



Title	miR-615-3p Expression Level in Bone Marrow is Associated with Tumor Recurrence in Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	向井, 亮太
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51898
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	向井 亮太
論文題名 Title	miR-615-3p Expression Level in Bone Marrow is Associated with Tumor Recurrence in Hepatocellular Carcinoma (骨髄中のマイクロRNA615-3pの発現は、肝細胞癌における腫瘍再発に関与する)
論文内容の要旨	
〔目的〕 肝細胞癌は、根治的切除を行っても術後に高率に転移・再発を認めるため、予後不良な疾患である。そのため肝細胞癌に対する治療成績向上には、転移・再発の機序に基づいた新規治療法の開発が必要となる。しかしながら現時点では、その機序は十分に解明されておらず、肝細胞癌の治療における重要な課題のひとつである。 近年、癌の転移・再発において骨髄中に存在する播種性癌細胞（Disseminated Tumor Cells; DTCs）が重要な役割を果たすことが報告されている。このDTCsの関与については、存在自体が癌の転移・再発と直接関連するという報告が散見される一方、DTCsは早期癌においても存在していることが確認されていることから、DTCsの存在だけではなく、その生物学的特性が転移・再発に関係する可能性が示唆される。一方、マイクロRNA（miRNA）は、癌の転移・再発の制御に深く関わりと報告されており、これらを合わせて考えると、DTCsにおけるmiRNAの発現が癌の転移・再発を規定する可能性が示唆される。そこで今回、肝細胞癌切除例において、術後の予後情報とDTCsにおけるmiRNA発現との関連性を評価し、肝細胞癌の転移・再発に関与するmiRNAについて検索した。 〔方法〕 2010年5月から2010年8月の間に大阪大学医学部附属病院にて根治切除を施行した肝細胞癌9例を対象とし、術後の予後情報に基づいて再発群（4例）と無再発群（5例）に分けた。対象症例において、手術時に採取した骨髄液から比重遠心法により単核細胞分画を分離し、次に磁気細胞分離法によりsortingを行い、DTCs分画を分離した。本研究ではCD14-/CD45-/EpCAM+分画をDTCsと定義した。同分画細胞の網羅的miRNA発現解析を行い、解析結果を2群間で比較し、その結果に基づき、特定のmiRNAに着目した。着目したmiRNAを肝癌細胞株（PLC/PRF/5、HuH7）に遺伝子導入し、癌細胞株の性質の変化を評価した。遺伝子導入は、miR-615-3p precursor（pre-miR-615-3p）、antisense miR-615-3p inhibitor（anti-miR-615-3p）を用いてリポフェクタミン法によって行った。癌細胞株の性質は、細胞数のカウントによるproliferation assay、MTT assayによるgrowth-inhibitory assay、マトリゲルで覆われた細胞浸潤チャンバーを用いたinvasion assayを行い、それぞれ細胞増殖能、薬剤耐性能、腫瘍浸潤能を解析することによって評価した。 〔結果〕 DTCsにおける網羅的miRNA発現解析の結果より、再発群で無再発群と比較して有意に発現が上昇していたmiRNAとして3個のmiRNAが同定され、そのうちmiR-615-3pに注目した。肝細胞癌細胞株におけるmiR-615-3pの発現をqRT-PCR法にて評価し、低発現株であったPLC/PRF/5と高発現株であったHuH7を、遺伝子導入を行う細胞株として選出した。PLC/PRF/5にmiR-615-3pを強制発現させると、対照の細胞株と比較して、増殖能および薬剤耐性の増強が認められた。また、HuH7においてmiR-615-3pの発現を抑制させると、増殖能および薬剤耐性の減弱を認めた。また同強制発現株では、Epithelial-Mesenchymal Transition（EMT）様の形態変化、EMTに関連する分子の発現量の変化（E-cadherinの低下、N-cadherin、Fibronectin、Vimentinの増加）、浸潤能の増強を認めた。 〔考察〕 肝細胞癌術後再発症例のDTCsにおいて、肝細胞癌における癌細胞としての性格を亢進させる機能を持つmiR-615-3pの発現が、無再発症例よりも高かった。この結果は、DTCsの生物学的特性が肝細胞癌再発に関与することを示すものであった。本研究では、癌組織自体におけるmiR-615-3pの発現を評価していないため、このようなmiR-615-3pの高発現が全ての癌細胞において認められるのか、或いはDTCsに特徴的であるのか、については現時点では明らかでないが、少なくともDTCs中のmiR-615-3p発現を制御することで肝細胞癌術後再発を抑制できる可能性が示唆されると考えられた。 〔総括〕 DTCsにおけるmiR-615-3pの発現が肝細胞癌の再発を規定すると考えられた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 向井 亮太		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 土岐 祐一郎
	副 査	大阪大学教授 野々村 祝夫
	副 査	大阪大学教授 奥村 明之進

論文審査の結果の要旨

骨髓中に存在する遊離癌細胞（DTCs）が癌の転移再発に関連することが報告されているが、その分子レベルでの機序は明らかにされていない。本研究では、肝細胞癌におけるDTCsが癌の転移再発を制御する機序として、近年、癌の転移再発の制御との関連が報告されているマイクロRNA（miRNA）に注目し、肝細胞癌におけるDTCsにおいて再発と関連するmiRNAを同定することを目的とした。肝細胞癌手術症例9例を対象として、対象症例より手術時に採取した骨髓液より、CD14-CD45-EpCAM+分画をDTCsとして分離した。網羅的遺伝子発現解析により、分離したDTCs分画におけるmiRNAの発現を評価したところ、術後再発を認めた症例において、再発を認めなかった症例と比較して、高発現であったmiRNAとしてmiR-615-3pが同定された。肝癌細胞株にmiR-615-3pを強制発現させると、対照の細胞株と比較して、増殖能、薬剤耐性の増強が認められた。また強制発現株では、上皮間葉系移行様の形態変化およびmRNA発現の変化、浸潤能の増強が認められた。これらの結果は、miR-615-3pが癌の悪性度を亢進させる機能を有することを示すものであり、再発を規定する因子である可能性を支持するものであった。以上より、肝細胞癌のDTCsにおけるmiR-615-3pの発現が再発を規定すると考えられた。本研究の成果は、学位の授与に値すると考えられる。