

論 文 内 容 要 旨

題目 MicroRNA-296-5p Promotes Cell Invasion and Drug Resistance by Targeting Bcl2-Related Ovarian Killer, Leading to a Poor Prognosis in Pancreatic Cancer

(マイクロ RNA296-5p は Bcl2-Related Ovarian Killer 遺伝子を介して細胞浸潤と薬剤耐性を促進し、膵癌の不良予後に寄与する)

著者 Jun Okazaki, Toshihito Tanahashi, Yasushi Sato, Jinsei Miyoshi, Tadahiko Nakagawa, Tetsuo Kimura, Hiroshi Miyamoto, Yasuteru Fujino, Fumika Nakamura, Masanori Takehara, Beibei Ma, Masahiro Bando, Shinji Kitamura, Koichi Okamoto, Naoki Muguruma, Masahiro Sogabe, Tetsuji Takayama.  
令和元年 Digestion に掲載予定

内容要旨

膵癌は比較的早期に転移・浸潤をきたし、抗癌剤に抵抗性を示す予後不良な癌である。現在、膵癌に対して超音波内視鏡(EUS)及び EUS 下穿刺吸引細胞診(EUS-FNA)を用いた診断が広く行われているが、診断時には既に切除不能な膵癌であるものが大部分である。さらに、切除不能膵癌に対する抗癌剤治療に際して、予後を判定する適切なバイオマーカーは未だ存在しない。一方、マイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子の発現を調節し、癌の細胞増殖、浸潤・転移、薬剤耐性などに関与する低分子機能性 RNA である。膵癌の外科的切除標本における miRNA 発現を調べた研究は報告されているが、切除不能進行膵癌を対象に miRNA を網羅的に解析した研究は報告されていない。

そこで本研究では、まず切除不能進行膵癌患者を対象に EUS-FNA により癌組織を採取し、miRNA 発現を網羅的に解析するとともに、生存期間と関連する miRNA を抽出した。次いで、miRNA の標的遺伝子を検索し、細胞増殖、転移・浸潤、薬剤耐性及び上皮間葉転換(EMT)との関連を明らかにした。対象は EUS-FNA により切除不能進行膵癌と診断された 13 症例であり、男/女 6/7、平均年齢 66 歳。いずれも S-1 や gemcitabine を含む化学療法を施行(PR/SD 11 例、PD 2 例)、生存期間は 4~22 ヶ月であった。miRNA アレイを用いて、得られた膵癌組織における 2042 個の miRNA 発現を網羅的に解析し、生存期間と逆相関する miRNA を調べたところ、5 種類 (miR-296-5p、miR-516a-5p、miR-557、miR-1207-5p、

## 様式(8)

miR-4740-5p) の miRNA を同定した ( $p < 0.05$ )。このうち、miR-296-5p と miR-1207-5p の発現は、 Kaplan-Meier 法により生存率と有意に逆相関した ( $p < 0.05$ )。さらに、miR-296-5p を膵癌細胞株に遺伝子導入し、miRDB により抽出した標的候補遺伝子の発現を RT-PCR や Western blot で調べたところ、Bcl2-related ovarian killer (BOK) の発現が有意に低下した。そこで、miR-296-5p を遺伝子導入した膵癌細胞株を用いて転移・浸潤能を検討したところ、対照群に比べて有意な亢進を認めた。miR-296-5p 導入膵癌細胞における BOK 発現を siRNA でノックダウンしたところ、転移・浸潤能は有意に抑制された。また、miR-296-5p 導入膵癌細胞における EMT 関連蛋白質の発現を Western blot で調べたところ、E-cadherin 発現の低下、N-cadherin 及び vimentin 発現の亢進を認め、EMT を起こしていることが示唆された。さらに、miR-296-5p 導入膵癌細胞に 5-FU や gemcitabine を添加し、cleaved caspase-9 発現を Western blot により調べたところ、いずれもその発現は抑制された。つまり、miR-296-5p 導入により、膵癌細胞は EMT を来してアポトーシス抵抗性を獲得することが示唆された。

