

論 文 要 旨

Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma: impact of passenger strand of pre-*miR-148a* on gene regulation

膵管腺癌における分子病態：Pre-*miR-148a* のパッセンジャー鎖が遺伝子調節に及ぼす影響。

伊地知 徹也

【序論及び目的】

膵癌は最も予後不良な悪性腫瘍である。局所浸潤や遠隔転移のため治癒切除できる症例は、未だに少なく、近年行われている集学的治療は限局的な効果しかみられていない。膵癌の分子病態の解明は新規治療法に繋がることが期待される。マイクロ RNA は蛋白コード遺伝子、非蛋白コード遺伝子を調整し、癌の分子ネットワークに関わることが証明されてきた。申請者らは膵癌マイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、膵癌抑制型とされるマイクロ RNA を報告してきた。その中にはマイクロ RNA の生合成の過程で消褪し、非機能性とされることから、未だ研究が進んでいないパッセンジャー鎖が含まれていた。申請者らのグループはこれまでの研究で、パッセンジャー鎖である *miR-145-3p* が、他癌腫において癌抑制型マイクロ RNA として癌遺伝子の調節を行っていることを報告してきた。今回、申請者らのプロファイルリストの中に、*miR-148a-5p*(パッセンジャー鎖)、*miR-148a-3p*(ガイド鎖)の両鎖が膵癌抑制型マイクロ RNA の候補として含まれており、それぞれの膵癌における機能を証明し、さらにこれまで報告のない *miR-148a-5p*(パッセンジャー)が膵癌分子病態にもたらす影響を解明した。

【材料及び方法】

当教室で根治手術を行った膵癌患者より膵癌組織 30 例、及び非膵癌組織 18 例を用いて、マイクロ RNA 発現、mRNA 発現を PCR で評価した。In vitro の実験には PANC-1、SW1990 の膵癌細胞株を用いた。細胞株にはリポフェクタミン法を用いて *miR-148a-5p*、*miR-148a-3p* の mimic を核酸導入し、機能解析を施行した。*miR-148a-5p* の標的遺伝子である *PHLDA2* に対しては siRNA を用いた Loss-of-function および、cDNA クローンを用いた、Gain-of-function でのレスキュー実験を施行した。機能解析は増殖能、浸潤能、遊走能、アポトーシスの項目を評価した。*miR-148a-5p* の標的遺伝子探索や *PHLDA2* 遺伝子の下流遺伝子探索には、マイクロアレイ解析及び GEO データベース、TCGA データベースを用いた。蛋白レベルでの解析には Western blot 法を用い、組織での表現型確認には免疫染色を行った。

【結 果】

①当院臨床検体を用いて PCR を施行したところ、*miR-148a-5p*、*miR-148a-3p* は癌部で発現が抑制されていた。膵癌細胞株に *miR-148a-5p*、*miR-148a-3p* を核酸導入したところ、膵癌細胞株の増殖能・浸潤能・遊走能は抑制され、アポトーシス細胞が増加した。*miR-148a-5p*、*miR-148a-3p* は両鎖とも膵癌抑

制型マイクロ RNA であることが示唆された。

②膵癌細胞株に *miR-148a-5p*、*miR-148a-3p* を核酸導入し得られた RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。GEO データベースより膵癌遺伝子候補を絞り込み、*miR-148a-5p*、*miR-148a-3p* によって発現変化を来した遺伝子と組み合わせることで、それぞれのマイクロ RNA が直接制御する遺伝子群を見出した。標的候補遺伝子は TCGA データベースで膵癌での予後不良遺伝子であることが示され、当院の臨床検体でも癌部で高発現であることが示された。更に *miR-148a-5p* のターゲットとして *PHLDA2* が膵癌遺伝子である可能性が示された。

③ *PHLDA2* は膵癌部で高発現を示しており、更に siRNA 及び cDNA クローンを用いて膵癌細胞株での機能解析を行ったところ、*PHLDA2* は膵癌において癌遺伝子としての機能が証明された。

④ ルシフェラーゼアッセイにて *miR-148a-5p* が *PHLDA2* を直接制御していることを示し、レスキュー実験によって膵癌における *miR-148a-5p* と *PHLDA2* の相互作用を証明した。

⑤ *PHLDA2* をノックダウンした膵癌細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行い、*PHLDA2* の下流遺伝子候補を多数見出した。それらの遺伝子の多くは膵癌において予後不良因子であることが示された。

【結論及び考察】

本研究では Pre-*miR-148a* (*miR-148a-5p*、*miR-148a-3p*) の膵癌に及ぼす影響について、実験および解析を行った。新規の膵癌遺伝子候補として、*miR-148a-5p* は *PHLDA2*、*LPCAT2*、*AP1S3* を、*miR-148a-3p* は *SMS*、*ENDOD1*、*UHMK1* を見出した。特にパッセンジャー鎖である *miR-148a-5p* が *PHLDA2* を制御することを証明したが、この結果は今まで報告はみられていない。さらに *PHLDA2* は発生領域では研究が進んでいるが、膵癌に対して解析が行われた報告はなく、*PHLDA2* が膵癌促進遺伝子として作用を示すことは初めての知見であった。アレイ解析を施行することで *PHLDA2* が影響を及ぼす遺伝子群を探索し、*SDC1*、*CDK1*、*ANLN*、*TOP2A* 等の重要な癌遺伝子との関連が示唆された。

以上より、これまで未研究であったパッセンジャー鎖マイクロ RNA を起点に研究を進めることで、新規の膵癌分子病態を解明することが可能だった。

(Cancer Science Vol.109, Issue 6, 2018 年 掲載)