

学 位 論 文 要 旨

氏名 牛尾 宣夫

題 目 : Identification of dysregulated non-coding small RNA in canine tumor
(犬の腫瘍における発現異常ノンコーディングスモール RNA の同定)

論文要旨 :

In recent years, not only mRNA (messenger RNA) but also other small non-coding RNA have focused on molecular diagnosis and therapy in oncology fields. Especially in human medicine, many studies elucidate the ability and function of many microRNAs, which are small non-coding RNAs. However, there are still not many studies in the veterinary field. In my PhD study, I focused on the non-coding small RNA in canine oncology fields.

In the first chapter, I studied the dysregulated micro RNA in canine oral melanoma. At first, I performed the microarray-based miRNA profiling of canine malignant melanoma (CMM) tissue obtained from the oral cavity. Then, I also confirmed the differentially expressed microRNA by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). An analysis of the microarray data revealed 17 dysregulated miRNAs; 5 were up-regulated, and 12 were down-regulated. qRT-PCR analysis was performed for 2 up-regulated (miR-204 and miR-383), 3 down-regulated (miR-122, miR-143, and miR-205) and 6 additional oncogenic miRNAs (oncomiRs; miR-16, miR-21, miR-29b, miR-92a, miR-125b and miR-222). The expression levels of seven of the miRNAs, miR-16, miR-21, miR-29b, miR-122, miR-125b, miR-204, and miR-383 were significantly up-regulated, while the expression of miR-205 was down-regulated in CMM tissues compared with normal oral tissues. The microarray and qRT-PCR analyses validated the up-regulation of two potential oncomiRs, miR-204 and miR-383. I also constructed a protein interaction network and a miRNA–target regulatory interaction network using STRING and Cytoscape. In the proposed network, *CDK2* was a target for miR-383, *SIRT1* and *TP53* were targets for miR-204, and *ATR* was a target for both. The miR-383 and miR-204 were potential oncomiRs that may be involved in regulating melanoma development by evading DNA repair and apoptosis.

In my second chapter, I focused on non-coding RNA other than microRNA, and I compared canine hepatocellular carcinomas (HCC) and hepatocellular adenomas (HCA). I elucidated the differential expression of Y RNA-derived fragments because Y RNA-derived fragments have yet to be investigated in canine HCC and HCA. I used qRT-PCR to determine Y RNA expression in clinical tissues, plasma, and plasma extracellular vesicles, and two HCC cell lines (95-1044 and AZACH). Y RNA was significantly decreased in tissue, plasma, and plasma extracellular vesicles for canine HCC versus canine HCA and healthy controls. Y RNA was decreased in 95-1044 and AZACH cells versus normal liver tissue and in AZACH versus 95-1044 cells. In plasma samples, Y RNA levels were decreased in HCC versus HCA and Healthy controls and increased in HCA versus Healthy controls. Receiver operating characteristic analysis showed that Y RNA could be a promising biomarker for distinguishing HCC from HCA and healthy controls. Overall, the dysregulated expression of Y RNA can distinguish canine HCC from HCA. However, further research is necessary to elucidate the underlying Y RNA-related molecular mechanisms in hepatocellular neoplastic diseases. To the best of my knowledge, this is the first report on the relative expression of Y RNA in canine HCC and HCA.

