

氏名	小森 誠		
学位の種類	博 士 ( 生物学 )		
学位記番号	博 乙 第 2939 号		
学位授与年月日	令和元年10月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on a Method to Measure MicroRNA as a Diagnostic Marker (マイクロRNAの診断マーカーに関する測定法の研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	谷本 啓司
副査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	木村 圭志
副査	筑波大学講師	博士 (学術)	大徳 浩照

## 論 文 の 要 旨

審査対象論文は、新規な等温核酸増幅法を全自動免疫測定装置に適用することによるマイクロRNA (miRNA) 測定系の開発と、その測定系の性能評価を記述したものである。著者は、第一章では序論として、miRNA 研究の歴史、学位論文のテーマを設定した経緯、miRNA のがん診断マーカーとしての特徴、現行及び開発中の miRNA 測定法、現行及び開発中の等温核酸増幅法、本測定系で使用した酵素の特徴、本研究の評価項目、本研究中に申請した特許について述べている。

第二章では、miRNA の現行の測定法は時間のかかる前処理や専用機器が必要である等、解決すべき課題点があり、これらを改善するために、著者が共同研究者として開発した等温核酸増幅法を改変することで、miRNA を増幅し、全自動免疫測定装置中で増幅して測定する系を世界で初めて開発したことを述べている。著者は、体外診断薬の性能評価を実施し、本測定系が高感度、高精度、高特異性を有することを確認している。具体的には、3種類の癌関連 miRNA (miR-21-5p, miR-18a-5p, miR-500a-3p) の測定法を作製し、検出感度 10~100 fM の測定が可能であることを示している。また、miR-21-5p 測定法では miR-21-5p と 8~14 塩基の同一塩基配列を有する 15 種類の miRNA を用いて交差反応性試験を行い、良好な特異性を示している。次に検出感度を高めるために 2 段階シグナル DNA 増幅法を用いて miR-21-5p 測定法を作製したところ、検出感度は 3 fM であり、高感度化を達成したことを確認している。臨床研究の既報ではヒト血液中の miR-21-5p のカットオフ濃度が約 50 fM であることから、十分な検出感度を示している。本測定系は変動係数 8%未満の高精度であり、*in vitro* でヒト血清に添加した非天然合成 miD-21-5p を測定できることを明らかにしている。最後に、2 段階シグナル DNA 増幅法を用いて miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c) の 3 つの測定法を作製し、これらに miR-141, miR-429 を加えた、天然に存在する native な 5 種類の miRNA に対する交差反応性試験を行い、良好な特異性を示したことを確認している。

第三章では、結論としてこれまでの研究の総括を行うと共に、miRNAの診断マーカーの論文が数多くあるにもかかわらず、臨床検査室に導入されたmiRNA測定法がほとんどない現状を考察している。さらに著者は、種々の既報のmiRNA測定に関する臨床結果が異なる理由として、患者集団、測定法、分析前の条件が十分に考慮されていないことを指摘し、分析前の条件及びmiRNAの補正方法を標準化することが正確なmiRNA測定に重要であることを述べている。

## 審 査 の 要 旨

miRNA は、細胞の分化・増殖等の調節プロセスで重要な機能を持つと共に、癌を含む疾患で異常発現が確認されており、疾患の診断・治療の分野で活発に研究されている。本審査対象論文では、世界で初めて等温核酸増幅法を全自動免疫測定装置に導入して miRNA 測定系を開発し、測定系の性能評価を実施している。著者の研究から、臨床現場で miRNA を検査する上で障害となっている煩雑な前処理や専用機器の利用など、miRNA の測定法を改良して克服されることが期待される。全自動免疫測定装置は既に臨床検査室に癌を含む疾患の診断マーカー測定用に広く導入されているため、本 miRNA 測定系が実用化されれば miRNA 測定は臨床検査室で実施され易くなる。miRNA 検査の普及を容易にする可能性を示した点で、本審査対象論文は大きな意義があると考えられる。

著者が今後の展望として述べているように、分析前の条件及び miRNA の補正方法の標準化が miRNA 測定に重要である。著者が開発した miRNA 測定系は、全自動免疫測定装置で簡便に高い処理能力で行われるため、これらの標準化の検討に寄与することが期待される。本審査対象論文では、緩衝液中の合成 miRNA やヒト血清に添加した合成 miD-21-5p を高感度、高精度、高特異性で測定できることを確認しているが、ヒト血清中のエクソソームに内包されている、あるいは Ago2 などの RNA 結合タンパク質と結合している native miRNA の測定は実施していない。著者が開発した測定系が臨床現場で利用可能かどうかの検証は、今後の課題として残されている。

一般的に免疫測定系は、タンパク質や薬物を測定するために抗原抗体反応を測定原理として用いている。本審査対象論文において、miRNA という短鎖核酸を測定するために DNA テンプレートと 2 つの酵素によってシグナル DNA を増幅し、ハイブリダイゼーション反応で検出するという新しい測定系を開発したことは評価できる。

令和元年9月4日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。