

氏 名 ・ (本籍)	奈良 健平 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	医博甲第 927 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	医学系研究科医学専攻
学 位 論 文 題 名	Altered miRNA expression in high-fat diet-induced prostate cancer progression (高脂肪食摂取下での前立腺癌進行に關与する miRNA の発現および機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 佐々木 雄彦 (副査) 教授 田中 正光 教授 柴田 浩行

学 位 論 文 内 容 要 旨

論 文 題 目

Altered miRNA expression in high-fat diet-induced prostate cancer progression

(高脂肪食摂取下での前立腺癌進行に関与する miRNA の発現および機能解析)

申請者氏名 奈良 健平

研 究 目 的

高脂肪食は前立腺癌のリスク因子といわれているが、その分子生物学的機序は明らかではない。近年、食事は癌細胞内の様々な microRNA (miRNA) の変化を介して、その進展・増殖に関与する可能性が示唆されている。今回、我々は高脂肪摂取下の前立腺癌増殖に関与する miRNA を網羅的発現解析の手法で同定し、その関連候補 miRNA の機能解析および標的分子探索を行った。

研 究 方 法

4-6 週齢 BALB マウスに LNCaP を皮下移植し、高脂肪食群 (HFD)、コントロール食群 (CD) の 2 群 (各群 15 匹) に分けて、腫瘍の大きさを計測した。2 群の LNCaP Xenograft から miRNA を抽出し、miRCURY LNA miRNA array による網羅的発現解析を行い、*Fold Change* が 1.5 倍以上または 1/1.5 倍以下で *FDR* が 0.2 より小さい miRNA を抽出し、定量 RT-PCR で発現差を確認した。また、前立腺癌細胞株 LNCaP、PC-3、DU145 と正常ヒト前立腺上皮細胞株 PNT1B での候補 miRNA 発現差を比較した。HFD 群と CD 群マウス血清で培養した前立腺癌細胞株の腫瘍増殖、miRNA 発現をそれぞれ MTT 法、定量 RT-PCR で比較した。

オンラインソフトウェアの TargetScan や過去の報告から miR-130a の標的分子を抽出した。前立腺癌細胞株へ miR-130a precursor および inhibitor を導入し、MET 発現を Western blot 法、定量 RT-PCR で比較した。前立腺癌全摘標本からレーザーキャプチャマイクロダイゼクションで癌上皮と正常上皮を採取し miRNA の発現を比較した。さらに前立腺癌全摘標本 60 例で MET の免疫染色を行い、免疫染色強度と範囲をそれぞれスコアリングした。免疫染色スコア (強度×範囲) を算出し Body mass index (BMI) との関連を検討した。

研 究 成 績

14週間後のLNCaP Xenograftの腫瘍体積は、CD群に比べHFD群で有意に大きかった（HFD群： $2.57 \pm 0.22 \text{ cm}^3$ vs CD群： $1.58 \pm 0.20 \text{ cm}^3$ 、 $p = 0.003$ ）。miRNA array解析でHFD群に発現亢進している38個のoncogenic miRNAとHFD群で発現低下している21個のsuppressive miRNAを同定した。そのうち10個のmiRNA（miR-215、miR-494、miR1255a、miR-665、miR-3170、miR-27a、miR-130a、miR-24、miR222、miR-152）に関して、定量RT-PCRで発現差を確認した。

前立腺癌細胞株における発現解析では、miR-130a発現はLNCaP、PC-3、DU145のいずれにおいてもPINT1Bと比較し有意に低値であった（ $p = 0.002$ 、 $p = 0.008$ 、 $p = 0.008$ ）。HFDマウス血清で培養したPC-3、DU145はCDマウス血清で培養した細胞に比べ細胞増殖率が有意に高く（ $p = 0.002$ 、 $p = 0.041$ ）、miR-130aの発現が有意に低かった（ $p = 0.029$ 、 $p = 0.009$ ）。miR-130aの標的分子としてMET、DICER1、AR、MAPK、SOCS3を抽出した。LNCaP、PC-3、DU145にmiR-130a precursorを導入した結果、MET、DICER1、ARの発現が低下し、miR-130a inhibitorの導入でMETの発現増加を認めた。