In conclusion, I have demonstrated the up-regulation of potential oncomiRs, miR-16, miR-21, miR-29b, miR-122, miR-125b, miR-204 and miR-383 in CMM tissues. In particular, the strong up-regulation of miR-383 in CMM tissues compared with normal oral tissues identified by microarray screening was confirmed by qRT-PCR. I conclude that miR-383 and miR-204 may promote melanoma development by regulating the DNA repair/checkpoint and apoptosis. Then, I also demonstrated the Y RNA dysregulation in the cHCC. Especially to my knowledge, this is the first report on Y RNA in canine tumors. Interestingly, this ncRNA has distinctive characteristics and differentiates malignant tumors (HCC) from benign tumors (HCA). The expression pattern of Y RNA is consistent across clinical samples and cell lines. Thus, Y RNA has promising potential for differentiating HCC from HCA. Further research is required to fully elucidate the role of Y RNA in the development and progression of canine HCC and HCA.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	牛尾 宣夫
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 大和 修
	副査：山口大学 教授 高木 光博
	副査：鹿児島大学 准教授 安藤 貴朗
	副査：鹿児島大学 准教授 高橋 雅
題目	Identification of dysregulated non-coding small RNA in canine tumor (犬の腫瘍における発現異常ノンコーディングスモール RNA の同定)
<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。近年、mRNA (メッセンジャーRNA) だけでなく、その他の small non-coding RNA も、がん領域における分子診断や分子治療に注目されている。特に人医療においては、スモールノンコーディング RNA であるマイクロ RNA の機能が多くの研究によって解明されている。しかし、獣医学分野での研究はまだ、十分な研究が進められているとは言いがたい状況である。私の博士課程での研究では、犬のがん領域におけるスモールノンコーディング RNA に焦点を充てて研究を実施した。</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サンプルからマイクロアレイ法により、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 の以上発現に着目した (第 1 章)。次に、犬の肝細胞癌に着目し、次世代シーケンス解析で、とマイクロ RNA 以外の small non-coding RNA の選出を行った (第 2 章)。</p> <p>本学位論文の研究は、以下の 2 章より構成される。</p> <p>【第一章】犬の口腔内メラノーマにおける異常発現マイクロ RNA について研究した。まず、口腔から採取した犬のメラノーマ (CMM) 組織について、マイクロアレイを用いた犬マイクロ RNA プロファイリングを行った。次に、リアルタイム PCR (qPCR) により発現の異なるマイクロ RNA の発現変化を再確認した。マイクロアレイデータの解析の結果、17 個の異常発現マイクロ RNA を選出した。qPCR 解析では、2 つの発現上昇マイクロ RNA (miR-204、miR-383) と 3 つの発現低下マイクロ RNA (miR-122、miR-143、miR-205)</p>	

を解析した。さらに、6 つの既存の癌関連マイクロ RNA (OncomiR ; miR-16、miR-21、miR-29b、miR-92a、miR-125b、miR-222) について同様に解析した。CMM 組織では、正常口腔組織と比較して、miR-16、miR-21、miR-29b、miR-122、miR-125b、miR-204、miR-383 の 7 つの miRNA の発現レベルが有意に上昇し、miR-205 の発現レベルは低下していた。マイクロアレイ解析と qRT-PCR 解析により、2 つの OncomiR の可能性のある miR-204 と miR-383 の発現上昇が確認された。また、データベースである STRING と Cytoscape を用いて、タンパク質相互作用ネットワークとマイクロ RNA-標的遺伝子制御相互作用ネットワークを解析した。ソフトから抽出したネットワークでは、CDK2 は miR-383 の標的であり、SIRT1 と TP53 は miR-204 の標的であり、ATR は両方の標的であった。miR-383 と miR-204 は、DNA 修復とアポトーシスを回避することによってメラノーマの発生を制御する可能性のある OncomiR であることが考えられた。

【第二章】本章では、マイクロ RNA 以外のノンコーディング RNA に注目し、犬の肝細胞癌 (HCC) と肝細胞腫 (HCA) を比較した。犬の HCC と HCA では、YRNA の発現は、これまでに報告がないものであり、YRNA 発現の違いを明らかにすることを目的とした。研究では qPCR を用いて、臨床組織、血漿、血漿細胞外小胞、および 2 つの HCC 細胞株 (95-1044 と AZACH) における YRNA 発現を測定した。犬 HCC の組織、血漿、血漿細胞外小胞における YRNA 発現は、犬 HCA および健常対照に対して有意に減少していた。YRNA は 95-1044 と AZACH 細胞で正常肝組織より発現低下した。血漿サンプルでは、YRNA 発現は HCC では HCA および健常対照に対して減少し、HCA では健常対照に対して増加した。Receiver Operating Characteristic 解析により、YRNA は HCC と HCA および健常対照を区別する有望なバイオマーカーであることが示された。結果として、Y RNA の発現異常は犬の HCC を HCA から区別できる可能性が示された。この研究は、犬の HCC と HCA における Y RNA の相対的発現に関する最初の報告である。しかし、肝細胞腫瘍性疾患における YRNA 関連分子メカニズムの根底にあるものを解明するためには、さらなる研究が必要である。

結論として、CMM 組織において、OncomiR である miR-16、miR-21、miR-29b、miR-122、miR-125b、miR-204、miR-383 の発現上昇が確認された。特に、マイクロアレイスクリーニングで同定された CMM 組織における miR-383 の正常口腔組織と比較した強い発現上昇は、qPCR でも確認された。第一章では、miR-383 と miR-204 は、DNA 修復・チェックポイントとアポトーシスを制御することにより、メラノーマの発生を促進する可能性がある」と結論した。次に、私は犬 HCC における YRNA の発現異常も確認した。この研究は犬の腫瘍における YRNA に関する最初の報告である。さらに、この YRNA は、悪性腫瘍 (HCC) と良性腫瘍 (HCA) を区別する可能性が示された。

これら一連の研究は、適正な手法で実験が行われており、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。