

学 位 論 文 要 旨

氏名 岩崎 達也

論 文 題 目

Tumor suppressive micro RNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells

(腫瘍抑制系の miRNA である let-7a は骨肉腫細胞において E2F2 をターゲットとすることを介して細胞増殖を防ぐ)

要 旨

【諸言】

マイクロ RNA (miRNA) は、転写後にサイレンシング遺伝子発現によって細胞増殖と分化を制御し、さらにがん細胞で mRNA の中で補完的な配列と結合することによって、非翻訳 RNA 分子は、腫瘍抑制またはがん遺伝子として機能することができる。

近年、miRNA 発現の調節不全が、骨肉腫を含む様々ながんで腫瘍増殖や予後不良と関係していることが明らかになってきた。

本研究の目的は骨肉腫におけるマイクロ RNA (miRNA) の潜在的発癌性要因を特定することである。

【研究対象及び方法】

マイクロアレイ・ベースのアプローチによって5つの骨肉腫細胞株 (HOS、SaOS、MG-63、NY、Hu09) とヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) を用いて miRNA とその下流の mRNA の発現の変化を分析した。

Let-7a を骨肉腫細胞にトランスフェクションし、E2F2 の発現の変化を観察した。

Let-7a のトランスフェクションが、細胞周期進行に及ぼす影響について観察した。

ヌードマウスに骨肉腫を移植した骨肉腫モデルマウスを作成し、in vivo において let-7a のトランスフェクションした治療群での腫瘍の成長抑制を観察した。

【結果】

hMSCs と比較して 5 つすべての骨肉腫細胞において miRNA let-7a の発現は著明に抑制され、E2F2 は著明に発現が上昇していた。

Let-7a を骨肉腫細胞にトランスフェクションすると、E2F2 の発現は非常に強く抑制され、E2F2 が骨肉腫細胞の miRNA let-7a の標的であることが示唆された。

Let-7a のトランスフェクションは、apoptosis の促進ではなく、細胞周期進行を止めることにより骨肉腫細胞の増加を抑制することが出来た。

in vivo でも骨肉腫細胞の let-7a 過剰発現は、腫瘍の成長を著明に抑制した。

【考察】




近年 miRNA の異常発現が人間のがんの増殖、浸潤または転移に関与することが明らかになってきており、様々な悪性腫瘍において miRNA let-7a の発現低下が密接に関係していると推測されている。我々は骨肉腫における重要な miRNA-mRNA 関係を明らかにするため、同じ骨肉腫細胞においてゲノムワイドに cDNA と miRNA の異常発現をアレイで検討した。骨肉腫細胞において let-7a の発現低下と E2F2 の発現上昇を認め、let-7a が E2F2 をターゲットとして悪性化に深く関与していることを in vivo および in vitro 双方で初めて示すことができた。

