて同miRNAの腫瘍増殖効果や浸潤への影響とその作用機序について、MTT assay、invasion assay、flow cytometry、Western blot法を用いて検討した。

【結果】1) 腫瘍部と非腫瘍部のmiRNAでは異なる発現を示し、腫瘍部で有意に増加したmiRNAが11分子、有意に減少したmiRNAが15分子検出された。これらのmiRNAについて腫瘍部と非腫瘍部の組織間でreal-time PCRを行うと、miR-452-5pの発現が有意に増加していた。2) 大腸癌細胞株でのmiR-452-5pの発現量を比較し、発現量の低いCACO-2細胞にmiR-452-5p mimic、発現量の多いHT-29細胞にmiR-452-5p inhibitorをtransfectionして基礎的検討を行った。miR-452-5pは腫瘍増殖効果を示したが、細胞周期とは有意な関連は示されなかった。しかし、miR-452-5pは細胞外シグナル調整キナーゼ(ERK)のリン酸化を促進した。細胞浸潤については抑制効果を示し、miR-452-5pはSlugの発現を抑制し、E-cadherinの発現を促進し、上皮間葉転換を抑制する方向に作用した。

【結語】早期大腸癌において発現が変化しているmiRNAを同定した。miR-452-5pは大腸癌において、ERK経路を活性化して腫瘍増殖を促進する一方で、Slugの発現抑制とE-cadherinの発現促進を通じて細胞浸潤を抑制する。これらの発見は、miR-452-5pが大腸癌の早期診断マーカーや有効な治療標的となる可能性を示唆している。

令和5年11月20日行われた学位論文委員会において、以下に示す様々な質疑応答が行われた

(1) 論文中は20例の組織サンプルを回収しているが、最終的に15例になったのはなぜか。

→生検組織でのサンプルのため、十分な検体が採取できなかったものが除外された。

(2) 組織採取する際に、腫瘍部はどこから採取されたのか。また、SM2までであるのはESD適応のところまでを対象にしたのか。

→ESD切除として臨床的に断端Xなどの影響を与えない、安全に採取できる部位から採取した。ESD適応としてはSM1までになるが、採取部位の選別の点で結果的にSM2癌が多く含まれた形となった。

(3) 腺腫が含まれるが、腺腫も癌と同じ働きをするものなのか。miRNAは同様になるものなのか。

また、SM2において変化の強くでているところがあるが、M癌からSM癌への変化に関連するのではないか。

→欧米では腺腫と粘膜癌の区別はひかれておらず、その点から腺腫と粘膜癌の区別は難しいと考える。また、腺腫と癌、あるいは腺腫/癌とSM癌のmiRNAの比較はしたが、有意な差はみられなかった。

(4) 既存のバイオマーカー-RAS、BRAF、MSIなどとの関連はあるのか。

→今回は検討に至っていない。しかし、RASはERK経路の1つであり、関与している可能性はある。

(5) 今回のmiRNAのtransfectionの濃度は適切であったのか。

→プロトコールに従った適切な濃度で行った。

(6) 痰出とmiRNAの関連はどうか。

→今回は検討に至っておらず、今後の課題としていく。

(7) 食道癌と大腸癌のmiRNAの発現は異なったか、また、共通して発現が多かったものはあるか。

→検討はできていなかったが、比較すると、両腫瘍で変化のあったmiRNAは全く異なっている。腺癌と扁平上皮癌であり、腫瘍の組織が違うということもその一因と思われる。

(8) miR-452-5pは全体で発現の高いものか。

→Up-regulateしたものなかではFCの高値のものだったが、すべてのmiRNAについてRT-PCRできてはいない。検討したmiRNAの中で差があったのはmiR-452-5pだけとなった。

(9) 細胞によって特徴があるが、他の大腸癌細胞では検討しなかったのか。

→他の細胞でも検討したが、細胞の種類によってはtransfectionが困難であった。今後の課題としていく。

(10) ERK経路に限定して検討したのはなぜか。

→細胞増殖経路の代表的なものであることからERKを選択した。既存論文でmiR-452-5pと細胞増殖についての報告があり、その論文と矛盾しないことを確認し、今までの報告のなかった浸潤への影響について焦点をあてることとした。

(11) 細胞増殖促進と細胞浸潤抑制という相反する結果だが、どのようにして治療に活かせるのか。

→最大の難点であると思われるが、今回は*in vitro*のみでの結果であるため、今後、*in vivo*でどのように作用するかを検討し、そのうえで治療への活用が見出せるかを検討する必要があると考える。

(12) 早期癌から進行癌へstageがあがるとこのmiRNAはどうなるのか。

→既存の報告では、miR-452-5pの発現が高いほど予後が良かったという報告、SLUGの発現が高いほど予後が悪いとの報告がある。今後、進行大腸癌組織での変化との比較実験も検討している。

(13) 血清miRNAのバイオマーカーはどこまで進んでいるのか、組織中とは検出力の差はどうか。また、血清と組織での上昇するmiRNAは異なるのか。

→miRNAは血清バイオマーカーとして現在、実用化はされていないが実証はされている。miRNAの検出は組織の方が抽出しやすいが、血清と組織のmiRNAの内容の比較は今後の課題である。

掲載誌名	In Vivo		
	第 37 巻, 第 5 号		
(公表予定) 掲載年月	2023年 9月	出版社(等)名	International Institute of Anticancer Research

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。