

令和 3年 2月

# 小山茂美 学位論文審査要旨

主 査 磯 本 一  
副主査 岡 田 太  
同 汐 田 剛 史

## 主論文

NEAT1 is required for the expression of the liver cancer stem cell marker CD44  
(NEAT1は肝癌幹細胞マーカーCD44の発現に必要である)

(著者：小山茂美、土谷博之、網崎正孝、坂口弘美、本城総一郎、藤原義之、  
汐田剛史)

令和2年 International Journal of Molecular Sciences 21巻  
DOI : 10.3390/ijms21061927

## 参考論文

CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a  
hepatocellular carcinoma cell line

(CD44の標準アイソフォームは肝細胞癌細胞株において癌幹細胞の維持に関与する)

(著者：朝井良磨、土谷博之、網崎正孝、榎本一輝、竹永亜衣、坂部友彦、  
寶意翔太郎、小山茂美、汐田剛史)

令和元年 Cancer Medicine 8巻 773頁～782頁

# 学 位 論 文 要 旨

NEAT1 is required for the expression of the liver cancer stem cell marker CD44  
(NEAT1は肝癌幹細胞マーカーCD44の発現に必要である)

原発性肝癌は世界的に癌関連死の主要な原因の一つである。原発性肝癌のうち最も発症頻度が高い肝細胞癌 (HCC) は依然として高い再発率を示しており、より効果的な治療法の開発が望まれる。癌幹細胞 (CSC) は、発癌、抗癌剤・放射線治療抵抗性、転移、再発に関与しており、新たな治療標的としての重要性が指摘されている。HCCにおいて、CD44を含む幾つかのCSCマーカーの発現と患者予後に関連があることが報告されており、CSCがHCCの病態に重要な役割を持つことが示唆されている。しかし、HCCのCSC (HCC-CSC) が制御される機序は完全には解明されていない。長鎖非コードRNA (lncRNA) であるNEAT1は、核内微小構造物であるパラスペックルの形成に必要なlncRNAであり、癌細胞の悪性化に関与していると報告されている。NEAT1には、NEAT1v1とNEAT1v2という2つのバリエーションが存在し、これらのバリエーションがHCC-CSCにおいてどのような機能を持つか不明である。本研究では、ヒトHCC細胞株におけるNEAT1の機能について検討した。

## 方 法

HuH7およびHepG2の2種類のヒトHCC細胞株から、マウスNeat1v1あるいはNeat1v2を過剰発現させた細胞を作製した。また、CRISPR/Cas9システムによりNEAT1遺伝子ノックアウト (NEAT1-KO) 細胞株を作製した。さらに、HuH7細胞由来のNEAT1-KO細胞にヒトNEAT1v1を過剰発現させたレスキュー細胞株を作製した。CSCの機能は、スフェロイド形成能とCD44発現および薬剤抵抗性により評価した。また、臨床検体を用い、HCCにおける遺伝子発現を定量的RT-PCRにより測定し、予後との関連について検討した。

## 結 果

各種HCC細胞株について、足場非依存性増殖能を持つ細胞のみが増殖可能なスフェロイド培養を行ったところ、CD44およびその他のCSCマーカーの遺伝子発現が、平面培養細胞と比べ、顕著に増加していた。このことからHCC細胞株中のCSCポピュレーションが、スフェロイド培養により増加したことが示された。このときスフェロイドにおけるNEAT1v1およびNEAT1v2の発現も有意に増加していた。mNeat1v1およびmNeat1v2の過剰発現はHCC細胞株の

薬剤抵抗性を上昇させたが、スフェロイド形成能は、mNeat1v1によってのみ有意に上昇した。このときCD44発現もmNeat1v1によって上昇していた。一方、NEAT1-KO細胞では薬剤感受性が亢進し、スフェロイド形成能が有意に低下していた。さらにNEAT1遺伝子欠損により、CD44発現が顕著に低下することが示された。これらの表現型はヒトNEAT1v1の過剰発現によりレスキューされた。また臨床検体を使った検討では、HCCにおけるtotal NEAT1の発現はCD44と有意に相関したが、NEAT1v2の発現は相関しないことが示された。そこでCD44遺伝子を欠損したHCC細胞株にヒトNEAT1v1を過剰発現させたところ、薬剤抵抗性およびスフェロイド形成能が有意に上昇した。

## 考 察

NEAT1バリエーションのうち、NEAT1v1はHCC-CSCの誘導と維持に関与していることが示された。またHCC細胞株や臨床検体における発現解析から、NEAT1v1はCD44の発現誘導に必要であることが示された。しかし、CD44遺伝子欠損によりCSC機能が低下したHCC細胞株にNEAT1v1を過剰発現させたところ、CSCの機能が回復したことから、NEAT1v1はCD44非依存的なCSC制御メカニズムを持つことが示唆された。

## 結 論

NEAT1v1は、HCC-CSCのマーカーであるCD44の発現に重要なlncRNAであることが示された。また、NEAT1v1は、CD44非依存的なHCC-CSC制御メカニズムを有していることが示唆された。今後、NEAT1v1によるHCC-CSC制御メカニズムの解明が、新たなHCC治療の標的分子の発見に繋がる可能性がある。