前立腺全摘標本において癌上皮は正常上皮よりmiR-130aの発現が有意に低かった（ $p = 0.023$ ）。また、BMI ≥ 26 の群で有意にMET免疫染色スコアが高かった（ $p = 0.043$ ）。さらにMET免疫染色スコア高値群は低値群に比べ有意にBMIが高かった（ $p = 0.028$ ）。

結 論

高脂肪食は前立腺癌増殖に関与し、その増殖には癌細胞内での種々のmiRNA遺伝子発現の変化を伴うことが確認された。特にmiR-130aは高脂肪食摂取下で癌細胞内の発現が低下し、METを標的として前立腺癌の増殖に関与することが示された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：佐々木 雄彦

申請者：奈良 健平

論文題名：

Altered miRNA expression in high-fat diet-induced prostate cancer progression

(高脂肪食摂取下での前立腺癌進行に関与する miRNA の発現および機能解析)

要旨

申請者は、*xenograft* マウスモデルでの網羅的発現解析の手法によって、高脂肪摂取下の前立腺癌進行に関与する miRNA を同定し、当該 miRNA の機能解析および標的分子探索を前立腺癌の培養細胞株および臨床検体を用いて行った。microRNA array 解析の結果、高脂肪食（HFD）群で特に発現亢進している 38 個の *oncogenic* miRNA と HFD 群で発現低下している 21 個の *suppressive* miRNA を抽出した。それらの候補 miRNA のうち、高脂肪食摂取下の前立腺癌進行において miR-130a の発現が低下していることを見出し、また、臨床検体でも癌上皮で miR-130a が低下することを明らかにした。さらに肝細胞増殖因子受容体 MET が、miR-130a の標的遺伝子と発現調節を受けていることを明らかにした。特に興味深いのは、高脂肪食摂取マウス血清を細胞培養液に添加することで、細胞増殖の亢進と miR-130a 発現低下を、*in vitro* 系で再現することに成功している。本研究で、高脂肪食摂取下の前立腺癌進行に種々の miRNA が関与している可能性を見出し、特に miR-130a とその下流遺伝子 MET は高脂肪食摂取下の前立腺癌進行に重要な役割を果たすことを報告している。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

ある特定の食事により癌細胞内の miRNA が変化し、癌発症・進展に関連するとの

報告はあるが、高脂肪食が前立腺癌進行に関与する際に細胞内で変化する miRNA に関する研究の報告はない。また前立腺癌進行に癌細胞内での miR-130a 低下の関与が示唆されているが、食事による癌進行に miR-130a が関与することは知られておらず、斬新な研究であると考えられる。

2) 重要性

疫学的に高脂肪食は前立腺癌進行に関与すると考えられているが、その機序は明確になっていない。本研究により食事変化による前立腺癌進行に miRNA の関与がみいだされ、新たな癌進展分子生物学的機序の可能性が提示された。また、この知見は食事による癌進行の新規予防および癌の新規治療標的分子の提示につながり、今後の新たな癌治療や癌研究にも発展する可能性がある。

3) 実験方法の正確性

本研究は、LNCaP 細胞株の xenograft 実験系での microRNA array による網羅的発現解析で抽出した候補 miRNA の発現を、定量 RT-PCR で再検証し、さらに複数の前立腺細胞株や臨床検体を用いて候補 miRNA や関連遺伝子・タンパク質の発現を、多角的に検討している。データの解析にあたっては検討する内容に応じて適切な統計学的検討がなされており、研究結果の妥当性を担保するに十分な客観性、正確性を有していると判断される。

4) 表現の明瞭さ

高脂肪食摂取下での前立腺癌進行に関与する miRNA の発現および機能を明らかにするために、研究の意義を示す背景、目的、方法、実験結果および考察について明瞭に記載されている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判断された。