

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	TIAN Yijun
学位	博士(理学)
学位記番号	新大院博(理)第440号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Study on functional roles of microRNA-342 via targeting chemokine CXCL12 in tumorigenesis (腫瘍形成におけるケモカイン CXCL12 を標的とするマイクロ RNA-342 の機能的役割の研究)
論文審査委員	主査 准教授・杉本 健吉 副査 教授・前野 貢 副査 教授・長束 俊治 副査 助教・藤間 真紀

博士論文の要旨

近年、腫瘍細胞がエクソソーム(exosome)として分泌する細胞外分泌物の中に各種のマイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる短鎖 RNA が含まれていることが判明してきている。マイクロ RNA は、約 22 ヌクレオチドからなる短鎖 RNA であり、タンパク質をコードする遺伝子の転写後調節に関与する非コード RNA である。腫瘍細胞ごとにこのエクソソームに含まれるマイクロ RNA の種類が異なることが報告されてきており、癌のバイオマーカーとなり得る事が期待されている。またマイクロ RNA は、癌化、癌細胞増殖、集塊形成(コロニー形成)、癌細胞への血管新生、癌細胞による癌微小環境形成など腫瘍増殖にかかわる様々な局面で関与することが報告されており、マイクロ RNA は将来的に癌の増殖を抑制する薬の候補としても期待されている。しかしながら、マイクロ RNA がどのような標的遺伝子の発現調節に関与しているのかに関しては、まだ多くの分子細胞生物学的な詳細な研究が必要とされている。その理由の1つは、マイクロ RNA が標的とする配列は、(その短い配列のために)ゲノム上に多数存在するため、バイオインフォマティクスによる推定作業のみでは標的遺伝子を確定できないことにある。

申請者は、血管新生に違いがあるマウスの腫瘍細胞株に着目し、これらの腫瘍細胞の増殖に関与するマイクロ RNA を特定し、その標的遺伝子の発現がこのマイクロ RNA によって抑制されることを分子細胞生物学的実験により解明した。本論文ではマウスの腫瘍細胞株(MS-K と LM8)をモデルとして用いた。MS-K はマウスに移植後、血管形成が良好な腫瘍を形成するのに対して、LM8 は血管形成が良好ではない腫瘍を形成する。2つの細胞間で発現に顕著な違いのあるマイクロ RNA を検討したところ、マイクロ RNA-342(Mir-342)の発現に違いがあり、MS-K に比べて LM8 でこの Mir-342 の発現が高いことを見つけ出した。Mir-342 はこれまでも他の研究者により、腫瘍と関係がある事が報告されている。そこで申請者はこの Mir-342 を過剰発現する MS-K 細胞を作製し、この mir-342 の腫瘍形成に於ける役割解明を目指した。その結果、この Mir-342 過剰発現細胞の腫瘍形成能が親株(MS-K)に比べて低下することを明らかにした。

さらに、血管新生に関する血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial growth factor-A, C)等の遺伝子発現が変化していない事から、この Mir-342 過剰発現 MS-K 腫瘍の腫瘍形成能力低下の原因についてさらに追求したところ、腫瘍に集積するマクロファージ数が Mir-342 過剰発現腫瘍で減少していることを明らかにした。さらに詳細に解析したところ、Mir-342 過剰発現腫瘍に集積するマクロファージは親株に比べ、より腫瘍傷害に作用するタイプの M1 タイプマクロファージに偏向しており、血管新生をサポートする M2 タイプのマクロファージは減少していたことが分かった。

一方、バイオインフォマティクス解析により Mir-342 が標的とする遺伝子候補を絞り込み、*sdf-1 α* (Stroma Derived Factor-1 α)が候補遺伝子であることを明らかにした。SDF-1 は別名、CXCL12 と呼ばれるケモカインでありマクロファージのリクルートメントにも関与する。そしてこの Mir-342 過剰発現細胞において SDF-1 α の遺伝子発現が顕著に低下していることを定量 PCR により解明した。さらに Mir-342 が *sdf-1* の 3' -UTR(3' -untranslated region)側に 2 つ存在する標的配列のうち、上流側を標的とすることデュアルルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。*Sdf-1 α* が Mir-342 の標的であることを示したのは、これが初めての報告である。*Sdf-1 α* の CDS をこの Mir-342 過剰発現 MS-K に導入し過剰発現させる事によって、Mir-342 過剰発現 MS-K の増殖能が回復する事を明らかにした。以上の結果から LM8 腫瘍では MS-K 腫瘍に比べて高い発現レベルにある Mir-342 が腫瘍細胞における *sdf-1 α* の発現を下方制御することにより腫瘍に集積するマクロファージを減少させると共に、より血管新生を抑制する M1 タイプのマクロファージに偏向させることにより血管新生が抑制され腫瘍成長が抑制されると結論し、Mir-342 が腫瘍抑制因子として働く可能性を示した。

審査結果の要旨

本論文は、血管新生不良な腫瘍細胞で発現している Mir-342 が、SDF-1 α 遺伝子の 3' UTR に存在する標的配列に作用する事により、この細胞における SDF-1 α の産生を抑制する事を分子細胞生物学的に明確に示し、これが Mir-342 を高発現するこの腫瘍細胞が形成する腫瘍の血管新生不良の原因である事を突きとめたものであり、Mir-342 の腫瘍抑制因子としての可能性を示すものである。

本研究の内容の一部は第 37, 38 回日本分子生物学会において本人がポスター発表するとともに、本論文内容をまとめたものが Genes to Cells に筆頭著者として受理され、Genes to Cells, **23**, pp1009-1022, 2018. に掲載されている。

よって、本論文は博士(理学)の博士論文として十分であると認定した。