The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of microRNA-487b as a negative regulator of liver metastasis by regulation of KRAS in colorectal cancer
Author(s)	波多, 豪
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61586
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	波多　豪
論文題名 Title	Identification of microRNA-487b as a negative regulator of liver metastasis by regulation of KRAS in colorectal cancer（大腸癌におけるKRAS制御を介した肝転移抑制因子としてのマイクロRNA-487bの発現意義）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

本邦において大腸癌の患者数は増加の一途をたどっており、部位別癌死亡数で男性3位、女性1位を占めている。大腸癌は主に肝臓に転移し、大腸癌死亡の少なくとも3分の2が肝転移によるとされる。一方で、原発巣に関する研究と比較し、転移へ発展するメカニズムについてはまだ十分解明されていないのが現状である。

近年、大腸癌の発生、進展にmicroRNA（以下、miRNA）が関与することが報告され、診断のみならず、予後および薬剤感受性を予測するバイオマーカー、さらには新規治療標的として注目されている。われわれは、肝転移に関与するmiRNAを探索することを目的に、臨床検体を用いてmiRNAの網羅的解析を行い、肝転移巣で低下するmiRNAを同定、報告してきた。本研究では、この解析結果に基づき、新規のmiRNAを同定し、その標的遺伝子を探索することを目的とした。

〔方法(Methods)〕

試験コホートとして、NCBI Gene Expression Omnibusのデータベースに登録したマイクロアレイデータ（登録番号：GSE72199）を用い、肝転移に関与すると考えられるmiRNAについて候補の絞り込みを行った。検証コホートとして、2003年から2013年の間に当科とその関連施設で手術を受けた大腸癌患者134例を対象とし、腫瘍組織から抽出したRNAを用いて、miRNAの発現を定量的PCRによって確認した。さらに、公開データベースを用いて標的遺伝子を選出し、ルシフェラーゼアッセイによってその結合を確認の上、定量的PCR、ウェスタンブロットで発現を測定した。

〔成績(Results)〕

GSE72199（転移を有さない大腸癌原発巣16例、肝転移を有する大腸癌原発巣12例、および肝転移巣8例の計36例）において、転移を有さない原発巣と比較して肝転移巣で発現が低下するmiRNAを38種類同定した。その中で、肺癌や神経膠腫においてanti-oncomirとして報告されているmiRNA-487bに注目した。検証コホート（転移を有さない大腸癌原発巣96例、肝転移を有する大腸癌原発巣22例、および肝転移巣16例の計134例）において、miRNA-487bは、転移を有さない大腸癌原発巣と比較して、肝転移を有する大腸癌原発巣、および肝転移巣で有意に発現が低下していた。

ヒト大腸癌細胞株のHCT116とDLD-1に、リポフェクション法を用いてmiRNA-487bを導入すると、細胞増殖能、コロニー形成能、および浸潤能が有意に低下した。肺癌において、miRNA-487bはKRASを標的とすることが報告されており、大腸癌でも同様の結果が得られるか検証した。ヒト大腸癌細胞株において、miRNA-487bはKRASの発現を抑制し、その下流シグナル分子であるERK、AKTのリン酸化を抑制することを確認した。ERK下流のSRE (serum response element) レポーターアッセイにおいて、miRNA-487bはルシフェラーゼ活性を低下させ、転写活性を抑制することを示した。また、miRNA-487b はcleaved-PARPの発現を抑制し、抗アポトーシス作用を持つと考えられた。また、公開データベースにより、WNT/β-cateninシグナル経路の膜受容体であるLRP6がmiRNA-487bの標的遺伝子として予測された。ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、miRNA-487bがLRP6を直接標的とすることを確認した。さらにヒト大腸癌細胞株において、miRNA-487bがLRP6のタンパク発現、およびリン酸化を減少させることを示した。

miRNA-487bの臨床的意義を明らかにするため予後解析を行った。全生存期間において、miRNA-487b低発現群はmiRNA-487b高発現群と比較して有意に予後不良であった。単変量・多変量解析を行ったところ、miRNA-487bの低発現は、独立した予後不良因子であった。

〔総　括(Conclusion)〕

大腸癌において、miRNA-487bは肝転移で発現が低下し、標的遺伝子としてKRASおよびLRPの発現を制御していることが示された。MiRNA-487bは肝転移抑制因子として、有用な新規治療標的となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　波多　豪

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	森　正樹
	副　査	大阪大学教授	野村　祝夫
	副　査	大阪大学教授	奥山　宏臣

論文審査の結果の要旨

大腸癌は主に肝臓に転移し、大腸癌死亡の少なくとも3分の2が肝転移によるとされるが、原発巣に関する研究と比較し、転移へ発展するメカニズムについてはまだ十分解明されていないのが現状である。本研究ではmicroRNA（以下、miRNA）に着目し、肝転移に関与する新規のmiRNAを同定し、その標的遺伝子を探索することを目的に研究を計画した。

当教室から登録した公開データベースより、大腸癌原発巣と比較して肝転移巣で発現が低下するmiRNA-487bを同定した。ヒト大腸癌細胞株で、miRNA-487bは細胞増殖能と浸潤能を抑制した。また、KRASとその下流シグナルを抑制し、WNT/β-cateninシグナルの膜受容体であるLRP6を直接の標的遺伝子として抑制することを示した。大腸癌切除検体を用いた予後解析では、miRNA-487bの発現が、病期とともに独立した予後予測因子であることを明らかにした。

本研究により、大腸癌において、miRNA-487bは肝転移で発現が低下し、標的遺伝子としてKRASおよびLRPの発現を制御していることが示され、大腸癌に対する新規バイオマーカー、治療法を開発する上で、有用な手がかりとなると考えられる。

以上より、大腸癌肝転移に関与する可能性のあるmiRNA-487bを同定した本研究は、癌研究における新たな知見と考えられ、学位に値するものと認める。