



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | WT1の抑制性調節因子miR-125aの新規標的遺伝子Zbtb7aの同定                                                                                                                  |
| Author(s)    | 北條, 望                                                                                                                                                 |
| Citation     | 大阪大学, 2016, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/55838">https://hdl.handle.net/11094/55838</a>                                                                   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 氏 名 ( 北 條 望 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                      |
| 論文題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | WT1の抑制性調節因子miR-125aの新規標的遺伝子Zbtb7aの同定 |
| 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                      |
| <p>microRNA-125a(miR-125a)は白血病や、肺癌、乳癌、肝癌など様々な固形癌において発現低下している。われわれはこれまでに、miR-125aががんの発症や進展に深く関わる癌遺伝子WT1の3'UTRに直接作用し、その発現を転写後段階で抑制することを明らかにしてきた。さらに、miR-125a欠損マウスは骨髓系細胞の異常増殖を特徴とする骨髓増殖性疾患(MPD)を発症することを報告した。これらの知見は、miR-125aががん抑制性miRNAとして重要な役割を果たしていることを示唆する。しかし、miR-125aの標的となり発現が抑制される、癌遺伝子様機能を果たす遺伝子は未だ完全に明らかではない。本研究では、我が国の統計では男性の癌死亡の第一位、女性の癌死亡の第二位を占める重要な疾患である肺癌においてmiR-125aのがん抑制機能をより深く理解するため、新規miR-125a標的遺伝子を同定することを目的とした。はじめに、2種類のヒト肺癌細胞株A549, LU99BにmiR-125aの発現ベクターを導入し、miR-125aが肺癌細胞の増殖に与える影響を解析した。miR-125aは両細胞株の細胞増殖を有意に抑制した。この細胞増殖抑制には、アポトーシス誘導およびG1期での細胞周期停止が関与していた。次に、この細胞増殖抑制効果に関与するmiR-125a新規標的遺伝子の同定を目的に、miR-125a欠損マウス造血幹細胞の遺伝子発現プロファイル解析および3つのmiRNA標的予測データベースを用いた解析に基づき、癌遺伝子様機能を持つ3つの候補遺伝子Zbtb7a, TEF, MGLLを抽出した。ヒト肺癌細胞株においてmiR-125aは、3つの候補遺伝子のうちZbtb7aのmRNAおよびタンパク発現を抑制したが、MGLLの発現を変化させなかった。TEFの発現は使用した細胞株では検出されなかった。Zbtb7aのmRNA発現レベルは、miR-125a欠損マウスの肺前駆細胞(CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>)において、野生型マウスの肺前駆細胞に比較し有意に上昇していた。miR-125aは、ヒト肺癌細胞株においてEGFP-Zbtb7a-3'UTRレポーターの活性を有意に低下させた。siRNAによるZbtb7aの発現抑制は、ヒト肺癌細胞のG1期での細胞周期停止およびアポトーシスを誘導し、miR-125a導入時と同様の細胞増殖抑制効果を示した。さらに、非小細胞肺癌患者56例の癌部組織検体において、miR-125aとZbtb7aの発現が有意に逆相関していた。これらの結果は、肺癌細胞の細胞周期進行を促進し、アポトーシスを抑制するZbtb7aが、miR-125aにより直接発現を抑制される標的遺伝子であり、miR-125a-Zbtb7aシグナルの破綻が肺癌の発症・進展に関与する可能性を示している。</p> |                                      |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 北 條 望 ) |     |              |
|---------------|-----|--------------|
|               | (職) | 氏 名          |
| 論文審査<br>担当者   | 主 査 | 寄附講座教授 尾路 祐介 |
|               | 副 査 | 教授 三善 英知     |
|               | 副 査 | 教授 山本 浩文     |

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、白血病や様々な固形悪性腫瘍で高発現する癌遺伝子ウィルムス腫瘍WT1の抑制性調節因子として同定されたマイクロRNA、miR-125aについての基礎的研究である。論文の概要は下記の通りである。

