

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 三浪 友輔

学位論文題名

ヒト滑膜肉腫における microRNA の機能解析
(Analysis of microRNAs in human synovial sarcoma)

【背景と目的】

MicroRNA は、蛋白質をコードしない 18-24 塩基の小さな RNA であり、標的の mRNA の 3'-UTR をターゲットとし、転写後の蛋白質合成を制御し、増殖、アポトーシスなどの細胞機能を調節する。現在までに、上皮性、非上皮性、血液系腫瘍を含む様々ながん種で microRNA の発現亢進や低下が報告されており、癌細胞の増殖、アポトーシス、転移などの基本的な細胞機能に重要な機能を担っていると考えられている。

滑膜肉腫は軟部肉腫の約 8% を占める腫瘍である。好発年齢は青壮年期であり、四肢関節近傍に好発する。治療として、外科的手術と化学療法を含む集学的治療を行うが、5 年生存率は約 60%、10 年生存率は約 30% 程度と予後不良であり、より有効な治療法の確立が望まれている。現在までに、滑膜肉腫における microRNA についての報告は、調査した限りでは過去に 2 報告のみである。1 つは滑膜肉腫において microRNA の発現パターンを検討したという報告、もう 1 つは microRNA183 が、がん抑制遺伝子である EGR1 をターゲットとし、がん細胞の cell migration を促進するという報告である。前述のように microRNA は様々ながん腫において、増殖、アポトーシスなどの基本的な細胞機能を担っていると報告されており、その機能の詳細を明らかにする事は、がん治療における新規治療の開発に貢献する可能性がある。しかしながら、滑膜肉腫を含め肉腫におけるがん関連 microRNA の発現及びその機能の詳細の多くは未だ不明であり、一刻も早い microRNA の機能詳細の解明が待たれるところである。そこで本研究では、滑膜肉腫のがん細胞機能を制御する microRNA およびその標的分子、メカニズムを同定し、最終的に臨床応用を検討する目的で、滑膜肉腫における microRNA の機能の解明に向けた研究を開始した。

【材料と方法】

最初に、現在までに判明している約 140 種類のがん関連 microRNA (oncomiR) を含む lentivirus である Oncomir Precursor Virus Library (System Bioscience, Mountain View, CA, USA) を滑膜肉腫細胞株 SYO-1、Fuji、HS-SYII に感染させ、oncomiR 発現細胞株を樹立した。続いて、*in vitro* でのコロニー形成能、*in vivo* でのヌードマウスの皮下における腫瘍形成能をそれぞれコントロール細胞株と比較したところ、コロニー形成能、腫瘍形成能ともに上昇した。RNA のシーケンス解析を行い、形成されたコロニー、ヌードマウスの皮下に形成された腫瘍から oncomiR を同定した。次いで、同定した oncomiR の過剰発現細胞株を樹立し、細胞増殖能、コロニー形成能、マウス生体内での腫瘍形成能を検討した。さらに、Pictar、Miranda 等のアルゴリズムやマイクロアレイ解析を用いて当該 oncomiR の標的分子を探索した。探索した標的分子については、ルシフェラーゼアッセイにより直接の標的となり得るかを検討した。

【結果】

oncomiR library を導入した Fuji 細胞は、コントロール細胞と比較してより大きなコロニーを形成し、それらのコロニーから miR-17 を同定した。miR-17 過剰発現 Fuji 細胞は、コント

ロール細胞と比較して細胞増殖能およびコロニー形成能が有意に上昇した。miR-17 を過剰発現する事で、p21 Waf1/Cip1 の発現量は減少し、滑膜肉腫の標準的化学療法で用いられる doxorubicin を処理し p21 を誘導した場合において、その差は顕著となった。また、p21-3' UTR を用いたルシフェラーゼアッセイにより、miR-17 は p21 を直接標的としてその発現量を低下させることが明らかとなった。さらに滑膜肉腫の発生原因と考えられている SS18-SSX がん融合遺伝子産物の過剰発現により、miR-17 が誘導される事が明らかになった。一方、ヌードマウスの皮下における腫瘍形成能を検討した所、miR-17 過剰発現 Fuji 細胞は、コントロール細胞と比較してより大きな腫瘍を形成し、組織学的悪性度も上昇した。滑膜肉腫の臨床検体においても、miR-17 の内因性発現が認められた。

一方、oncomiR library を導入した HS-SYII 細胞は、ヌードマウスの皮下で大きな腫瘍を形成し、この腫瘍から miR-326 を同定した。miR-326 過剰発現 HS-SY II 及び SYO-1 細胞は、コントロール細胞と比較して細胞増殖能およびコロニー形成能が有意に上昇した。また、ヌードマウスの皮下における腫瘍形成能を検討した所、miR-326 過剰発現 SYO-1 細胞は、コントロール細胞と比較してより大きな腫瘍を形成し、組織学的悪性度も上昇した。更に、miR-326 の標的分子を探索・評価すべくマイクロアレイ解析を実施し、現在結果を検討中である。

【考察】

滑膜肉腫は従来の化学療法に抵抗性示すことがよく知られている。miR-17 を阻害する事で、p21 の発現を上昇させる事は、ヒト滑膜肉腫の治療において有用な影響を与える可能性が示唆された。また、滑膜肉腫において 90%以上で陽性となる SS18-SSX がん融合遺伝子が miR-17 を誘導した事は特記すべき結果であった。

一方現在まで、肉腫において miR-326 の報告はされておらず、本検討により初めて滑膜肉腫において miR-326 を同定した。miR-326 を過剰発現させる事で、滑膜肉腫において、細胞増殖能、コロニー形成能及びマウス生体内での腫瘍形成能が上昇する事を明らかにした。miR-326 の直接のターゲットについては今後の実験の課題であり、現在マイクロアレイの結果を考察中である。

【結論】

本研究において、初めて miR-17 が滑膜肉腫の増殖能促進において重要な役割を担っている事を明らかにした。miR-17 を過剰発現する事で、コロニー形成能、細胞増殖能、腫瘍形成能が *in vitro* と *in vivo* の両方で上昇し、かつ miR-17 が p21 Waf1/Cip1 を直接標的としている事を明らかにした。miR-17 は滑膜肉腫において、特に化学療法における新規生物学的マーカー及び新規分子標的治療薬として有用である可能性が示唆された。

さらに本研究により、肉腫分野において初めて、腫瘍悪性化における miR-326 の役割を報告し、また miR-326 を過剰発現させる事で、滑膜肉腫細胞において、細胞増殖能、コロニー形成能及びマウス生体内での腫瘍形成能が上昇する事を明らかにした。miR-326 の直接のターゲットについては今後の研究課題ではあるが、miR-326 の機能を詳細に明らかにする事は、滑膜肉腫の新規治療法の解明において有効である可能性が示唆された。