



Title	MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer
Author(s)	長谷川, 慎一郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51961
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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	長谷川 慎一郎
論文題名 Title	MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer (マイクロRNA-1246の発現は膵癌においてCCNG2を介した化学療法耐性および癌幹細胞性に関与する)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 膵癌は生物学的悪性度が高く、早期より浸潤・転移を来しやすい癌腫であるため、その予後は極めて不良である。治療成績向上のためには外科的切除に加え化学放射線療法などの集学的治療が重要とされるが、高い治療抵抗性が問題となっている。 近年、膵癌の治療抵抗性や浸潤・転移能に癌幹細胞の関与が報告されている。この癌幹細胞は自己複製能・多分化能を持ち、高い造腫瘍能を有し癌組織を維持している。また従来の化学放射線療法に対して高い治療抵抗性を有していることから、その耐性機構を解明し癌幹細胞を標的とする新規治療薬を開発することは膵癌の予後改善に極めて重要である。癌幹細胞を維持する因子としてはWnt、Notch、Shhといったパスウェイや短鎖non-coding RNAであるmicroRNA(miRNA)、微小環境など様々な報告がなされている。本研究では、これら複数の遺伝子を標的としてその発現レベルを制御しているmiRNAに注目し、癌幹細胞性と薬剤耐性に関わるmiRNAを同定、その機能解析および臨床的意義を検討した。 〔方法(Methods)〕 癌幹細胞を分離する手法として、膵癌を含めた種々の癌腫において癌幹細胞が維持・濃縮されていることが報告されている浮遊細胞塊(sphere)培養法を施行した。膵癌細胞株(Panc1)の親株(Panc1-P)を用いてsphereを形成し、癌幹細胞を増幅した。一方、Panc1-Pを用いて膵癌標準治療薬であるジェムシタビン(GEM)を持続暴露させ耐性株(Panc1-GR)を樹立した。網羅的遺伝子解析によりsphereおよび耐性株で共通して発現上昇を認めたmiRNAを、治療抵抗性に関わる候補miRNAとして選出した。次にTarget scan並びに過去の文献的報告からその標的分子を同定した。候補miRNAおよびその標的分子の機能解析はリポフェクション法を用いた強制発現または発現抑制実験により検討した。機能解析としてMTT assayによるgrowth-inhibitory assay、ultra-low attachment plateを用いたsphere formation assay、Annexin V assayによるapoptosis assayを行い、薬剤耐性能、sphere形成能、apoptosis誘導能を評価した。またレンチウイルスベクターを用いた候補miRNAの形質導入により持続強制発現細胞株を樹立し、免疫不全マウス(NOD/SCID)へ皮下移植することにより造腫瘍能およびGEMの腹腔内投与に対する治療効果を検討した。最後に2007年3月から2012年10月の間に大阪大学医学部附属病院にて根治切除を施行した術前治療非施行・通常型膵癌24例を対象とし、候補miRNAおよびその標的分子の発現意義を検討した。Laser captured micro-dissection(LCM)法により間質部を除去して癌部のみを採取し、RNeasy FFPE kitを用いてRNAを抽出、qRT-PCR法にてmiRNAの発現を定量化した。候補分子の発現については免疫組織学的染色法を用いてその蛋白レベルでの発現を評価した。 〔成績(Results)〕 網羅的遺伝子解析の結果より15個のmiRNAを選出し、特にsphereにおいて14.1倍と著明な発現上昇を認めたmiR-1246に着目した。細胞実験では、Panc1-Pにpre-miR-1246を導入することによりGEMに対する有意な耐性増強を認め、Panc1-GRにanti-miR-1246を導入することにより耐性減弱を認めた。またpre-miR-1246の形質導入によりsphere形成能の有意な亢進を認めた。同miRNAの標的分子として、細胞分化やDNA修復に作用しapoptosisを誘導することが報告されているCyclin-G2 (CCNG2)を選出した。siCCNG2を形質導入しCCNG2の発現を抑制したところ、pre-miR-1246を導入した際と同様、GEM曝露下においてapoptosisは減少しGEMに対する薬剤耐性は増強した。このことからmiR-1246はCCNG2を介したapoptosis誘導を抑制することにより、薬剤耐性の増強に関与していることが示された。動物実験では、miR-1246強制発現株において有意な造腫瘍能の亢進およびGEM投与に対する治療抵抗性の上昇を認めた。臨床検体を用いた検討においては、miR-1246の高発現症例においてCCNG2の発現が有意に低く、全生存期間並びに無再発生存期間が有意に低かった。 〔総 括(Conclusion)〕 miR-1246の発現は膵癌においてCCNG2を介した化学療法耐性並びに癌幹細胞性に関与し、膵癌患者におけるmiR-1246高発現症例は有意に予後不良であった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 長谷川 慎一郎		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 土岐 祐一郎
	副 査	大阪大学教授 野口 眞三郎
	副 査	大阪大学教授 森 甘 菜一

論文審査の結果の要旨

本研究では複数の遺伝子を標的としてその発現レベルを制御しているmicroRNA(miRNA)に着目し、膵癌幹細胞性と薬剤耐性に関わるmiRNAを検索した。膵癌細胞株を用いて、標準治療薬であるジェムシタビンに持続暴露させ耐性株を樹立した。一方、浮遊細胞塊培養法(sphere formation)を用いて癌幹細胞を濃縮し、網羅的遺伝子解析により耐性株およびsphereで顕著に発現上昇を認めたmiR-1246を選出した。細胞実験ではmiR-1246の強制発現および発現抑制を行い、薬剤耐性およびsphere形成能の変化を確認した。動物実験では膵癌細胞株を免疫不全マウスへ皮下移植し、造腫瘍能並びに治療抵抗性の変化を確認した。さらにmiR-1246が標的分子としてCyclin-G2 (CCNG2)を介したapoptosis誘導を制御していることを証明した。臨床検体における発現意義の検討においては、miR-1246高発現症例は有意に予後不良であった。以上よりmiR-1246は膵癌においてCCNG2を介した癌幹細胞性並びに薬剤耐性に関与していた。本研究は今後、臨床応用への発展の可能性を秘めており、学位に値するものと考ええる。