

審査の結果の要旨

氏名 吉本 豊毅

本研究は、肺および消化管に発生するカルチノイド腫瘍を microRNA 発現の観点から、各臓器の正常組織、腺癌、小細胞癌などと比較することで、カルチノイドの発生・由来および生物学的性質に迫ること、およびカルチノイドに特徴的な microRNA を抽出してその役割・機能を明らかにすることを目的としている。我々は肺および消化管カルチノイド症例を含む手術材料のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体を用いて microRNA 発現を網羅的に解析し、2種類のクラスター解析を行うことで、カルチノイドを正常組織・腺癌組織・小細胞癌などと比較した。またバイオインフォマティクス的手法を利用して、肺・消化管カルチノイドに特徴的な microRNA を同定し、その機能の一端を明らかにした。

本研究において、下記に示す結果が得られた。

1. FFPE 検体と新鮮凍結検体がペアになった症例を選び、各々から抽出した RNA を用いて、microRNA 発現 profile を比較し、FFPE 検体においても大部分が保たれていることを明らかにした。一方で、腫瘍組織の一部検体においては FFPE 検体のほうが新鮮凍結検体よりも発現 signal 値が高くなる microRNA の一群があることが分かり、比較的時間の経過した検体のペアで見られる傾向があることが分かった。そのうち 3 つの microRNA について qRT-PCR を用いて validation を行った。またそのような一群の microRNA は比較的短く、GC 比が高い傾向にあることが分かった。

2. 肺、胃、十二指腸、直腸のカルチノイド腫瘍と、各臓器の正常組織、腺癌組織の FFPE 検体からそれぞれ RNA を採取し、microRNA microarray により網羅的に microRNA の発現解析を行った。それを階層クラスタリングと NMF consensus clustering の2つの方法で解析した。その結果、カルチノイドは他の正常組織・腺癌組織などと分かれ、さらに各々が臓器ごとに大まかにクラスターする結果が得られた。すなわち肺と消化管のカルチノイドが共通の発生起源をもち、各臓器の正常組織とは大きく異なる背景を有することが示唆された。またカルチノイドにおいて他組織と比較して有意に発現変動を示す microRNA には、神経系の発生と関連する報告があるものが多く含まれ、カルチノイド腫瘍と神経系発生との関連が示唆された。カルチノイドが神経外胚葉由来であることが否定的とされる一方で、神経系発生・分化との関連を示唆する先行報告があるが、microRNA 発現の観点からも神経系発生との関連が考えられる結果となった。肺と消化管のカルチノイドを直接比較できた点についても本研究の意義は大きいと考えられる。

3. さらに肺組織（肺カルチノイド、肺小細胞癌、肺腺癌、肺正常組織）と神経系腫瘍（嗅神経芽細胞腫、神経鞘腫）の **microRNA** 発現を網羅的に解析し、上記と同じクラスター解析にて検討した結果、肺カルチノイドは同じ神経内分泌腫瘍の小細胞癌とは異なる発現パターンを示して 1 つのクラスターを形成する一方で、小細胞癌はむしろ腺癌や正常組織に近い発現を示すという結果が得られた。小細胞癌はカルチノイドと由来を別にし、腺癌や正常組織に由来するという組織発生の説を支持する結果であった。ここから神経内分泌腫瘍の組織発生として、2つの成り立ちがあることを支持された。

4. バイオインフォマティクスの手法を用いて、カルチノイドに特徴的な発現を示す **microRNA** として **miR-7**, **miR-375** を同定し、これを **qRT-PCR** にて **validation** した。**miR-375** の機能について、肺カルチノイド細胞株を利用して、**miR-375** の **inhibitor** を用いて、増殖、形態、神経内分泌分化の面から検討を行った。増殖については **knockdown** により増殖が軽度抑制される、つまり **miR-375** は腫瘍の増殖促進的に働くという結果であったが、その差は大きなものではなかった。神経内分泌分化については、**knockdown** により神経内分泌マーカーの発現の程度は **mRNA** レベルでもタンパク質レベルでも明瞭な差異が認められなかった。

以上、本論文は **microRNA** 発現解析における **FFPE** 検体の有用性を示し、**microarray** 技術を用いて、**microRNA** の観点から、肺と消化管のカルチノイドが共通の発生起源をもつ説を支持する知見を明らかにした。またカルチノイドに特徴的な発現を示す **microRNA** を抽出・同定した。本研究はカルチノイド腫瘍の組織発生および腫瘍の発生に関連する **microRNA** の解明に一定の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。