

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第713号	氏名	Sun Hui
審査委員会委員		主査氏名	松浦 恵子 (印)
		副査氏名	石所 敏理 (印)
		副査氏名	北谷 通阿 (印)
<p>論文題目</p> <p>MicroRNA-329-3p inhibits the Wnt/β-catenin pathway and proliferation of osteosarcoma cells by targeting transcription factor 7-like 1 (MicroRNA-329-3p が転写因子 7 様 1 を標的にして Wnt/β-カテニン経路と骨肉腫細胞の増殖を抑制する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Oncology Research</p> <p>論文要旨</p> <p>骨肉腫 (OS) の病因と進行には、マイクロ RNA (miRNA) の発現調節異常が極めて重要である。TCF/LEF 転写因子ファミリーのメンバーである TCF7L1 は、Wnt シグナル伝達経路の調節因子 β-カテニンと相互作用し、DNA 特異的結合タンパク質として機能する。種々の方法によって OS の増殖とアポトーシスに対する miR-329-3p と TCF7L1 の相互作用の影響を調べた。</p> <p>ヒト間葉系細胞(hMSC)と比較して、5 種類の骨肉腫細胞株 (MG-63, SaOS-2, HOS, NY, Hu09) では miR-329-3p の発現は 2.55-4.38 倍の減少を示したが、TCF7L1 は 5 種類の骨肉腫細胞株において 3.27 - 9.97 倍の増加を示した。デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイおよび qPCR を通じて、TCF7L1 は miR-329-3p の直接のターゲットであることを確認した。次に、miR-329-3p を OS 細胞株にトランスフェクションすると、TCF7L1 発現の減少、細胞増殖、細胞骨格の崩壊、およびアポトーシス小体の形成につながる核凝縮の有意な阻害が生じた。G0/G1 期に細胞周期の停止が起こり、G1/S 移行を抑制した。またアポトーシスを示す PARP/c-PARP 発現の増加が観察された。miR-329-3p を導入すると、Wnt 経路関連タンパク質 Cyclin D1 および c-Myc の発現が抑制された。異種移植実験により、miR-329-3p の過剰発現は、腫瘍組織における TCF7L1 および c-Myc の発現低下をもたらし、ヌードマウスにおける OS 異種移植片の増殖を有意に阻害することが実証された。</p> <p>結果として、骨肉腫において miR-329-3p が TCF7L1 を阻害することによって抗がん効果を示したことから、これらが OS 治療の治療標的となりうることを示唆している。</p> <p>本研究は、骨肉腫の病因に関わるマイクロ RNA の一つ miR-329-3p と、そのターゲット分子 TCF7L1 の機能を <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> の研究により明らかにした。</p> <p>このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第713号	氏名	Sun Hui
審査委員会委員	主査氏名	松浦 恵子 (印)	
	副査氏名	石崎 叔理 (印)	
	副査氏名	北谷 正剛 (印)	
<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> <ul style="list-style-type: none"> ・osteosarcomaの患者年齢は2峰性を示すとのことだが、両群のtumorigenesisにちがいはあるのか？ ・哺乳動物細胞で発現しているTCFアイソフォームはあるのか？また、その中でβ-カテニンと結合できるものはあるか？ ・miRNA-329-3pに絞った理由は何か、TCF7L1に絞ったのは？ ・本研究で用いた5種類のosteosarcoma細胞株は、どの年齢層から樹立されたものか？ ・5つの骨肉腫細胞は同じ性質なのか？それらの細胞の悪性度は、それぞれ異なっているのか？ ・siRNAの配列情報を論文に記載しているか？通常、この種の実験では複数のsiRNA配列を使用するが、本実験では何本のsiRNAを使用したか？ ・mRNAの網羅的発現解析で、1 ngのtotal RNAを使用したと記載されているが本当か？ ・皮下腫瘍を摘出したのは移植何日後か？移植6週後に摘出したにもかかわらずTCF7L1発現低下が維持されているのはなぜか？ ・図6のウェスタンプロット解析で、マイクロRNAまたはsiRNA処理によってTCF-7の量がほぼ50%減少している。TCF-7のタンパク質レベルが50%になると、カテニンの量は完全に消失するというをどのように説明するのか？ ・miRNA-329-3pのMAPK1に対する作用を観察したか？また、miRNA-329-3pによるMAPK1阻害により本論文の結果は説明できないのか？ ・TCF7をsiRNAやマイクロRNAで枯渇させると、図では細胞死を惹起させているように見えるが、この場合もTCF-7は約50%の枯渇である。申請者が示す細胞死はTCF-7枯渇によるものか？ siRNAやマイクロRNAの過剰使用の可能性はないのか？ ・各種腫瘍病変におけるmiR-329-3p発現低下のメカニズムは報告されているのか？ ・miRNA-329-3pの発現量が予後に関係無いのはなぜか？ ・Figure8で腫瘍ボリュームは著明に減少しているにもかかわらず、Ki-67の割合や細胞密度が変わっていないのはなぜか？ <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 Sun Hui

