

審査の結果の要旨

氏名 天野 陽介

本研究は肺癌において異常なエピジェネティックな変化により制御を受ける microRNA を明らかにするため、*in silico*での解析、肺癌細胞株の DNA 脱メチル化剤処理、手術検体の解析を組み合わせる解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. エピジェネティックな変化による発現抑制を受ける miRNA の候補として CpG アイランドとの位置関係をもとに *in silico* で 55 種を選択した。これらのうち、14 種で非小細胞肺癌細胞株で低発現で DNA 脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) 処理により発現が誘導された。さらにその中で原発性肺癌手術検体 15 例のうち高頻度に発現低下していた miRNA を 7 個同定し、今回 *miR-139* に注目して解析をすすめた。
2. *miR-139* は PDE2A 遺伝子のイントロンに存在する microRNA であり、PDE2A と発現量の相関が見られた。PDE2A 遺伝子 (host gene) のプロモーター領域に CpG アイランドを認めるが、同領域において bisulfite sequencing による解析で肺癌細胞株・正常気道上皮細胞株 (NHBE) で DNA のシトシンメチル化が見られなかったが、クロマチン免疫沈降 (ChIP) による解析で転写活性化を来たすヒストンメチル化 H3K4me3 が NHBE では PDE2A 転写開始点近傍にピークを形成するのに対して肺癌細胞株では抑制されていた。また、NHBE においても既報のある *miR-139* 固有の転写開始点近傍で H3K4me3 のピークを認めず、正常肺および肺癌細胞株において host gene のプロモーター領域のエピジェネティックな変化によって発現制御を受けていることが示された。
3. 当院の肺癌手術検体 75 例から RNA を抽出して *miR-139* の発現量と臨床病理学的特徴との関連を検討した。*miR-139* 低発現群は高発現群と比較して無再発生存や全生存期間において有意差を認めなかったが、有意に遠隔リンパ節転移 (N2) と脈管浸潤 (ly+v+) を認め、これらは多変量解析でも *miR-139* の発現量が独立した規定因子であり、症例検討において *miR-139* の発現抑制が癌の進展と関連があることが示された。
4. *miR-139* 発現プラスミドベクターを作成し、肺癌細胞株 A549 にリポフェクションし、hygromycin による薬剤選択を行った。*miR-139* 強制発現株では scramble ベクター、空ベクター導入株と比較して MTT アッセイ変法による解析で増殖能の抑制を認めた。TargetScan で推測された *miR-139* の標的遺伝子 248 のうち、その活性化と癌との関連が報告されている 10 遺伝子の発現量は、*miR-139* 強制発現株では mRNA レベルで平均して約 30 % 抑制されていた。このことから *in vitro* においても *miR-139* が癌の増殖に抑制的な影響を及ぼしていることが示されたとともに、実際に癌と関連のある遺伝子を

制御していることが示唆された。

以上、本論文はヒト非小細胞肺癌において、microRNA 近傍の CpG アイランドにおけるエピジェネティックな変化の解析から、ヒストンメチル化による発現制御を受ける *miR-139* の存在を明らかにした。本研究は肺癌において報告の少ない microRNA のエピジェネティックな制御を *in vitro* および症例解析で明らかにしており、肺癌における microRNA とエピジェネティクスの異常を結ぶ貴重な報告と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。