







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 659 号	氏 名	竹 林 兼 利
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	松 浦 恵 子	
	副査氏名	濱 田 文 彦	
	副査氏名	秦 聡 彦	
論文題目 hsa-miR-100-5p, an overexpressed miRNA in human ovarian endometriotic stromal cells, promotes invasion through attenuation of SMARCD1 expression (ヒトの卵巣子宮内膜症性嚢胞において過剰発現している hsa-miR-100-5p は SMARCD1 の発現を減退させることにより浸潤を促進する)			
論文掲載雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology			
論文要旨 【緒言】これまで卵巣子宮内膜症性嚢胞において hsa-miR-100-5p の発現が亢進し子宮内膜症の発症機序に関与することを報告した。今回、子宮内膜症における hsa-miR-100-5p の病態形成における役割を解明することが目的である。 【研究対象及び方法】子宮内膜症を伴わない正常子宮内膜間質細胞 (normal endometrial stromal cells (NESCs)) を分離・培養を行い、hsa-miR-100-5p を強発現させ、マイクロアレイ解析、Ingenuity pathway analysis により hsa-miR-100-5p の下流のシグナル経路の解析を行った。また invasion assay、wound repair assay により浸潤能を解析した。 【結果】 hsa-miR-100-5p を強発現すると、NESCs では SWItch/sucrose non-fermentable-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 (SMARCD1) の発現が減少し、下流に存在する matrix metalloproteinase 1 (MMP1) の mRNA、活性化 MMP1 の蛋白の発現が増加した。また invasion assay、wound repair assay により、hsa-miR-100-5p は NESCs の浸潤能、遊走能を優位に増幅させた。 【考察と結語】本研究により hsa-miR-100-5p は NESCs において、SMARCD1 を阻害することにより、MMP1 を活性化させ、NESCs の遊走能、浸潤能を増強させることを明らかにした。hsa-miR-100-5p は腫瘍細胞に対して抑制的に作用し、他の様々な癌腫に役割を果たしていることが報告されている。子宮内膜症をもつ正所性の子宮内膜のサンプリングは臨床的に困難であることから、今後検討が必要と考える。今回の研究で、子宮内膜症において発現が亢進している hsa-miR-100-5p は NESCs においても子宮内膜症の進展様式に類似した作用を示したことから、子宮内膜症の病因の一つとしてエピジェネティックなメカニズムが関与していることが示唆された。			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第 659号	氏名	竹林兼利
審査委員会委員	主査氏名	松浦 恵子	
	副査氏名	濱田 文彦	
	副査氏名	秦 聡彦	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ECSC および NESC を単離する過程で、粘膜上皮細胞や間質内に存在する様々な細胞は混在しないか。 2. そもそも stromal cell とは具体的にはどんな性質を有する細胞を想定しているか。ECSC, NESC は各々基本的な性質・由来が同一であることは確認しているか。細胞の分化マーカー（線維芽細胞マーカーなど）は基本的に一致しているか。 3. 子宮内膜症の浸潤能亢進に miR-100-5p が寄与しているが、endometrial cancer では癌進展抑制に寄与しているとの報告がある。この点について、どう解釈すべきか。 4. ECSC の miR-100-5p 発現には個体間でバラツキがあるがなぜか。 5. ECSC において、SMARCD1 と MMP-1 の発現の増減はあるか。NESC に miR-100-5p を発現させたときに認められる変化が、ECSC で同様に認められるか。変化があれば論文の中で示すべきではないか。 6. NESC と ECSC は初代培養細胞とのことであるが、実際に用いた細胞の継代数はどの程度か。また継代による形態等の変化はなかったか。NESC と ECSC は本来エストロゲン依存性の高い細胞であると推察されるが、本研究では一貫してホルモンフリーの状況で培養した細胞が用いられている。生体内とは大きく環境が異なるが問題はないか。 7. miR100 と miR100-5p という言葉は使い分けているのか。 8. NESC と比較し、ECSC では浸潤能が上がるのか。上がるのであれば、ECSC において、miR-100-5p, SMARCD1, MMP-1 の発現の誘導やノックダウンにより、ECSC の浸潤能に変化を及ぼすことを示したほうがよいのではないか。 9. miR-100-5p がアポトーシスや細胞周期、血管新生関連因子発現などへおよぼす影響について検討したか。増殖能はどうであったか。 10. miR-100 の transfection で miR-100 level が 100 倍になったが、ECSC では 4-5 倍しかない。強制発現によって発現量が多すぎてよいのか。Transfection したら ECSC になると考えてよいのか。 11. SMARCD1 の細胞内での局在はどこか。ECSC の SMARCD1 発現量や NESC との比較はしたか。タンパクレベルでの発現は検討したか。ヒト組織での SMARCD1 などの免疫染色は検討したか。 12. MMP1 以外の MMP や TIMP など、細胞浸潤に関与する因子の発現について検討したか。 13. マイクロアレイで、他の発現亢進・低下した遺伝子や、IPA による他のパスウェイについて検討したか。 14. Mir100-5p のエピジェネティックな発現制御の根拠はあるか 15. 子宮内膜症は良性腫瘍であるが、浸潤能などが見られるのか 16. 異所性に子宮内膜が形成されることを「転移」と呼んでいいのか？ 17. 今後の展望として、治療法開発につなげるのか。 <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本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 竹林 兼利

