

学 位 論 文 要 旨

氏名 RAHMAN MD MAHFUZUR

題 目 : Whole Transcriptomic profile of canine oral melanoma and its human analogy
(犬メラノーマの全トランスクリプトーム解析と人病態の類似病態比較)

論文要旨 :

Genomic instability is a hallmark of cancer. Cancer does/results due to numerous genetic events. A few are drivers, but others accumulate as passive progression. Critical identification of specific cancer causative drivers should be more useful for the development of therapeutic strategies. A study with the model organism facilitates better understanding of the drivers. The term “spontaneous cancer model” revealed to be a better identifying and understanding the drivers. Dog’s oral melanoma considered as a spontaneous cancer model for human melanoma. However, melanoma transcriptome and its analogy between the two species has been entirely undetermined yet. Moreover, to be a useful therapeutic preclinical model knowing the melanoma transcriptome between humans and dogs is important.

In this study I represent the systematic analysis of the whole canine oral melanoma (COM) transcriptome including the non-coding and coding RNAs by next generation sequencing. I present my transcriptome study in three parts based on the RNA species. First microRNA (miRNA/miR)-a well studied non-coding RNA, second other non-coding RNAs (snoRNA, snRNAs, and tRNA fragments, and also the piRNAs) and finally the mRNA profile in COM. In each section I also compare their analogy with human melanoma.

In the miRNA section along with tumor suppressor, I report several oncogenic miRNAs in COM without previous implication. Gene regulatory function of three oncogenic miRNAs was confirmed in reference to human study. Furthermore, I found that miR-450b

(別紙様式第 3 号)

expression is higher in metastatic cells and regulated *MMP9* expression through a PAX9-BMP4-MMP9 axis. Thus I established a comprehensive miRNA study profile.

In the other non-coding RNAs section I find several non-coding RNAs like snoRNA, snRNAs, tRNA derived fragments and also piRNAs are aberrantly expressed in our next generation sequencing analysis. I confirmed their expression in the tissue, cell line and plasma by qPCR. I also found that snRNA and snoRNA have similar expression pattern in human melanoma cell line.

In my final mRNA transcriptome analysis several differentially expressed annotated and novel genes are identified. Known and novel transcription factors binding site for the up-regulated genes are reported. Moreover, it was found that canine oral melanoma shared >80% significant oncogenes (upregulated genes) with human melanoma, and JAK-STAT was the most common significant pathway between the species. Also my study demonstrates that as regards oncogene expression, human melanoma contains an oncogene group that bears similarities with dog oral melanoma. Finally, driver signature genes for melanoma development are listed by the cross species analysis.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	RAHMAN MD MAHFUZUR
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副査：鹿児島大学 教授 藤木 誠
	副査：鳥取大学 教授 岡本 芳晴
	副査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：鹿児島大学 准教授 高橋 雅
題目	Whole Transcriptomic profile of canine oral melanoma and its human analogy (犬メラノーマの全トランスクリプトーム解析と人病態の類似病態比較)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>犬の腫瘍は人の腫瘍と同様に大きな問題であり、国内外を問わず多くの研究が急速に進められている。近年では、次世代シーケンサの技術改革も伴い、より多くの遺伝子情報を利用した研究が急増している。特に腫瘍分野では、Coding RNA のみならず、non-coding RNA と呼ばれるたんぱく質に翻訳されない分子の重要性が明らかになっている。これらの広義の RNA 分子群が密接に関連することで疾患が発生し、また、そこに治療法が潜在していると考えることができる。また、人の腫瘍の研究では細胞株や遺伝子改変動物、さらにはヌードマウスに移植するような人工産物での研究が多い。一方で、獣医療機では日常的に犬の腫瘍疾患を診察するが、これらは自然発症したものである。犬の腫瘍の遺伝子やその発現形式の詳細なデータは人医療分野程多くはないことで、従来あまり比較されていない。しかしながら、RNA 分子の網羅的解析のデータを人の腫瘍疾患のデータと比較することで獣医領域にも人医療領域にも双方向に有用な情報が得られる。近年では Zoobiquity という学問分野まで生まれてきており、人を含む動物種を超えた研究が注目されている。本研究では、犬の腫瘍の中でメラノーマに着目して、次世代シーケンス解析であられた大量のデータを、non-coding small RNA (sncRNA) 分子群として、マイクロ RNA (第 1 章) とそれ以外の sncRNA (第 2 章)、さらに mRNA (第 3 章) のグループに分けて、解析した。さらに、各 RNA 分子群で人医療での報告と比較検討し、犬の腫瘍と人の腫瘍の類似性を確認した。</p> <p>本学位論文の研究は、以下の 3 章より構成される。</p> <p>【第 1 章】犬のメラノーマと非担癌犬の口腔内組織でのマイクロ RNA の発現変化を確認した。次世代シーケンスを利用して、網羅的に発現解析した。そのデータを利用して、人の従来の報告などと比較することで、3 つの癌関連マイクロ RNA とそのターゲット遺伝子を</p>	