以上の結果より、miR-296-5p が過剰発現する膵癌では、高い転移・浸潤能を有し、EMT を起こして抗癌剤抵抗性となり、生存期間が短く予後不良であることが示された。今後、miR-296-5p の発現測定は、新たな診断マーカーとして切除不能進行膵癌の予後予測に役立つことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1433</b> 号	氏名	岡崎 潤
審査委員	主査 島田 光生 副査 片桐 豊雅 副査 常山 幸一		

題目 MicroRNA-296-5p Promotes Cell Invasion and Drug Resistance by Targeting Bcl2-Related Ovarian Killer, Leading to a Poor Prognosis in Pancreatic Cancer

(マイクロ RNA296-5p は Bcl2-Related Ovarian Killer 遺伝子を介して細胞浸潤と薬剤耐性を促進し、膵癌の不良予後に寄与する)

著者 Jun Okazaki, Toshihito Tanahashi, Yasushi Sato, Jinsei Miyoshi, Tadahiko Nakagawa, Tetsuo Kimura, Hiroshi Miyamoto, Yasuteru Fujino, Fumika Nakamura, Masanori Takehara, Beibei Ma, Masahiro Bando, Shinji Kitamura, Koichi Okamoto, Naoki Muguruma, Masahiro Sogabe, Tetsuji Takayama.

令和元年 Digestion に掲載予定

(主任教授 高山 哲治)

要旨 膵癌は早期に転移・浸潤をきたし、抗癌剤に抵抗性を示す予後不良な癌であり、大部分が切除不能膵癌として診断され、切除不能膵癌に対する抗癌剤治療の予後予測マーカーは存在しない。膵癌の外科的切除標本におけるマイクロ RNA (miRNA) 発現を調べた研究は報告されているが、切除不能進行膵癌を対象に miRNA を網羅的に解析した研究は報告されていない。

申請者らは、切除不能進行膵癌患者 13 症例を対象に超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診時に採取した癌組織を用い、miRNA 発現を網羅的に解析するとともに、生存期間と関連する miRNA を抽出した。次いで、miRNA の標的遺伝子を検索し、細胞増殖、転移・浸潤、薬剤耐性及び上皮間葉転換との関連を明らかにした。

得られた結果は以下の通りである。

様式(11)

1. マイクロアレイにて 2042 個の miRNA 発現を網羅的に解析し、生存期間と負に相関する miR-296-5p、miR-516a-5p、miR-557、miR-1207-5p、miR-4740-5p が抽出された。
2. 5 種類の膵癌細胞株において、5 つの miRNA のうち miR-296-5p と miR-1207-5p の 2 つが高頻度に発現していた。
3. miRDB (an online database for prediction of functional microRNA targets) を用いて、miR-296-5p の標的遺伝子として Bcl2-related ovarian killer (BOK) 及び NUMBL 遺伝子を、miR1207-5p の標的遺伝子として CD276 及び ATP11A 遺伝子を抽出した。
4. 膵癌細胞株に miR-296-5p または miR1207-5p を導入して強制発現させたところ、miR-296-5p の導入により BOK 遺伝子の発現が有意に抑制された。
5. miR-296-5p の導入細胞では、上皮間葉転換マーカーの発現、細胞浸潤能の亢進及び 5-FU やゲムシタビンに対するアポトーシス抵抗性の亢進を認めた。また、BOK 遺伝子をノックダウンすると細胞浸潤能が有意に亢進した。

以上より、miR-296-5p は、切除不能進行膵癌の新たな予後予測マーカーとして有用な可能性があるとともに治療標的となりうることが示唆された。本研究は、今後の膵癌の診断及び治療の発展に大きく寄与するものであり、学位授与に値すると判定した。