

〔課程-2〕

審査の結果の要旨

氏名 小島 健太郎

本研究では、肝細胞癌における肝特異的 mircoRNA である microRNA122 (miR122) 発現低下の生物学的意義を明らかにするため、miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株およびトランスジェニックマウス、同所異種移植モデル、ヒト臨床肝癌組織を用いた検討を行い、下記の結果を得ている。

1. miR122 のアンチセンスを発現するレンチウイルスベクターを用いて miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株を樹立し、表現型を解析した結果、増殖能に差は見られなかったが、偽足の増加を伴う細胞形態の変化および RT-PCR 法を用いた肝細胞マーカー発現解析で AFP の著明な発現増加が認められた。
2. miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では、Phalloidin 蛍光細胞染色で線維性アクチンの増加が見られ、間葉系マーカーである α -SMA の発現増加と上皮系マーカーである E-cadherin の発現低下が見られた。引っ掻きアッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイで細胞の遊走能と浸潤能の亢進が認められ、miR122 機能減弱による浸潤能亢進が RhoA の活性化を通じて生じていることも明らかになった。
3. miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での AFP 発現増加はタンパク質、mRNA、転写レベルにおいて認められ、さらに AFP の転写抑制因子である ZBTB20 を介して発現調節が行われている可能性が見出された。
4. miR122 による AFP 発現制御の詳細な機序を検討するため、次に *in silico* で miR122 の標的遺伝子候補を検索した。その結果、RhoA の活性化を通じて細胞の遊走や癌の浸潤に関与し、転写調節因子としても働く CUX1 に着目した。CUX1 3'UTR への miR122 の結合能をレポーターアッセイで確認し、また Western blot 法にて miR122 が CUX1 のタンパク質発現を制御していることを示し、CUX1 が miR122 の標的遺伝子であることを示した。また、CUX1 shRNA レンチウイルスベクターを用いて miR122 の機能と CUX1 の発現を減弱した肝癌細胞株を樹立し、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株で見られた表現型が CUX1 依存性であるかの検討を行ったところ、この細胞株において AFP の発現低下と浸潤能の改善が認められた。

5. 次に miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株における mRNA レベルでの ZBTB20 発現を定量 RT-PCR 法にて解析したところ、発現に変化が見られなかったため、CUX1 が他の miRNA を介して ZBTB20 および AFP の発現調節に関与していると考え、ZBTB20 を標的遺伝子とする miR214 を同定した。レポーターアッセイで ZBTB20 3'UTR に対する miR214 の結合能および miR214 による ZBTB20 のタンパク質発現の制御を確認し、CUX1 shRNA および CUX1 強制発現レンチウイルスベクターを用いて CUX1 の発現を抑制もしくは CUX1 を発現する細胞株を樹立し、CUX1 発現と miR214 発現が正の相関性を示すことを明らかにした。最後に ChIP アッセイを行い、CUX1 が miR214 の転写促進因子であることを示した。
6. miR122 のアンチセンスを発現することで miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスを作製し、表現型を解析した。肝組織の形態に差は見られなかったが、肝臓において AFP の発現増加と *in vitro* で示されたような CUX1, miR214, ZBTB20 の発現変化が見られた。
7. *in vivo* での浸潤能を評価するため、同所異種移植モデルとしてヌードマウスの肝被膜下に miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株を移植したところ、血管浸潤が認められた。
8. 最後に、ヒト肝癌臨床組織を用いて miR122 発現レベルと悪性度(分化度), AFP, CUX1, miR214, ZBTB20 発現との相関性を *in situ hybridization* 法および免疫組織染色法を用いて検討した。その結果、肝癌で miR122 の発現が低下するにつれて AFP の発現が多く、悪性度が高くなる(分化度の低い)傾向が見られた。CUX1, miR214, ZBTB20 も *in vitro* で示されたような発現変化が見られた。

以上、本論文は miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株およびトランスジェニックマウス、同所異種移植モデル、ヒト臨床肝癌組織を用いた検討から、肝癌における miR122 の発現低下により、標的遺伝子である CUX1 を介して AFP 発現の増加および悪性度の亢進を来すことを明らかにした。本研究は、臨床的に高悪性度の肝癌がしばしば AFP 高値であることへのひとつの機構を提示したと言え、肝癌における悪性度と AFP 発現を規定する因子である miR122 が、将来的に進行肝癌に対する治療標的として考慮すべき可能性が示唆され、学位の授与に値するものと考えられる。