

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 泉 谷 昌 志

本研究は、代表的な非コード RNA の一つであるマイクロ RNA (miRNA) の体系的な機能解析を可能とするために、miRNA 発現ウイルスライブラリーならびにカスタム作成マイクロアレイを用いて miRNA 機能スクリーニング系を構築し、さらにこれを用いて膀胱がん細胞株の増殖に関与する miRNA の同定を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 454 の miRNA 前駆体配列に対して、890 のオリゴヌクレオチドプローブを設計し、これを搭載したカスタムマイクロアレイを作成した。

2. ウイルスライブラリー導入した細胞株のゲノム DNA から、ウイルスベクター由来の miRNA 前駆体を PCR で増幅する過程の再現性を、self-self hybridization 実験を行い確認した。すなわち、同一のゲノム DNA から複数回の PCR を行い、これを混合し 2 つの PCR 産物プール (Pool I, Pool II) を作成し、これをそれぞれ Cy3, Cy5 で蛍光ラベル化、カスタムマイクロアレイ上へハイブリダイゼーションし、蛍光強度比を算出したところ、コピー数の少ないものから多いものまで蛍光強度比はほぼ 1 であり、良好な相関関係であることを示した (相関係数 $R \sim 0.9$)。

3. この手法で実際に目的とする miRNA の同定が可能であることを検証するために、膀胱がん細胞株 MIA PaCa-2 にウイルスライブラリーを導入し、細胞増殖に関連する miRNA のスクリーニングを行い、 \log_{10} (コピー数比) がほぼ -1 以下となるクローン、すなわち細胞増殖抑制的 miRNA を 5 種類同定した (miR-29b; miR-34a; miR-222; miR-224; miR-532)。

4. スクリーニングで同定された細胞増殖抑制的な miRNA の細胞増殖抑制効果を、①レンチウイルスベクターならびに②合成 miRNA を用いて個別に検証し、いずれの実験系においても細胞増殖抑制効果を確認した。

5. これら細胞増殖抑制的 miRNA の作用機序を明らかにする一端として、PI 染色を行い flow cytometry による細胞周期の解析を行い、アポトーシスはほとんどみられない一方で、G1 arrest (miR-34a, miR-224, miR-532) または G2 arrest (miR-222) がみられ、細胞周期の停止が主な機序であることが明らかになった。

以上、本論文は miRNA 発現ウイルスライブラリーとカスタム作成マイクロアレイの組み合わせにより効率的な miRNA 機能スクリーニング系を構築し、これを用いて膵がん細胞株増殖抑制的 miRNA を同定した。本研究は、遺伝子発現に重要な働きをするものの多くが機能不明な miRNA の効率的な機能解析に重要な貢献をなすと考えられる。また、膵がん細胞株の解析で同定された増殖抑制的 miRNA は、今後の治療薬への応用研究へ貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。