

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	厚井 裕三子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1, 2 項該当		
論文題目			
Predicting the presence of breast cancer using circulating small RNAs, including those in the extracellular vesicles (細胞外小胞体由来血清中循環小分子 RNA を使用した乳癌診断バイオマーカーの開発)			
論文審査担当者			
主 査	教授	有廣 光司	印
審査委員	教授	杉山 一彦	
審査委員	講師	古宇 家正	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>乳癌は女性における癌の罹患率第 1 位の悪性腫瘍である。現在、乳癌検診はマンモグラフィ検診が推奨されているが、マンモグラフィ検診は若年女性や高濃度乳房をもつ女性への特異度低下などのデメリットがある。体液中から腫瘍細胞や腫瘍特異的 DNA などを検出するリキッドバイオプシーは、低侵襲なうえ繰り返し測定が可能で腫瘍の全体像が評価できるため、早期発見や再発予測を目的とした臨床的有用性が期待されている。microRNA やシーケンズバリエーションである isomiR、transfer RNA fragment (tRF) を含む小分子 RNA は、遺伝子の発現調節に重要な役割を担っている。小分子 RNA は疾患形成に関与し、多くの腫瘍で発現プロファイルの変化が報告されている。小分子 RNA が細胞外小胞体(extracellular vesicle; EV)に内包またはタンパク質や脂質に結合する形で血中を安定して循環することを利用し、本研究では乳癌患者と非乳癌保有女性の血清から抽出した循環型小分子 RNA のプロファイルを比較解析することで乳癌の新規診断バイオマーカー検索を行った。</p> <p>まず、cStage0~Ⅲの根治可能な乳癌患者(n=78)と同時期に乳癌検診を受け異常なしと判断された非乳癌保有女性(コントロール、n=72)を独立した 2 群に分け、血清から小分子 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて発現プロファイルを解析した。2 群ともに乳癌患者においてコントロールと比較し有意に 2 倍以上の発現量を認めた循環型小分子 RNA は 3 種類(isomiR of miR-21-5p (3' addition C), miR-23a-3p, tRF-Lys(TTT))であり、乳癌診断バイオマーカーとなりえる小分子 RNA と考えられた。なお、tRF は正式な名称が定まっておらず、本旨では 5'-GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUCAGAC-3'配列を有する tRF を tRF-Lys(TTT)とした。</p> <p>次に、重回帰分析を用いて同定した 3 つの小分子 RNA を組み合わせた乳癌診断モデルを作成した。このモデルの ROC 下面積は 0.92 と高精度であった。このモデルは cStage0 の早期乳癌から判別可能であり、エストロゲン受容体や HER2 過剰発現の有無に影響されないことを示した。また、乳癌診療に汎用されている血清マーカーの CEA や CA15-3 は 78 例中 1 例および 3 例で基準値以上を示し、大部分の症例で正常範囲内であったが、このモデルでは 71 例の患者が同定可能であった。これらの結果から、3 つの小分子 RNA を組み合わせた乳癌診断モデルの有用性が示された。</p> <p>最後に、血清中および細胞培養上清から EV を抽出し、EV に内包された小分子 RNA の</p>			

発現プロファイルを確認した。血清は量的に使用可能であった乳癌患者(n=32)とコントロール(n=20)を用いた。細胞培養上清は、ヒト乳癌細胞株(MCF-7、MDA-MB-231)およびヒトテロメラーゼ不死化ヒト乳腺上皮(184-hTERT)を用いた。isomiR of miR-21-5p (3' addition C)と miR-23a-3p は、乳癌患者の血清中(p < 0.01)および乳癌細胞培養上清中の EV 内に多く含まれており、血清中の循環型小分子 RNA と動向が一致していた。一方、tRF-Lys(TTT)は乳癌患者と健常女性の血清中細胞外小胞体に発現差を認めず(p = 0.62)、正常乳腺細胞培養上清中の EV 内に多く含まれていた。isomiR of miR-21-5p (3' addition C)および miR-23a-3p は EV 中に多く含まれる形で血中を循環し、対照的に tRF-Lys(TTT)はタンパク質や脂質に結合して血中を多く循環している可能性が示唆された。

以上の結果から、3つの血清中循環型小分子 RNA を用いた早期乳癌診断の可能性が示された。また、次世代シーケンサーを用いたことにより、ゲノムにコードされた塩基配列とは異なる配列をもつ isomiR および tRF が新規乳癌バイオマーカーとして同定されたことは今後の乳癌における遺伝子発現調節機構の解明にもつながると考えられた。さらに、血清中および細胞培養上清中の EV に内包された小分子 RNA についても解析を行うことにより、今回同定した小分子 RNA が乳癌関連マーカーである頑健性が高められた。

本研究は、乳癌診断バイオマーカーとしての循環型小分子 RNA の有用性を臨床検体と培養細胞両者を用いて明らかにしており、臨床応用に向けての基礎研究として高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が厚井裕三子に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。