論 文 題 目

MicroRNA-329-3p inhibits the Wnt/ β -catenin pathway and proliferation of osteosarcoma cells by targeting transcription factor 7-like 1

(MicroRNA-329-3p が転写因子 7 様 1 を標的にして Wnt/ β -カテニン経路と骨肉腫細胞の増殖を抑制する)

要 旨

Objective

Dysregulated expression of microRNAs (miRNAs) is pivotal in the pathogenesis and progression of osteosarcoma (OS). Transcription factor 7-like 1 (TCF7L1), a member of the T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) transcription factor family, interacts with the Wnt signaling pathway regulator β -catenin, functioning as a DNA-specific binding protein. This study aims to elucidate the regulatory relationship between miRNA and mRNA in osteosarcoma cells, employing diverse methodologies, and to delineate the impact of the interaction between miR-329-3p and TCF7L1 on OS proliferation and apoptosis.

Materials and Methods

Utilizing microarray data encompassing miRNA and mRNA expression in five osteosarcoma cell lines (MG-63, SaOS-2, HOS, NY, Hu09) and human mesenchymal stem cells (hMSCs), we

validated through qPCR that miR-329-3p was significantly down-regulated and TCF7L1 was markedly up-regulated in osteosarcoma cell lines. Through dual-luciferase reporter gene assays and qPCR experiments, we confirmed the direct targeting effect of miR-329-3p on TCF7L1. Subsequently, the inhibitory effect of miR-329-3p on cell proliferation was affirmed through in vitro cultures of MG-63 and SaOS-2 cells, and a nude mouse tumor-bearing experiment corroborated the sustained efficacy of this inhibitory effect in vivo. Cellular changes post-miR-329-3p transfection were observed using immunofluorescence technology. Flow cytometry experiments explored the mechanism of inhibition and its impact on the cell cycle. The effect of miR-329-3p on the Wnt β -catenin pathway was analyzed through Western experiments and immunohistochemistry.

Results

In comparison to hMSCs, miR-329-3p exhibited a 2.55- to 4.38-fold reduction, while TCF7L1 showed a 3.27- to 9.97-fold increase in osteosarcoma cells. Transfection of miR-329-3p into OS cell lines resulted in decreased TCF7L1 expression, significant inhibition of cell proliferation, cytoskeletal disintegration, and nuclear condensation leading to apoptotic body formation. Cell cycle arrest occurred in the G0/G1 phase with a blockade in G1/S transition. Increased expression of PARP/c-PARP, indicative of apoptosis, was observed. Introduction of miR-329-3p also suppressed the expression of Wnt pathway-related proteins Cyclin D1 and c-Myc. Xenograft experiments demonstrated that miR-329-3p overexpression significantly inhibited OS xenograft growth in nude mice, accompanied by decreased expression of TCF7L1 and c-Myc in tumor tissues.

Conclusion

MiR-329-3p, significantly diminished in OS cells, exerts a suppressive role in tumorigenesis and proliferation by targeting TCF7L1 both in vitro and in vivo. Osteosarcoma cell cycle arrest and Wnt pathway inhibition were observed upon miR-329-3p-mediated regulation of TCF7L1. In summary, these findings suggest that miR-329-3p manifests anticancer effects in osteosarcoma by inhibiting TCF7L1, thereby emerging as a potential therapeutic target for OS treatment.