【結語】

骨肉腫において miRNA let-7a を介して E2F2 の発現を制御する新しいメカニズムを再現できた。

E2F2 は様々な遺伝子の抑制を通して細胞増殖を促進する重要なものであるため、この結果は、骨肉腫における新しい治療ターゲットとして貢献する可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第549号	氏名	岩崎達也
審査委員会委員	主査氏名	白尾 用昭	
	副査氏名	花田 俊勝	
	副査氏名	濤原 琢平	
論文題目 Tumor suppressive micro RNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells (腫瘍抑制系の micro RNA である let-7a は骨肉腫細胞において E2F2 をターゲットとすることを介して細胞増殖を防ぐ)			
論文掲載雑誌名 International journal of oncology 46:1543-1550, 2015			
論文要旨 近年、骨肉腫を含む様々ながんにおいて、マイクロ RNA (miRNA) が腫瘍増殖や生命予後と深く関係していることが明らかになってきた。本研究の目的は骨肉腫における miRNA の潜在的発癌性要因を特定することである。 骨肉腫細胞株 (HOS, SaOS, MG-63, NY, Hu09) およびヒト間葉系幹細胞株 (hMSCs) を用いて miRNA とその下流の mRNA の発現の変化を分析したところ、hMSCs と比較して 5 つすべての骨肉腫細胞において miRNA let7-a の発現が著明に制御されていた。一方、E2F2 の発現は著明に上昇していることが判明した。さらに、miRNA let-7a を骨肉腫細胞にトランスフェクションすることによって、E2F2 の発現が強く抑制されたため、E2F2 が骨肉腫細胞の miRNA let-7a の標的であることが示唆された。また、miRNA let-7a のトランスフェクションによる E2F2 の抑制は、apoptosis の促進ではなく細胞周期進行と骨肉腫細胞の増加抑制が原因であることが分かった。次に、ヌードマウスに骨肉腫を移植した骨肉腫モデルマウスを作成し、miRNA let-7a のトランスフェクションを行った治療群での腫瘍の成長抑制を観察したところ、miRNA let-7a 過剰発現は腫瘍の成長を著明に抑制することが判明した。 最近、miRNA の異常発現がヒトがんの増殖、浸潤または転移に関与することが明らかになってきており、特に miRNA let-7a の発現低下が発がんおよび進行に密接に関係していると推測されている。本研究では骨肉腫における重要な miRNA と mRNA の関係を明らかにするため、骨肉腫細胞においてゲノムワイドに cDNA と miRNA の異常発現を検討したものである。これによって、骨肉腫細胞では、miRNA let-7a が E2F2 をターゲットとして悪性化に深く関与していることを in vivo および in vitro 双方で初めて示すことができた。 本論文は、骨肉腫において miRNA let-7a が E2F2 の発現を制御するという新しいメカニズムを解明したものである。本研究の結果は、骨肉腫における新しい治療のターゲットとなり得る可能性をもったものであり、非常に重要な研究と考えられた。よって、審査員の合議により本論文は学位論文に値すると判定した。			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第549号	氏名	岩崎達也
審査委員会委員	主査氏名	白尾 国昭 (白)	
	副査氏名	花田 俊勝 (花)	
	副査氏名	藤原 37 (藤)	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. combinatorial chemotherapy はよく使用される言葉か？ 2. 骨肉腫は小児に多いとのことであるが、染色体異常はないのか？ 3. heterochronic switch gene とはどのような意味か？ 4. miRNA let-7a の標的遺伝子に関して、これまで報告されているものにどのような遺伝子があるか。 5. 5つの使用した骨肉腫細胞を、転移のしやすさや異型性の強さなどでランク付けできないのか？ 6. miRNA および mRNA のマイクロアレイ解析において、骨肉腫細胞株に対する正常コントロールとしてヒト間葉系幹細胞を使用しているが、使用根拠とその妥当性はどうか。 7. ヒト間葉系幹細胞の培養培地の組成内容は何か。 8. miRNA let-7a 以外にも大きな発現差を認める miRNA がありそうだが、その中で今後検討に値する興味深いものがあつたか。 9. 実際の骨肉腫患者のサンプルにおける miRNA 発現は、今回の細胞株のデータと相関性があるか。 10. NC miRNA は、どのように設定したのか？ 11. E2F1、E2F3 は E2F2 と 3' -UTR 構造が類似しているのか？ 12. E2F2 3' -UTR と miRNA let7a の配列が Fig. 2 で示されているが、この程度の一致度で、結合しうるのか？ 13. Fig. 3 と Fig. 4 の説明が入れ替わっているのではないか？ 14. 図3および図5の棒グラフで、統計学的有意差を示すためにはエラーバーを提示すべきではないか。 15. miRNA let-7a を濃度を変えて細胞にトランスフェクトしているが、その場合の効率は測定しているか？ 16. miRNA let-7a をトランスフェクトした細胞を、mRNA array で検索すると、E2F2 以外の標的分子も見出せたのではないか？ 17. アポトーシス解析で Annexin V と Propidium Iodide を用いているが、これらはアポトーシスにおいて何を意味するのか。 18. 腫瘍体積の指標として $\pi \times \text{long axis} \times \text{short axis} \times \text{short axis} / 6$ を使用したと記載されているが、この意味は何か？ 19. miRNA let-7a-E2F2 系の異常は、他の悪性腫瘍でも見いだされているとのことであるが、それでは骨肉腫の高悪性度を説明する他の因子は何か？ またそれを見出すために今後どのような方策をとるか？ 20. miRNA let-7a の遺伝子導入により細胞増殖が停止するものの細胞死は惹起されないということであるが、miRNA let7a や LIN28 は細胞分化において重要と言われていることから考えて、miRNA let7a が未分化な癌細胞を分化に導いている可能性はないか。例えば、骨肉腫細胞株が骨に分化したり形態的な変化といったものはなかったか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線消すること。