

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	遠藤 意弘
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 miR-142-3p Suppresses Invasion and Adhesion of Mesothelioma Cells by Downregulating ITGAV (miR-142-3p は、ITGAV の発現抑制により中皮腫細胞の浸潤と接着を抑制する)			
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	味八木 茂	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>中皮腫はアスベスト曝露を主因として、中皮細胞から発生する悪性腫瘍である。中皮腫はアスベスト曝露後数十年の潜伏期間を経て発症し、世界的な中皮腫患者数の増加が予測されている。中皮腫は多くの鑑別を要する多彩な組織像を示し病理診断は容易ではなく、さらに現在の中皮腫に対する治療効果は限定的で予後不良である。近年のがん研究では non-coding RNA の発現異常が注目されている。non-coding RNA に分類される microRNA は約 20 塩基長の小分子 RNA であり、相補的配列を有する標的 RNA のサイレンシングを介して生物学的機能の調節を行う。中皮腫細胞株と非腫瘍性胸膜組織の間での microRNA 発現解析を実施した研究では、中皮腫細胞株における miR-142-3p の発現低下が報告されている。我々は中皮腫における miR-142-3p の生物学的機能解析と下流標的探索を実施した。</p> <p>まず初めに中皮腫組織と非腫瘍性胸膜組織の間での miR-142-3p の発現を RT-PCR で評価した。次に中皮腫細胞株 (ACC-MES01、CRL-5915) に miR-142-3p mimic を導入して生物学的機能解析を実施した。Proliferation アッセイでは細胞中の ATP 量に比例した発光をプレートリーダーで計測し細胞数を評価した。細胞遊走能の評価には Wound Scratch アッセイと Transwell Migration アッセイを実施した。Wound Scratch アッセイでは、細胞が均一に培養されたプレート上に形成された細胞非存在領域の面積変化を一定時間ごとに計測した。Transwell Migration アッセイではカルチャーインサート底部にある直径 8μm の孔を通過した細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いて遊走細胞数を計測した。Transwell invasion アッセイではマトリゲルをコーティングしたカルチャーインサートを用いて、Transwell Migration アッセイと同様の手法を用いて浸潤細胞数を計測した。次に miR-142-3p の標的 RNA を探索するために、TargetScan を用いてバイオインフォマティクス解析を行なった。miR-142-3p の標的 RNA として抽出された ITGAV の発現を、中皮腫細胞株を用いて免疫細胞化学的に検証した。中皮腫組織と非腫瘍性胸膜組織の間での ITGAV の発現を RT-PCR で評価した。miR-142-3p mimic を導入した中皮腫細胞での ITGAV の発現を RT-PCR およびウェスタンブロッティングで評価した。次に ITGAV siRNA を用いてノックダウンを行い、上記の miR-142-3p と同様の手法で生物学的機能解析を実施した。ITGAV を含むインテグリン二量体は細胞外基質中のビトロネクチンと特異的に結合することが知られている。そこで Cell Adhesion アッセイを行い、コントロールおよびビトロネクチンをコーティングしたプレート上に細胞を播種し一定時間経過後に washing を行い、プレート上に残存する接着細胞数を計測した。</p> <p>中皮腫組織における miR-142-3p の 5617 倍の発現低下を認めた。miR-142-3p mimic を導入した中皮腫細胞を用いて生物学的機能解析を実施した結果、細胞増殖、遊走および浸潤が有意に抑制された。中皮腫において miR-142-3p は腫瘍抑制的に機能しており、miR-142-3p 発現低下が中皮腫進展、浸潤に関与することが示唆された。さらに miR-142-3p の標的 RNA として ITGAV が抽出された。</p> <p>中皮腫細胞株にて、免疫細胞化学的に ITGAV 発現をびまん性に認めた。非腫瘍性胸膜組織と比較して、中皮腫組織における ITGAV mRNA の 3.16 倍の発現上昇を認めた。miR-142-3p mimic を導入した中皮腫細胞では ITGAV の mRNA およびタンパクが発現抑制された。ITGAV</p>			

ノックダウンでの生物学的機能解析の結果、細胞増殖、遊走および浸潤が有意に抑制された。Cell Adhesion アッセイの結果、miR-142-3p mimic 導入と ITGAV ノックダウンの両方で細胞接着が有意に抑制された。ビトロネクチンをコーティングしたプレートを使用した際に細胞接着の抑制率が大きく、miR-142-3p/ITGAV がビトロネクチンを介した中皮腫細胞接着に特異的な影響を与えることが示唆された。

以上の結果から、本論文は、miR-142-3p 発現低下に伴う ITGAV 発現上昇は、浸潤や接着の観点から中皮腫進展に促進的に関与することや、miR-142-3p/ITGAV が中皮腫のバイオマーカーや治療標的に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。