

Title	miR-6855-5p Enhances Radioresistance and Promotes Migration of Pancreatic Cancer by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition via Suppressing FOXA1: Potential of Plasma Exosomal miR-6855-5p as an Indicator of Radiosensitivity in Patients with Pancreatic Cancer
Author(s)	植田, 大樹
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101817
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	植田 大樹
論文題名 Title	miR-6855-5p Enhances Radioresistance and Promotes Migration of Pancreatic Cancer by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition via Suppressing FOXA1: Potential of Plasma Exosomal miR-6855-5p as an Indicator of Radiosensitivity in Patients with Pancreatic Cancer (miR-6855-5pはFOXA1抑制を通じた上皮間葉転換を引き起こすことにより膵癌の放射線耐性を増強し、遊走能を亢進する：膵癌患者における放射線耐性の指標としての血漿エクソソーム中miR-6855-5pの可能性)
論文内容の要旨	
〔目 的(Objective)〕	
<p>膵癌は5年生存率9%と予後不良で、術前治療(化学療法または化学放射線療法)を含めた集学的治療が必要である。しかしその治療効果は症例ごとに異なるのが実情で、効果の乏しい症例では術前治療のメリットは無い。特に放射線の併用に関するコンセンサスはなく、放射線治療耐性メカニズムを解明することで治療法の個別化が可能となり治療成績が向上する可能性がある。本研究の目的は、microRNA(miRNA)を介した放射線治療耐性メカニズムを明らかにし、末梢血血漿エクソソーム中のmiRNAが放射線耐性のバイオマーカーとして有用かどうかを検討することである。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>2012-2017年に術前化学放射線治療を行い、切除を施行した浸潤性膵管癌患者10名を対象とした。患者背景は、年齢62-84歳、全例遠隔転移を有さない症例であった。術前治療前後の腫瘍マーカー (CA19-9) 減少率80%を閾値として2群に分類すると、両群間において術前治療前の臨床病理学的背景に差は認めなかった。術前治療前の末梢血血漿検体からフィルター式エクソソーム抽出キット(qEV)でエクソソームを抽出し、網羅的miRNA発現解析(3D-Gene)で評価した。両群間のmiRNA発現量をt検定で比較し、$p<0.1$を閾値とし17種類のmiRNAを抽出した。これらのmiRNAに関する既報告を検討し、髄膜腫で放射線治療耐性と組織内発現量の関連が報告されていたmiR-6855-5pをmiRNA候補として選択した。</p>	
<p>膵癌細胞株2種(Panc-1, PSN-1)にLipofectamineを用いてmiR-6855-5pを強制発現したもの(OE群)と、対照としてScramble配列を強制発現したもの(Scramble群)を作成した。実験数はすべて$n=3$とし、$p<0.05$を有意差ありとした。遊走能をWound healing assayで、放射線耐性をColony formation assayで評価した。OE群はScramble群と比べて遊走能が亢進(2.3-2.5倍)し、放射線照射(2-8Gy)後のColony formationが増加(2-4倍)し、耐性の増強が示唆された。次世代シーケンサーを用いて両群の細胞のRNA解析を行い、そのデータをGene Set Enrichment Analysisで解析すると、OE群はScramble群と比べて上皮間葉転換の経路が亢進していた。続いて、両群の上皮間葉転換関連mRNA発現量を定量的RT-PCRで、蛋白量をWestern blottingで評価した。OE群はScramble群と比べて、上皮間葉転換関連mRNAの発現量増加(OE群で<i>SMI1</i> [1.2-1.5倍], <i>ZEB1</i> [1.3-2.7倍], <i>VIM</i> [1.2-1.4倍], <i>CDH2</i> [2.6-3倍]), 間葉上皮転換関連mRNA(<i>CDH1</i>)の発現量減少(0.2-0.4倍)を認め、上皮間葉転換関連蛋白量の増加(OE群でNeural cadherin [2-2.2倍], Vimentin [2-3倍]), 間葉上皮転換関連蛋白Epithelial cadherinの減少(0.1-0.2倍)を認めた。標的mRNAを推定するプログラムTargetScan 7.1を用いて、miR-6855-5pの標的mRNA候補として<i>Forkhead Box Protein A1(FOXA1)</i>を抽出した。両群の<i>FOXA1</i>発現量を定量的RT-PCRで評価すると、OE群はScramble群と比べて、<i>FOXA1</i>発現量の低下(0.2-0.3倍)を認め、<i>FOXA1</i>がmiR-6855-5pの標的mRNAであることを確認した。</p>	
<p>最後に、上記と別の臨床検体を用い検証した。2012-2022年に術前化学放射線治療を行い、治癒切除を施行した浸潤性膵管癌患者28名を対象とした。患者背景は年齢51-87歳、全例遠隔転移を有さない症例であった。術前治療前後のCA19-9減少率80%を閾値として2群に分類すると、両群間において術前治療前の臨床病理学的背景に差は認めなかった。術前治療前の末梢血血漿検体からqEVを用いてエクソソームを抽出し、miR-6855-5p発現量を定量的RT-PCRで評価した。miR-6855-5p発現量とCA19-9減少率($r=-0.5964$, $p=0.0008$)の有意な相関、ならびに病理学的治療効果(Evans分類) ($p=0.0975$)との相関の傾向を認めた。</p>	
〔総 括(Conclusion)〕	
<p>miR-6855-5pは遊走能を亢進し、放射線耐性を増強させ、上皮間葉転換を惹起し、その標的mRNAは<i>FOXA1</i>であることを示した。さらに、術前治療前の末梢血血漿エクソソーム中miR-6855-5pが膵癌の術前放射線治療耐性を予測するバイオマーカーになりうることを示した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 植田 大樹				
論文審査担当者	(職)	氏 名		
	主 査	大阪大学教授	江口 英利	等 名
	副 査	大阪大学教授	富津 研三	等 名
	副 査	大阪大学教授	小川 和幸	等 名

