

学位論文審査の結果の要旨

平成26年 5月23日

審査委員	主査	三木 崇 親 印	
	副主査	上野 正 晴 印	
	副主査	西山 成 印	
願出者	専攻	分子情報制御医学	部門 病態制御医学
	学籍番号	08D740	氏名 三村 志麻
論文題目	Profile of microRNAs associated with aging in rat liver		
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 〕

マイクロRNA (miRNA) は細胞内に存在する、19~25塩基で構成される1本鎖のRNAである。ターゲットとなるmRNAを分解したり、タンパクへの翻訳を阻害することで、遺伝子の発現を負に調節している。miRNAはさまざまな生命現象や疾患の病態に強く関連していることがわかっているが、加齢に伴う肝組織のmiRNAの発現の変化を調べた研究は少ない。そこで、今回、われわれはラットの肝臓において、胎児期を含めた種々の週齢における肝組織のmiRNAの発現動態を解析した。

胎児肝、生後3日、1週齢、2週齢、4週齢、8週齢、36週齢の雄性Wisterラットの肝臓を麻酔下で摘出した。肝組織からtotal RNAを回収後、RNAの純度を2100 バイオアナライザを用いて確認後、アレーチップ (V16, Toray) を使用し679種類のmiRNAの発現レベルを網羅的に解析した。加齢とともに肝において増加するmiRNAは4遺伝子 (miR-29a, miR-29c, miR-195, miR-497) であり、減少するmiRNAは9遺伝子 (miR-301a, miR-148b-3p, miR-7a, miR-93, miR-106b, miR-185, miR-450a, miR-539, miR-301b) と同定した。

増加するmiRNAにおいては、肝細胞増殖因子 (HGF), cyclin E, Cdk4, Cdk6, cyclin D1を標的遺伝子としていることから、これらのmiRNAが増加することで細胞周期を抑制的に作用していると考えられた。また、増加するmiRNAはBcl-2を標的にしていることから、細胞のアポトーシスを誘導する役割があること考えられた。一方、加齢とともに減少するmiRNAではp21を標的遺伝子としており、老化に伴いp21が増強にするにつれ、細胞周期の抑制に関与していることが示唆された。また、サーチェイン遺伝子、癌抑制遺伝子であるFUS1が加齢と共に減少するmiRNAの標的遺伝子に同定されていた。これらの結果から、加齢とともに変化するmiRNAは細胞周期回転の抑制に関与していると考えられたため、各週齢の肝組織に、増殖細胞を示すとされるProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 染色を行ったところ、加齢に伴い染色される細胞が減少していることがわかった。今後、老化とともに変化する新たなmiRNAのターゲット遺伝子の同定、それぞれのターゲット遺伝子の役割の解明をすることが課題である。

平成26年5月20日に行われた学位論文審査委員会においては、以下に示す様々な質疑応答が行われたが、それぞれに対して適切な回答が得られた。

1. 36週齢のラットを用いているが、実験として十分な観察期間であったか？

→確かに、人間でいうと、36週齢のラット24歳ぐらいなので、老化を調べるのにはラット寿命である3年ぐらいの観察期間が必要であったと思われる。

2. 先日、鳥取大学によりmiR-520dを導入すると未分化な肝癌細胞がその癌とは全く異なる組織になったり、腫瘍を全く形成しなくなったりすることが発表され話題となったが、miR-520dと加齢や癌との関連はどうか調べてみたか？

→我々が使用しているTorayのアレーチップは、ラットについては現在までmiR-520dは含まれていないため、加齢との関連はわからない。

3. miRNAは組織からしか抽出できないのか？

→現在は、血液からも検出できる。

4. DNAダメージからがん化するシエーマがあるが、実際、癌出現までどれぐらいDNAダメージが起きているのか？

→DNAダメージを受けるたびに、迅速に多数回、修復が繰り返されている。

5. 細胞増殖の活性を調べるためにPCNAで確認しているが、他の方法はないのか？

→CyclinD1でも試みたが、うまく染色できなかつた。ご指摘の通り、PCNAの特異度は低いと言われているため、提案があったKi-67での染色も検討してみる。

6. 加齢を確認するために、SA-β-gal染色を行わなかったのか？

→試みたが、うまく染色できなかつた。

7. miRNAの増減を制御するのは何か？

→DNAダメージが考えられるが、分子レベルでの詳しい制御機構はわかっていない。ある種の転写因子が関係していると予測される。

本論文はラット肝臓の加齢に関するmicroRNAに関する研究であり、肝組織において加齢とともに増加、あるいは減少するmiRNAを同定し、それらの標的遺伝子を調べることによって、加齢と共に変化するmiRNAの意義を検討した。加齢と共にmiRNAは細胞周期回転を抑制したり、アポトーシスを誘導する役割があることを示唆した点でも意義があり、本審査委員会では全員一致して博士論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲 載 誌 名	International Journal of Molecular Medicine 第 巻, 第 号		
(公表予定) 掲 載 年 月	受理 2014 年 2 月	出版社 (等) 名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。