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	藤井 祐太郎
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Downregulation of lncRNA <i>PVT1</i> inhibits proliferation and migration of mesothelioma cells by targeting <i>FOXM1</i> (lncRNA <i>PVT1</i> のダウンレギュレーションは、 <i>FOXM1</i> を標的として中皮腫細胞の増殖と遊走を抑制する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	岡田 守人	印
審査委員	教授	服部 登	
審査委員	講師	藤高 一慶	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>悪性中皮腫は職業性あるいは環境的なアスベスト曝露と関連が強い悪性腫瘍であり、その多くは予後不良である。発生数は増加傾向にあるが、中皮腫の発生・進展メカニズムは未だ十分にはわかっていない。long non-coding RNA (lncRNA) とは、タンパク質に翻訳されない RNA のうち 200 ヌクレオチドよりも長いものの総称である。lncRNA の一部は細胞増殖などに関与する遺伝子発現の調節を介して、細胞の分化や発がん、免疫などに関与することが知られている。lncRNA <i>PVT1</i> は様々ながんで発現が亢進しており、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の発現を調節することで腫瘍形成を引き起こすことが知られている。中皮腫でも高発現を示すことは報告されているが、その発現意義は未だ十分に解明されていない。我々は中皮腫細胞における lncRNA <i>PVT1</i> の機能の解明を目的とした。</p> <p>まず本研究では、ヒトがん細胞株の遺伝子発現データをまとめた CCLE プロジェクトのデータセットを用いて、中皮腫細胞株での lncRNA <i>PVT1</i> 発現を調べた。次に、4 種の中皮腫細胞株 (ACC-MES01、ACC-MES04、CRL-5915、CRL-5946) を用いて機能解析を行なった。リアルタイム RT-PCR を行い、中皮腫細胞株での lncRNA <i>PVT1</i> の発現を確認した。次に、これらの細胞株に <i>PVT1</i> siRNA をトランスフェクションして lncRNA <i>PVT1</i> をノックダウンした細胞群を準備し、ネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションした細胞群との比較実験を行なった。細胞増殖アッセイは、Cell Titer-Glo 2.0 試薬を用いて培養細胞に由来する ATP を 24 時間おきに測定した。細胞周期アッセイは、ヨウ化プロビジウムを含む Guava Cell Cycle Reagent を用いて細胞の DNA を標識することにより識別した。遊走アッセイは、細胞培養プレート上に細胞を除去したギャップエリアを作成し、この領域の減少の様子を、面積を計測した。細胞浸潤アッセイは、マトリゲルでコーティングした 8 μm の孔を有するカルチャーインサート内に細胞を培養し、一定時間後に浸潤した細胞のみを Hoechst 33324 で染色した。蛍光顕微鏡像を撮影し、画像内の染色された細胞の数を CellProfiler cell imaging software を用いて数えた。さらに、他の悪性腫瘍において、lncRNA <i>PVT1</i> のターゲットとして報告のある <i>FOXM1</i> の発現の変化を、リアルタイム RT-PCR と Western Bot を行い調べた。また、lncRNA と <i>FOXM1</i> の関係を詳しく調べるために、<i>PVT1</i> siRNA のみ、<i>FOXM1</i> siRNA のみ、<i>PVT1</i> siRNA と <i>FOXM1</i> siRNA の両方、ネガティブコントロール siRNA をそれぞれトランスフェクションし、4 種類の細胞群を準備した。これらの細胞群において増殖アッセイ、リアルタイム RT-PCR、Western Bot を行い、増殖能の変化、<i>FOXM1</i> の発現の変化を調べた。</p> <p>その結果、遺伝子発現データの解析の結果では、lncRNA <i>PVT1</i> は様々な悪性腫瘍で発現が高く、悪性中皮腫では特に発現が高いことがわかった。また、リアルタイム RT-PCR の結果、中皮腫細胞株において、lncRNA <i>PVT1</i> は肺腺癌細胞株より高発現であることがわかった。増殖アッセイの結果、lncRNA <i>PVT1</i> の発現を抑制すると中皮腫細胞株の増殖能が有意に減少した。また、細胞周期アッセイの結果、細胞周期の G1 期の細胞の割合が有意に減少し、G2/M 期の細胞の割合が有意に増加した。さらに遊走アッセイでは、遊走能が有意</p>			

に減少したが、浸潤アッセイでは浸潤能とは有意な関連は見られなかった。リアルタイム RT-PCR と Western Blot により FOXM1 の発現が抑制されることもわかった。FOXM1 siRNA をトランスフェクションすると、PVT1 siRNA をトランスフェクションした細胞株と同様に増殖が抑制され、PVT1 siRNA と FOXM1 siRNA を両方同時にトランスフェクションすると、増殖がさらに抑制された。PVT1 siRNA と FOXM1 siRNA を両方同時にトランスフェクションすると、FOXM1 の発現が PVT1 siRNA のみをトランスフェクションした細胞群よりも低下したが、その発現は FOXM1 siRNA のみをトランスフェクションした細胞群での FOXM1 の発現と同程度となった。

以上の結果から、本論文は、lncRNA PVT1-FOXM1 経路は中皮腫の増殖能や遊走能に関連していることや、中皮腫の治療のターゲットとなりうる可能性を明らかにした点で高く評価される。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。