同定した。同時に犬のメラノーマの細胞株を利用し、再現性があるかを評価した。さらに、一例として、マイクロ RNA-450b の発現とそのターゲットである PAX9 遺伝子の関連性を詳細に解析した。その結果、特に転移性のメラノーマでのマイクロ RNA450b の発現増加とそれに依存した PAX9 の発現低下、その下流の BMP4 遺伝子の発現低下から、最終的に MMP9 の発現が増強している可能性を示した。このマイクロ RNA450b に依存した MMP9 の発現変化が腫瘍の転移に関連する可能性を発見した。同時にこの変化は、犬にのみ認められるものではなく、人医療でも同様の可能性があるが、これまでに報告の無いシグナルであり、今後の病態解明と治療に関連するものである。

【第 2 章】犬のメラノーマと非担癌犬の口腔内組織でのマイクロ RNA 以外の ncsRNA (snoRNA、snRNA、tRNA、piRNA) フラグメントの発現変化を確認した。これらの研究は獣医領域では報告が無く、非常に新規性の高い研究である。第 1 章と同様に次世代シーケンスのデータを使用して解析である。複数の ncsRNA 分子で、腫瘍依存性の発現変化がみられることが判明した。これらの結果は、細胞株や血漿中での変化でも再現できた。複数の ncsRNA を同時解析した研究は、人医療を含めても非常に少ない。今回の結果は、犬のメラノーマ領域への貢献と同時に、人医療へも大きな貢献がなされるものと思われる。

【第 3 章】犬のメラノーマと非担癌犬の口腔内組織での遺伝子 (mRNA) の発現変化を確認した。第 1 章と第 2 章では次世代シーケンスの small RNA 分画を解析したが、第 3 章では、mRNA トランスクリプトーム解析 (通常の RNA-Seq) のデータを利用した。この結果、既知および新規の癌関連遺伝子の変化を確認できた。これら犬のメラノーマで変化する遺伝子の 88% は人のメラノーマでも同様な変化をすることが確認できた。さらに、人のメラノーマ、メラノーマ細胞株、人の前立腺癌のトランスクリプトーム解析と今回の犬のメラノーマのデータを比較したクラスター解析では、犬のメラノーマは人の細胞株よりも、ある種の人メラノーマと同じクラスターに分類された。これは、人工的な培養細胞 (人の腫瘍由来) よりも、動物種は異なれども、自然発生した犬のメラノーマの遺伝子発現は人のメラノーマに近似していることを証明する結果である。マイクロ RNA や ncsRNA の結果と合わせて評価する事で、グローバルな遺伝子発現と調節因子の解明に繋がるとと思われる。同様に犬のメラノーマは発現 RNA レベルで人の腫瘍と同様であり、Zoobiquity の観点からも分子解析でも有用であることが証明された。

これら一連の研究は、適正な手法で実験を行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を多数引用しながら適切に考察されていた。本研究の成果は獣医臨床領域と人医療領域の診断と病態解明に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位に十分に値すると判断された。