

論文審査の要旨

報告番号	総研第 635 号	学位申請者	プラモド・ネパール
審査委員	主査	古川 龍彦	学位
	副査	上野 真一	副査
	副査	井上 博雅	副査
			橋口 照人
			榎田 英樹

Impact of Oncogenic Targets Controlled by Tumor-Suppressive *miR-30a-5p* in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

(*miR-30a-5p* によって制御される癌促進的分子が膵管腺癌に及ぼす影響)

膵管癌 (pancreatic ductal carcinoma: PDAC) は極めて悪性度が高く、最も死亡率の高い癌の一つである。膵癌の発生・進展にはほかの癌腫と同様に遺伝子変異の蓄積、エピジェネティックな制御異常、癌促進経路の活性化が関与することが知られている。またこれまでの研究でノンコーディング RNA (ncRNA) が、生物学的プロセスの多岐にわたり関与していることが明らかになってきた。なかでも 20~30 塩基程度の ncRNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、多数のメッセンジャー RNA の発現を制御しており、miRNA の異常発現が癌の発生、進展、転移、薬剤耐性に関与することも数多く報告されてきた。

申請者らのグループは、RNA シークエンスにより得られた PDAC の miRNA プロファイルを基に、PDAC の病態と密接に関連する癌抑制型 miRNA とその標的となる癌促進型分子を明らかにしてきた。そのなかで、*pre-miR-30a* の両鎖 (*miR-30a-5p*: ガイド鎖、*miR-30a-3p*: パッセンジャー鎖) の発現が PDAC 細胞株で低下していることを明らかにし、*pre-miR-30a* は癌抑制型 miRNA であることを報告した。

そこで本研究は、癌抑制型 *miR-30a-5p* によって制御される癌促進分子を探索し、PDAC の分子病態を明らかにすることとした。特に *RRM2* に着目し、PDAC の悪性化に関わる機能について解析した。

PDAC 細胞株 (PANC1, SW1990) に miRNA precursor および siRNA を核酸導入して、PDAC 細胞の増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。miRNA の標的分子の探索には公共のデータベース (TargetScanHuman, Gene Expression Omnibus (GEO) database, The Cancer Genome Atlas (TCGA)) を利用し、候補となる分子を選定した。*miR-30a-5p* を核酸導入した PDAC 細胞株から mRNA および蛋白を抽出し、q-PCR 法およびウェスタンブロット法で標的分子の発現抑制効果を確認した。またルシフェラーゼアッセイにより標的 mRNA (*RRM2*) と *miR-30a-5p* との直接結合を評価した。*RRM2* タンパクの発現は免疫組織化学染色法 (IHC) で評価した。IHC には 2012 年~2014 年にかけて鹿児島大学病院で手術を受けた患者 2 名の PDAC 臨床検体を用いた。

その結果、以下の知見が得られた。

- ① TargetScanHuman と GEO database を用いて膵癌で *miR-30a-5p* が制御し、癌で発現が促進する分子を探索し、24 個の候補遺伝子を同定した。
- ② 24 個の候補遺伝子のうち 4 つの分子 (*CBFB*, *AHNAK*, *RRM2*, *DCBLD1*) の高発現が PDAC 患者の予後不良と関連していることをデータベースの解析から示した。
- ③ そのなかで *RRM2* の発現が *miR-30a-5p* により直接制御されていることを示した。*RRM2* を siRNAs でノックダウンすることで PDAC 細胞の増殖能、浸潤能および遊走能が抑制されることを明らかにした。
- ④ TCGA の PDAC のデータベースを用いた GSEA 解析で、「E2F ターゲット」などの 7 つの遺伝子セットが有意に *RRM2* の高発現と関与していることを示した。*RRM2* は PDAC において細胞周期制御経路を介して多様な役割を持っている可能性が示唆された。

本研究では癌抑制型 *miR-30a-5p* の発現低下が複数の癌促進的分子を制御している可能性があることを示した。PDAC の悪性化の分子機序の一つとして *miR-30a-5p* の発現低下を介した *RRM2* の上昇があることを示した。今後、この分子経路の詳細な解析から PDAC の治療標的分子が明らかになる可能性がある。癌抑制型 miRNA を起点とした癌促進分子の探索によって、PDAC の悪性化の分子機序の解明がさらに進展すると考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。