

Title	Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the AKT signaling pathway
Author(s)	濱野, 梨絵
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58245
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

食道癌に対しては手術が標準治療とされているが、手術単独の成績は必ずしも良好ではない。予後向上のために化学療法や放射線化学療法を加えた集学的治療の開発が進められている。しかし最も用いられているシスプラチンを含む化学療法でも、その奏効率は19-40%に留まっており、半数以上の患者では効果が得られていないのが現状である。食道癌治療において化学療法耐性は大きな問題であり、耐性のメカニズムを解明し克服することが患者の予後改善につながると考えられる。

MicroRNAは20-24塩基程度からなる短いnon-coding RNAで、3'末端側でターゲットとなるmRNAに結合し、翻訳阻害やmRNA自身の分解作用を持つ。MicroRNAは細胞の分化や増殖、細胞死、代謝などの面で重要な役割を果たしているが、多くの癌腫でその発現異常が報告されており、癌現遺伝子や癌抑制遺伝子の働きを持つことが示唆されている。一方、近年microRNAは幹細胞機能を制御することが報告されている。正常幹細胞と癌幹細胞は自己複製能や多分化能などの類似点をもつことから、microRNAは正常幹細胞だけでなく、癌幹細胞の制御でも重要な役割を果たしていると考えられる。癌幹細胞は化学療法や放射線治療などの治療耐性に関与する重要なメカニズムであり、我々は化学療法耐性に関与する因子として幹細胞機能を制御するmicroRNAに着目した。

今回、幹細胞機能を制御するmicroRNAが食道癌における化学療法耐性に関与するかどうかを検証するために、それらmicroRNAの発現を測定し、microRNA発現と化学療法の効果や患者の予後との関連を調べた。さらにmicroRNAによる化学療法耐性のメカニズムを明らかにするため、食道癌細胞株を用いた細胞実験を行った。

〔 方 法 〕

対象は術前化学療法を施行後に外科切除を行った胸部食道癌患者98例。パラフィン包埋サンプルからRNAを抽出し、9つのmicroRNA (let-7a, let-7g, miR-21, miR-134, miR-145, miR-155, miR-200c, miR-203, miR-296)を定量的RT-PCRにより定量した。発現値を中央値で高発現群と低発現群とに2分し、microRNAの発現と患者の予後や化学療法効果などとの関連を検討した。また食道癌細胞株を用いて各細胞実験を行った。

〔 成 績 〕

最初にパラフィン包埋標本と新鮮凍結標本から抽出したRNAを用いてRT-PCRでそれぞれmiRNA発現を調べたところ、両者での相関 ($R=0.759$) を認め、パラフィン包埋標本使用の妥当性を確認した。

次に、各miRNA発現と食道癌患者の予後との関連では、miR-200c高発現群 ($P=0.037$)、miR-145低発現群 ($P=0.023$) およびmiR-21高発現群 ($P=0.048$) がそれぞれ有意に予後不良だった。他の6つのmicroRNAについては発現量と予後に相関を認めなかった。予後との関連を認めたmiR-200c、miR-145、miR-21のうち、miR-200cのみで発現と化学療法効果に相関がみられ、高発現群で有意に効果が低かった (臨床効果: $P=0.009$, 組織学的効果: $P=0.007$)。

in vitro実験では、食道癌細胞株 (TE8) に対してIC50で約5.8倍の耐性をもつシスプラチン耐性株 (TE8R) を作成したところ、TE8RではTE8に比べてmiR-200c発現が1.7倍増加した。次に食道癌細胞株TE13にanti-miR-200cを導入してmiR-200c発現を抑制し、シスプラチンに対する感受性をMTTアッセイにて検討した。miR-200c発現抑制株ではコントロールに比べてシスプラチン感受性が増加した ($P<0.05$)。またシスプラチン暴露24時間後のアポトーシスをAnnexin-Vアッセイで検討したところ、miR-200c発現抑制株ではコントロールに比べてアポトーシスが有意に増加していた ($P=0.026$)。miR-200cの標的遺伝子を同定するためにmicroRNAデータベースから検索したいくつかの候補遺伝子 (Apaf-1, PTEN, TFAP2 α , LATS2) の発現をウェスタンブロットで確認したが、miR-200c発現抑制株とコントロールで有意な発現差は認められなかった。しかしリン酸化Aktの発現はmiR-200c発現抑制株でコントロールに比べて減弱していた。

〔 総 括 〕

食道癌において、miR-200c高発現が化学療法耐性に関与することが示され、その効果はAkt経路を介することが考えられた。食道癌においてmiR-200cを標的とした治療が臨床に適用できる可能性が示唆された。

[90]

氏 名	はまのり え 濱野梨絵
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 24412 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the AKT signaling pathway (MiR-200c高発現はAkt経路を介して食道癌における化学療法耐性に関与する)
論文審査委員	(主査) 教授 土岐祐一郎 (副査) 教授 青笹 克之 教授 野口真三郎

論文審査の結果の要旨

化学療法耐性に関与する因子として幹細胞機能を制御するmicroRNAに着目し、microRNAが食道癌における化学療法耐性に関与するかを目的として検証した。

対象は術前化学療法と手術を行った食道癌患者98例。パラフィン包埋サンプルからRNAを抽出し、9つのmicroRNAを定量的RT-PCRにより定量して、その発現量と臨床病理学的因子の関連を検討した。各細胞実験には食道癌細胞株を用いた。

miR-200c高発現群、miR-145低発現群、miR-21高発現群がそれぞれ有意に予後不良であり、さらにmiR-200cのみが化学療法効果と有意に相関した。シスプラチン耐性株では親株に比べ miR-200c発現が1.7倍増加していた。miR-200c発現を抑制した細胞ではコントロールに比べシスプラチン感受性が増加し、アポトーシス細胞が有意に増加していた。またウエスタンブロットではリン酸化Akt発現が減弱し、PPP2R1B発現が増強していた。

このように食道癌においてmiR-200c高発現がPPP2R1BおよびAkt経路を介して化学療法耐性に関与することを示したものであり、博士の学位に値すると考える。