論 文 題 目

hsa-miR-100-5p, an overexpressed miRNA in human ovarian endometriotic stromal cells, promotes invasion through attenuation of SMARCD1 expression

(ヒトの卵巣子宮内膜症性嚢胞において過剰発現している hsa-miR-100-5p は SMARCD1 の発現を減退させることにより浸潤を促進する)

要 旨

【緒言】

子宮内膜症はエストロゲン依存性の疾患であり、閉経前の 6~10% に発症するといわれている。我々の研究でヒトの卵巣子宮内膜症性嚢胞において、hsa-miR-100-5p の発現が亢進していることを報告した。hsa-miR-100-5p は子宮内膜症において異常発現しているマイクロ RNA の一つで、子宮内膜症の発症機序に関与すると推察された。今回の研究では子宮内膜症における hsa-miR-100-5p の病態形成における役割を解明することを目的とした。

【研究対象及び方法】

正常子宮内膜間質細胞 (normal endometrial stromal cells (NESCs)) が子宮内膜症の性質を持つ細胞へと変化するか検討する目的で、子宮内膜症を伴わない NESCs を分離・培養を行い、NESCs に

hsa-miR-100-5p をトランスフェクションし、マイクロアレイ解析、Ingenuity pathway analysis を用いて hsa-miR-100-5p の下流のシグナル経路の解析を行った。また invasion assay、wound repair assay により、浸潤能の機能解析を行った。

【結果】

hsa-miR-100-5p をトランスフェクションすることにより SWItch/sucrose non-fermentable-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 (SMARCD1) の発現を減弱させ、更にその下流に存在する matrix metalloproteinase 1 (MMP1) の mRNA、活性化 MMP1 の蛋白の発現を増強させることが判明した。また機能的解析を invasion assay、wound repair assay を用いて行った結果、hsa-miR-100-5p は NESCs の浸潤能、遊走能を優位に増幅させることが明らかになった。

【考察&結語】

我々は hsa-miR-100-5p の下流のシグナル経路に SMARCD1、MMP1 の関連があることを発見した。hsa-miR-100-5p は腫瘍細胞に対して抑制的に作用し、他の様々な癌腫に役割を果たしていることが報告されている。今回の研究では hsa-miR-100-5p は SMARCD1 を阻害することにより、MMP1 を活性化させ、NESCs の遊走能、浸潤能を増強させることが判明した。

今回の研究の limitation は子宮内膜症間質細胞と子宮内膜症を持たない正所性子宮内膜間質細胞を比較した点である。子宮内膜症をもつ正所性の子宮内膜のサンプリングは臨床的に困難であることから、この点については検討が必要と考える。

今回の研究で、子宮内膜症において発現が亢進している hsa-miR-100-5p は NESCs においても子宮内膜症の進展様式に類似した作用を示したことから、子宮内膜症の病因の一つとしてエピジェネティックなメカニズムが関与していることが判明した。