

論 文 要 旨

**Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma:
impact of *miR-30c-5p* and *miR-30c-2-3p* regulation
on oncogenic genes**

膵癌の分子病因：発癌性遺伝子に対する
miR-30c-5p と *miR-30c-2-3p* の影響

田中 貴子

【序論及び目的】

膵癌 (pancreatic ductal carcinoma: PDAC) は膵腫瘍のおよそ 9 割を占め、最も悪性度の高い癌腫の一つである。膵癌の全病期における 5 年生存率は約 9% と低く、この 10 年間で膵癌による死亡数はさらに上昇している。膵癌の治療として外科的切除が第一選択肢となるが、根治切除が望める患者は全体の 20% 以下である。根治切除が望めない患者に対してはゲムシタビンなどの抗癌剤治療の適応となるが、効果は限定的であり、殆どの患者は 1 年以内に死亡する。膵癌の特徴として癌細胞の悪性度が高いことに加え、自覚症状に乏しく、診断時にすでに手術適応外となる症例が殆どであることが挙げられる。有効な治療法の開発と早期診断の開発は、膵癌の予後改善に不可欠な課題である。

マイクロ RNA (miR) は、19-22 塩基の低分子 RNA であり、その特徴は 1 種類の miR が細胞内で極めて多くのタンパク発現をコントロールしていることである。最近の研究から、miR の発現異常が、癌の腫瘍増殖・転移・薬剤耐性に深く関与していることが明らかとなった。我々はこれまで RNA シークエンスにより膵癌・miR 発現プロファイルを作成し、膵癌における癌抑制型 miR を明らかにしてきた。さらに癌抑制型 miR を起点とした膵癌の新規分子ネットワークの解明を継続している。

膵癌・miR 発現プロファイルでは miR-30 ファミリー (miR-30a-5p, miR-30a-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p, miR-30c-2-3p) が癌組織において発現が低下していた。本研究では miR-30c-5p (guide strand) および miR-30c-2-3p (passenger strand) に着目し、以下の項目を目的とした。① miR-30c-5p および miR-30c-2-3p の癌抑制機能を明らかにする。② miR-30c-5p および miR-30c-2-3p の標的分子を明らかにする。③ miR-30c-5p および miR-30c-2-3p の標的分子の中から、膵癌の分子病理に関与する遺伝子を明らかにする。

【材料及び方法】

当教室の手術で得られた膵癌組織 27 例と非癌部組織 16 例から RNA を抽出し、定量 PCR (q-PCR) 法により miR-30c-5p と miR-30c-2-3p の発現を測定した。膵癌細胞株には SW1990 と PANC-1 を用い、機能解析には miR および siRNAs を用いて核酸導入を行い、細胞増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。miR の標的遺伝子の探索は、マイクロアレイ発現解析と公共のデータベース (TargetScanHuman, Gene Expression Omnibus (GEO) database, The Cancer Genome Atlas (TCGA)) を利用し、ゲノム科学的手法で

解析した。標的分子の抑制効果は、miR-30c-5p および miR-30c-2-3p を核酸導入した膵癌細胞株から RNA および蛋白を抽出し、q-PCR およびウェスタンブロットで確認した。またルシフェラーゼアッセイにより miR-30c-2-3p との直接の結合を評価した。標的タンパク分子の臨床検体における発現は免疫組織化学染色により評価した。

【結果】

- ① miR-30c-5p と miR-30c-2-3p を膵癌細胞株に核酸導入することで、癌細胞の浸潤能および遊走能が抑制された。
- ② miR-30c-5p と miR-30c-2-3p が制御する癌促進型タンパク分子を探索した結果、18 のタンパクを選択できた。さらに多変量解析の結果から、10 のタンパク (YWHAZ、F3、TMOD3、NFE2L3、DNDOD1、ITGA3、RRAS、PRSS23、TOP2A、LRRFIP1) が予後予測因子であることを明らかにした。
- ③ TOP2A は miR-30c-2-3p により発現が制御されていることを確認した。
- ④ TOP2A を siRNAs によってノックダウンすることにより、膵癌細胞の増殖能、浸潤能および遊走能を抑制することを明らかにした。
- ⑤ TOP2A をノックダウンすることにより、シスプラチンの感受性が増加することを認めた。
- ⑥ TOP2A の転写促進因子として、8 つの分子 (HDAC1、HDAC2、HMGB1、HMGB2、NFYA、NFYB、NFYC、SP1) を候補として同定し、2 つの転写因子が (HMGB2、SP1) が膵癌の分子病理に関与していることを明らかにした。

【結論及び考察】

膵癌・miR 発現プロファイルから、miR-30c-5p (guide strand) および miR-30c-2-3p (passenger strand) に着目し、これら miR の機能解析からこの 2 種類の miR が癌抑制型 miR であることを明らかにした。miR-30c-2-3p が制御する癌促進型分子として TOP2A を見出した。TOP2A の高発現は、膵癌の悪性化および薬剤耐性機構に深く関与しており、本疾患の治療標的分子である可能性があることを明らかにした。miR を起点とした解析を継続することにより膵癌の分子病理に関与する新知見が得られると考える。