

審査の結果の要旨

氏名 森田 茂樹

本研究は生体の発生分化、恒常性維持に必須の非翻訳単鎖RNAであるmicroRNAが肺腺癌の浸潤過程においてどのように関与するのかを明らかにするため、マイクロダイセクションや*in situ* hybridization (ISH) といった手法を用いて、非浸潤部と浸潤部の対比、さらに腫瘍間質でのmicroRNAの発現の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 肺癌臨床検体の凍結保存検体の非浸潤部及び浸潤部から、マイクロダイセクションを使用して検体を分取、RNAを抽出し、マイクロアレイに提出、クラスター解析によって、約1700個のヒトmicroRNAの中から浸潤に関係すると考えられる143個を抽出した。さらに文献による情報などを元に8個を選び、凍結検体、ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-fixed and paraffin-Embedded, FFPE) 検体10症例に対しての定量的Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)を行い、アレイの結果との比較を行ったところ、miR-146a、miR-107、miR-141、miR-200cで一致が見られた。
2. miR-146に対してFFPE検体から分取した定量的RT-PCR(50例)及びFFPEに対するISHにて非浸潤部に比して浸潤部でmiR-146aの発現亢進が認められた。臨床検体を用いた予後解析ではmiR-146aが浸潤部で過剰発現している症例では無病生存期間の短縮を認めた。肺癌細胞株を用いた検討では、miR-146a前駆体導入による形態変化やwound healing 実験における移動能亢進、TGF- $\beta$ 添加による上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)誘導に伴ったmiR-146aの発現亢進が認められ、miR-146の発現亢進がEMTに関与することが示唆された。
3. 標的遺伝子予想プログラムであるtarget scan及び文献からmiR-146aの標的遺伝子候補として、antiproliferative gene であるBTG2(B cell transcription family, member 2)を見出し、検証を行った。BTG2は免疫組織化学(immunohistochemistry, IHC)で非浸潤部に比して浸潤部で染色性の低下が認められ、BTG2のIHCでの染色強度とmiR-146aのISHでのシグナル強

度に逆相関が見られた。また、肺癌細胞株H522でmiR-146a 前駆体導入でBTG2がmRNAレベルで抑制されることなどからBTG2はmiR-146aの標的遺伝子であることが示された。BTG2がIHCで陰性の症例は無病生存期間及び全生存期間の短縮が認められた。

4. ISHでは非浸潤部に比して浸潤部でのmiR-107の発現亢進が認められた。さらに予後解析ではmiR-107のRT-PCR、ISHにおいて浸潤部でのmiR-107過剰発現が予後増悪因子であることが認められた。
5. miR-107の標的遺伝子候補として選択したDICER-1はIHCで非浸潤部に比して浸潤部での染色性の低下が認められ、非浸潤部に比し、浸潤部でmiR-107高発現 (ISH)、DICER-1低発現 (IHC) であることや細胞株を用いたTGF- $\beta$ によるEMT 誘導を行い、miR-107の発現亢進と蛋白レベルでのDICER-1の低下が認められたことなどから、肺腺癌においてもDICER-1がmiR-107の標的遺伝子であることが示唆された。IHCではDICER-1が浸潤部に陰性の症例では無病生存期間の短縮が認められた。
6. 我々の研究ではFFPE検体を用いたISHで肺腺癌に接する筋線維芽細胞にmiR-21の過剰発現が認められ、浸潤部における間質でのmiR-21 ISHのシグナル強度が強い(3+) 場合、有意に全生存期間が短いことが示された。また、胎児由来の筋線維芽細胞株にmiR-21の前駆誘導体を導入すると伸びだすような形態の変化が認められ、浸潤への関与の可能性が考えられた。

以上、本論文は肺腺癌において非浸潤部と浸潤部での癌細胞におけるmicroRNA発現の比較を行い、浸潤過程にmiR-146aとmiR-107が関与すること及びmiR-146aの標的遺伝子としてのBTG2, 各々のmicroRNAが浸潤に関与する機序の一部を示した。肺腺癌のmicroRNAに関して腫瘍内での非浸潤部と浸潤部という形の検討は前例がなく、非浸潤癌から浸潤癌への進展過程に関与するmicroRNAの一部を明らかにしたという点で本研究の意義は大きいと考えられる。また、肺腺癌の浸潤部での筋線維芽細胞でのmiR-21の過剰発現及び予後との関連を示した。本研究は肺腺癌及び癌一般におけるmicroRNAの解明に重要な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。