




報告番号

香大医博乙 第 292号

学位論文審査の結果の要旨

令和 2年 7 月 3 日

審査委員	主 査	辻 晃 仁 
	副 主 査	金 西 賢 治 
	副 主 査	丹 形 尚 
申請者	野村 圭	
論文題目	Correlation between microRNA-527 and glypican-3 in hepatocellular carcinoma	
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)	

〔 要 旨 〕

- 研究開始当初の背景: 90年代の急速な勢いでヒゲムアゲ外が進行した。その結果、予想に反してゲノム DNA 30 億からタンパクの翻訳に使用される遺伝子は、1.5%にすぎず、タンパク数にして2万2千を規定しているにすぎないということが判明した。さらに、意外な事に、ゲノム DNA の70%が RNA に転写されており、細胞内には膨大な未知の noncodingRNA が存在することが判明した。マイクロRNA (miRNA) は、このnoncodingRNA の範疇に属しており、これらmiRNAの機能としては 特異的なメッセンジャーRNA (mRNA) の3' 非翻訳領域に部分相補的に結合し、そのmRNAの翻訳、遺伝子発現を抑制している。最近、種々の癌において発現しているmiRNA が、正常組織と比較し、著明に変化していることが報告されており、特定のmiRNA が、細胞の癌化・進展に関与しているのではないかと推測されている。このことからある種のmiRNA が、HCC特異的に発現増強・減弱し、HCCの発生、増殖、進展に関与している可能性がある。正常肝、慢性肝炎、肝硬変、HCCにおいてmiRNA の網羅的な発現プロファイリングを作成することは、発癌機序、予後予測、創薬などの新たな治療法開発の手がかりとなることが期待される。さらに、miRNA の研究は、将来的には癌のみならず、さまざまな疾病の診断、治療、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術 となる可能性を秘めている。
- 研究の目的:HCCにおけるmiRNA の網羅的解析及び癌特異的miRNA の機能解析を行なう。
- 研究の方法:miRNA の網羅的解析は、アレイチップ用いて、検討しコンピューター解析を用いて、標的遺伝子を予測した。miRNA-527 の 結合部位を含む cDNA が入ったglypican-3 の発現ベクターに、一過性発現に適した細胞株である COS7 にリボソーム法で遺伝子導入し、12 時間後にmiRNA-527 を導入し、その12 時間後の glypican-3 の発現を Western blot で調べる。
- 研究成果: miRNA 網羅的解析において、そのクラスター解析において、肝硬変とHCCは異なるプロファイリングを形成していた。また、最も差異が認められた、miRNA は、miRNA-527 であり、HCCにおいて、極めて減弱していた。次に、miRNA-527 が、どのmRNA 分子を制御するかを予測した。予測により、glypican-3 が、miRNA-527 の標的遺伝子の可能性を見出した。確かに、miRNA-527 が減弱していたHCCにおいては、glypican-3の発現は亢進していた。まず、HCCにおいて減弱する miRNA-527 のターゲット分子 が glypican-3 遺伝子であることを次の方法で 実験的に確認した。miRNA-527 の結合 部位を含む cDNA が入ったglypican-3の発現ベクターを、一過性発現に適した細胞株である COS7 にリボソーム法で遺伝子導入し、導入後、12 時間後にmiRNA-527 を導入し、その12 時間後のglypican-3 の発現を Western blot で調べた。さらに、COS7 に glypican-3 発現ベクターを導入 12 時間後、コントロールmiRNA を導入し、その12 時間後の glypican-3 の発現をWestern blot

で解析した。COS7 の glypican-3 の発現は、コントロールmiRNA 導入群と比較し、miRNA-527 導入群は、glypican-3 のタンパクレベルは減弱した。また、HCCにおいてmiRNA - 527 の機能解析をする上で、リポソーム法によりmiRNA 活性を上げる合成miRNA - 527 を癌細胞内に導入すると、MAP キナーゼカスケード亢進させていた。さらに、miRNA - 527による遺伝子導入は、Huh-7細胞株におけるglypican-3の発現も阻害した。これは、HCC組織のmiRNA - 527がglypican-3遺伝子発現を標的とする重要な新規miRNAである可能性を示している。miRNA - 527によって調整されているglypican-3は、HCCの発生と進行に関与している可能性がある。

【審査時質問】

・実験に使用した HCC 細胞株は複数あるようだが、実臨床に則したものであったか。
 分化度は低分化、中分化、高分化、未分化であり、ウイルスは B 型、C 型、nonB・nonC と実臨床を網羅できていると考えられる。

・今回の研究内容のうち現時点で臨床に応用されていることはあるか。
 glypican3 はすでにある程度マーカーとしていろいろな研究がされており、今後は miRNA とあわせることによって新たなマーカーとして、それも早期発見や悪性度のマーカーを考えている。

・miRNA-527、glypican-3 を臨床で簡便に測定することは可能か、コストはどうか。
 glypican3 は検査が開発されており比較的安価で検査が可能となっているが、miRNA はまだコストがかかっているのが現状である。

・癌部と非癌部で 4 種類の miRNA 発現量に違いがあったが、そのなかでも減少していた miRNA へ注目し実験を進めていった理由はなにか。

上昇していた miRNA の target gene は確認されているが、527 はまだ確認されていなかったため研究対象とした。上昇していた miRNA はおそらくは腫瘍を抑制させるような target gene であることが予測される。

・実際の HCC 患者として 4 例を扱っていたが、このような実験系ではその症例数は妥当な数であるか。
 症例数は多いに越したことはないが、同意書所得が 4 例であったため今回は肝癌細胞株とあわせて評価を行った形となった。

・発現量の増加していた miRNA に関しては既にある程度調べ尽くされているのでしょうか。
 target gene は確認されているが、今後はこれらの miRNA についても研究予定である。

・非癌部の組織背景はどうであったか。
 4 症例とも非癌部は肝硬変でしたが、いずれも慢性肝炎から肝硬変となり HCC へと経過をたどったものである。今回肝硬変を選んだ理由として切除標本の正常肝部が肝硬変であったこと、また癌の状態に一番近いものとして肝硬変を比較を行った。

・C 型肝炎以外を背景とする症例は使わなかったのか。
 今回は C 型肝炎に注目して研究を行ったため今後は B 型肝炎や他の肝疾患との比較なども含めて今後の研究課題である。

・NASH からの発癌にも同様なメカニズムがはたしている可能性はあるのか。ぜひ今後の検討を。
 可能性は十分に考えられるため今後検討予定である。

・将来的に glypican3 の腫瘍マーカーとしての応用の可能性はあるか。
 AFP、PIVKA II 陰性の HCC に対するマーカーとして十分に期待がもてるものであり、miRNA も合わせるとことで悪性度や再発率などにも役立つものと考えている。

・ほかの癌腫について glypican3 関連の研究はあるのか。
 悪性黒色腫、卵巣細胞腺癌、肺扁平上皮癌、一部の小児がんなどにおいて特異的に発現が認められており、卵巣がんにおいては Umezura の報告 (Glypican-3 expression predicts poor clinical outcome of patients with early-stage clear cell carcinoma of the ovary. J Clin Pathol . 2010 Nov;63(11):962-6.) では転帰不良の予測する研究などが行われている。

以上のようにいずれの質問に対しても適切な回答が行われた。以上の結果を総合的に判断して、審査員は一致して本論文が博士論文としてふさわしいものであると判断した。

掲 載 誌 名	Oncology Letters		第 卷, 第 号
(公表予定) 掲 載 年 月	2020年1月 (掲載受理)	出版社 (等) 名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。