

学 位 論 文 要 旨

氏名 HUSNA AL ASMAUL

題 目 : Exosomal small RNAs as biomarker of canine oral melanoma
(犬口腔内メラノーマのバイオマーカーとしてのエクソソーム内スモール RNA)

論文要旨 :

Considering the importance of the canine cancer model of human disease, as well as the need for strategies for canine cancer management, the properties of exosomes are an emerging topic in canine oncology.

In my graduation study, exosomal RNA was isolated and investigated by next-generation sequencing. I identified several differentially expressed microRNAs (miRNAs/miRs) and novel small non-coding RNAs (sRNAs) rather than miRNAs in the exosomes of two melanoma cell lines (KMeC and LMeC) compared with non-tumor reference exosomes. Further I explored these potential melanoma-specific exosomal small RNAs.

In the first chapter, I focus on the miRNAs in the exosome of melanoma. Among the miRNAs, I found that miR-143 and let-7b increased in primary, whereas miR-210, 708, 221, and 222 increased in metastatic site originated melanoma cells. Further analysis showed miR-143 and 221 significantly increased in plasma exosomes of metastatic melanoma patients. Moreover, the sensitivity and specificity are >85% for differentiating the non-metastatic and metastatic patients. Therefore, these miRNAs can be an incredible biomarker candidate to identify metastatic melanoma and facilitate a better prognosis.

In the second chapter, I focus on the sRNA other than miRNAs in the exosome of melanoma. Among the novel sRNAs, long noncoding RNA fragments, tRNA-derived fragments, snoRNAs and snRNAs were abundantly expressed. I selected four novel sRNAs upregulated in each cell line, and validated their aberrant expression with qPCR. In

analysis using plasma-derived exosomes from melanoma patients, six out of the eight selected novel sRNAs showed significantly elevated expression. Receiver operating curve (ROC) analysis showed that one long non-coding RNA-derived small fragment (ENSCAFT00000069599.1) and one transfer RNA-derived small fragment (tRNA-Ala-TGC-5-1) have more than 85% sensitivity and specificity for differentiating melanoma patients from tumor-free dogs.

In conclusion, the significance of my study is to show the suitability of melanoma exosomal sRNAs (miRNAs and other novel sRNAs) as biomarker. I found plasma exosomal miRNAs and novel sRNAs are potential biomarker for detecting melanoma patients. Furthermore, miRNAs are also good candidates to differentiate the metastatic and non-metastatic melanoma patients. Therefore, I consider that exosomal miRNAs and novel sRNAs may serve as candidate biomarkers to facilitate more accurate diagnosis of canine oral melanoma in clinical settings. For sure, my study is a valuable resource for establishing a blood-based biomarker for canine melanoma.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	HUSNA AL ASMAUL
審査委員	主 査：鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副 査：山口大学 教授 水野 拓也
	副 査：鳥取大学 教授 岡本 芳晴
	副 査：鹿児島大学 教授 白石 光也
	副 査：鹿児島大学 准教授 高橋 雅
題 目	Exosomal small RNAs as biomarker of canine oral melanoma (犬口腔内メラノーマのバイオマーカーとしてのエクソソーム内スモール RNA)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>獣医領域でも人医領域でも腫瘍は大きな問題であり、国内外を問わず多くの研究が急速に進められている。犬の腫瘍は、多くの面で人の腫瘍に類似していることが知られており、新規腫瘍関連の診断治療の適切なモデルとも考えられる。しかし、すべてが同じというわけではなく、犬の特異的な現象を的確にとらえ、比較することが獣医療研究として重要である。</p> <p>近年では、細胞外小胞体の一つとしてエクソソームが、細胞間情報伝達の新しい方法で、且つ、すべての細胞が利用していることから、広くい注目されている。非常に多くの病態で、特異的な変化をすることも知られているが、特に腫瘍では、腫瘍の種別に依存した変化が生じている。エクソソームには、様々な分子が含有されるが、RNA 分子もその一つである。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られる。また、次世代シーケンスを利用することで、エクソソームのような小分子内の RNA 分子の発現も網羅的に行えるようになった。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。</p> <p>本研究では、犬の腫瘍の中でメラノーマに着目して研究を展開した。特に犬のメラノーマの細胞株の中から、原発巣由来細胞株 (KMeC) と転移巣由来細胞株 (LMeC) を利用し、それらの細胞株のエクソソームを抽出した。対象コントロールとして、非担癌犬の血漿中のエクソソームを利用した。エクソソーム内の RNA 分子を次世代シーケンス解析でスクリーニングし、標的となる non-coding RNA を選出した。特に non-coding RNA の中でマイクロ RNA (第 1 章) とマイクロ RNA 以外の small non-coding RNA (第 2 章) に分けて、解析した。</p>	

その後、実際の犬の臨床サンプルで、標的 non-coding RNA の発現変化が臨床でも再現できるかを確認した。

本学位論文の研究は、以下の 2 章より構成される。

【第一章】犬のメラノーマの細胞株 KMeC と LMeC と非担癌犬の血漿中のエクソソーム内と KMeC と LMeC 自体のマイクロ RNA の発現変化を比較した。その結果、マイクロ RNA-143 と 7b が原発巣由来エクソソームで上昇し、マイクロ RNA-210、708、221、222 が転移巣由来エクソソームで上昇していた。実際のメラノーマ症例で確認したら、マイクロ RNA-143 と 221 が転移が存在する犬で上昇していた。マイクロ RNA-143 はスクリーニングでは原発巣にて、上昇していたが、症例では転移が認められる症例で上昇する結果となったが、これは、症例では転移が認められる症例は同時に原発巣も大きい病巣であることが影響していると考えられた。これらのマイクロ RNA を利用した転移と非転移の鑑別は ROC 曲線で 85%以上の感度と特異度を示すことができ、今後の臨床応用が期待される。第一章の結果は、メラノーマ関連の国際医学誌である *Pigment cell & Melanoma Research* に掲載された。

【第二章】犬のメラノーマの細胞株 KMeC と LMeC と非担癌犬の血漿中のエクソソーム内のマイクロ RNA 以外の small non-coding RNA の発現変化を比較した。これらの small non-coding RNA には、snoRNA、snRNA、piRNA や long non-coding RNA や tRNA のフラグメントが含まれており、近年、新しいターゲットとして注目されている。その結果、long non-coding RNA や tRNA のフラグメント、snoRNA、snRNA が多く含まれていること、さらに腫瘍ではこれらの比率が上昇することが示された。研究ではこれらの small non-coding RNA からいくつかの候補を選択して、第一章と同様にリアルタイム PCR で確認後、臨床例でも確認した。選択した 8 候補の中で、6 候補が有意な変化を再現できた。特に long non-coding RNA や tRNA のフラグメントを利用して、担癌犬と非担癌犬の鑑別は ROC 曲線で 85%以上の感度と特異度を示すことができ、今後の臨床応用が期待される。第二章の結果は、比較腫瘍学の国際医学誌である *Veterinary Comparative Oncology* に掲載された。

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。