論文審査の結果の要旨

膵癌の治療成績向上のため術前に化学療法または化学放射線療法が行われているが、放射線耐性メカニズムは未だ解明されておらず、放射線治療を併用するかどうかについての明確なコンセンサスはない。本研究では、miRNAを介した放射線耐性メカニズムを解明し、末梢血血漿エクソソーム中miRNAが放射線感受性のバイオマーカーとして有用かどうかを検討することを目的とした。

10名の膵癌患者の術前治療前の末梢血血漿エクソソーム検体をmiRNA microarrayで解析し、miR-6855-5pを候補として抽出した。膵癌細胞株（Panc-1, PSN-1）にmiR-6855-5pを過剰発現したもの（OE群）と、Scramble配列を過剰発現したもの（Scramble群）を比較すると、OE群において遊走能の亢進、放射線感受性の低下を認めた。両群の細胞のRNA抽出液をRNA-sequenceで解析すると、OE群において上皮間葉転換の経路が亢進していた。標的mRNAを推定するプログラムTargetScan 7.1を用いて、miR-6855-5pの標的mRNAとしてFOX A1を抽出した。別の28名の膵癌患者における末梢血で検討し、血漿エクソソーム中miR-6855-5p発現量が術前化学放射線療法の治療効果（CA19-9の減少率、Evans分類）と相関することを確認した。

以上から、miR-6855-5pはFOX A1抑制を通じて上皮間葉転換を惹起し、膵癌の放射線耐性を増強し、遊走能を亢進する機能を有することが示され、末梢血血漿エクソソーム中miR-6855-5pは膵癌の術前放射線療法の治療効果を予測するバイオマーカーになりうることを示唆された。

今後は、膵癌治療への臨床応用も期待される研究成果であり、本研究はSociety of Surgical Oncologyの英文機関紙であるAnnals of Surgical Oncology誌に掲載され、学位の授与に値すると考える。