前半の研究ではWT1の3' UTRに結合し、WT1遺伝子の発現を抑制するmiRNAとしてmicroRNA-125a (miR-125a)を同定した。miR-125a欠損マウスはWT1を高発現し、骨髄系細胞の増殖を特徴とする骨髄増殖性疾患 (MPD)を発症した。miR-125a欠損MPDマウスの造血幹/前駆細胞におけるin vitro骨髄系コロニー形成能は、shRNAを用いたWT1の発現抑制により抑制された。さらにMPDの発症率および重症度がmiR-125aヘテロ欠損マウスに比較しmiR-125aホモ欠損マウスで低かったことから、miR-125aの欠失を補う代償機構の存在が示唆された。この代償機構についてさらに解析するため、miRNA array解析を行い、miR-486がmiR-125aの完全欠失により発現誘導され、miR-125aに代わってWT1の過剰発現およびMPDの発症を抑制する可能性が示された。これらの結果はmiR-125aおよびmiR-486によるWT1の転写後段階における発現制御機構の存在を初めて明らかにし、造血および腎発生メカニズムの解明に貢献するものである。

後半の研究では、我が国の統計では男性の癌死亡の第一位、女性の癌死亡の第二位を占める重要な疾患である肺癌においてmiR-125aのがん抑制機能をより深く理解するため、新規miR-125a標的遺伝子を同定することを目的とした。はじめに、2種類のヒト肺癌細胞株A549, LU99BにmiR-125aの発現ベクターを導入し、miR-125aが肺癌細胞の増殖に与える影響を解析した。miR-125aは両細胞株の細胞増殖を有意に抑制した。この細胞増殖抑制には、アポトーシス誘導およびG1期での細胞周期停止が関与していた。次に、この細胞増殖抑制効果に関与するmiR-125a新規標的遺伝子の同定を目的に、miR-125a欠損マウス造血幹細胞の遺伝子発現プロファイル解析および3つのmiRNA標的予測データベースを用いた解析に基づき、癌遺伝子様機能を持つ3つの候補遺伝子Zbtb7a, TEF, MGLLを抽出した。ヒト肺癌細胞株においてmiR-125aは、3つの候補遺伝子のうちZbtb7aのmRNAおよびタンパク発現を抑制したが、MGLLの発現を変化させなかった。TEFの発現は使用した細胞株では検出されなかった。Zbtb7aのmRNA発現レベルは、miR-125a欠損マウスの肺前駆細胞 (CD45-CD31-Sca-1+)において、野生型マウスの肺前駆細胞に比較し有意に上昇していた。miR-125aは、ヒト肺癌細胞株においてEGFP-Zbtb7a-3' UTRレポーターの活性を有意に低下させた。siRNAによるZbtb7aの発現抑制は、ヒト肺癌細胞のG1期での細胞周期停止およびアポトーシスを誘導し、miR-125a導入時と同様の細胞増殖抑制効果を示した。さらに、非小細胞肺癌患者56例の癌部組織検体において、miR-125aとZbtb7aの発現が有意に逆相関していた。これらの結果は、肺癌細胞の細胞周期進行を促進し、アポトーシスを抑制するZbtb7aが、miR-125aにより直接発現を抑制される標的遺伝子であり、miR-125a-Zbtb7aシグナルの破綻が肺癌の発症・進展に関与する可能性を示している。

これらの研究により、北條 望氏はマイクロRNA125aがWT1およびZbtb7aというふたつの癌遺伝子の発現を直接

抑制し、miR-125aの造血系組織や気管上皮組織の幹・前駆細胞における発現の低下・欠失が骨髄増殖性疾患や肺癌の発症・進展に関与することを明らかにした。

これらの研究は、マイクロRNA miR-125aの癌抑制機能の分子学的機序およびその破綻の癌発症・進展における役割を明確にした点で大変意義深いものである。さらに本研究は、miR-125aを用いたRNA医薬の開発につながりうるもので今後の研究の発展が期待される。

以上のように本研究の科学的価値は高く、学位授与に値する内容であると認める。