

審査の結果の要旨

氏名 高田朱弥

本研究は肝細胞癌において、miRNA が機能を発揮するのに必要な構成因子 miRNP のひとつである DDX20 の発現が低下していることを見だし、DDX20 の発現低下に伴う miRNA の異常がどのように肝発癌につながるのかについて検討を加え、新たな肝発癌経路のひとつとしての可能性を示したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト肝細胞癌の細胞株、針生検組織、tissue array を用いた検討では背景の非癌部と比較し癌部での DDX20 の発現は低下していた。DDX20 タンパク質の発現低下が認められた Hep3B、Huh7 細胞株において DDX20 遺伝子が存在する染色体 1p 領域のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH)を認めた。
2. レポーターアッセイによる検討では DDX20 の過剰発現により NF- κ B 活性の著明な低下を認め、逆に DDX20 ノックダウン安定細胞株ではコントロール細胞に比べ NF- κ B 活性が増強していた。また DDX20 ノックダウン細胞株ではコントロール細胞と比較し細胞増殖に差はみられなかったが、アポトーシスには抵抗性を示した。またマイクロアレイでは DDX20 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して NF- κ B により転写が活性する癌関連遺伝子が増加していた。これらの結果から、DDX20 の発現低下は NF- κ B の活性増強につながる可能性が示唆された。しかし、NF- κ B 伝達経路関連分子のタンパク質の発現量は DDX20 ノックダウン細胞とコントロール細胞では同程度であった。さらに、免疫沈降では DDX20 と NF- κ B 関連分子との間に結合を認めなかった。
3. DDX20 の発現低下により miRNA の機能不全を生じ、その結果として NF- κ B 活性の増強が生じている可能性を考えた。この検討のため NF- κ B が恒常的に活性化しているレポーター細胞に肝臓で発現が多い成熟型合成 miRNA をリバーストランスフェクションすることで、NF- κ B 活性に影響を与える miRNA をスクリーニングし、NF- κ B を抑制する miRNA として miR-22、miR-140-5p、miR-140-3p を同定した。また、DDX20 の発現低下によって特に miR-140-3p の機能が減弱し NF- κ B 活性が増強することがわかった。さらに、DDX20 で免疫沈降すると miR-140-3p は miR-140-5p より多く検出され、DDX20 主体の miRNP 複合体への取り込みにおいて、miR-140-3p が優先的に取り込まれ、DDX20 は miR-140-3p に特異的に作用している可能性が示唆された。

4. レポーターアッセイを用いて miR-140-3p が NF-κB の coactivator である NRIP1 を標的としていることを示した。また DDX20 ノックダウン細胞では、NRIP1 のタンパク質の発現は著明に増加していた。さらに、ヒト肝組織では癌部では非癌部に比べ DDX20 の発現が低下している一方で、NRIP1 のタンパク質の発現は増加していた。一方、NRIP1 を過剰発現させると NF-κB の活性は増強したが、DDX20 ノックダウン細胞において、NRIP1 をノックダウンすると NF-κB の活性は減弱したことから、DDX20 の発現が低下した状態では NRIP1 の発現増加を介して NF-κB の活性増強がもたらされている可能性が示唆された。これまでの実験結果を *in vivo* で検証したところ、miR-140 ノックアウトマウスの肝組織において NRIP1 の発現レベルは増加していた。上記の結果から、少なくとも miR-140 の標的遺伝子のひとつとして NRIP1 があることが示唆された。

以上、本論文は肝臓における DDX20 の発現低下により miR-140-3p の機能が減弱し、NF-κB 活性が増強することで肝細胞癌の発生・進展に関与している可能性を明らかにした。本研究は他の腫瘍においても、miRNA の発現量の変化だけでなく miRNP の発現量の低下に伴う miRNA の異常について検討することが病態生理の解明に必要であることを示唆するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。