

Title	MiR-181b-5p, ETS1 and c-Met pathway exacerbates the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma after radiation therapy
Author(s)	富原, 英生
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61627
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、 〈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
Synopsis of Thesis

氏名 Name	富原 英生
論文題名 Title	MiR-181b-5p, ETS1 and c-Met pathway exacerbates the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma after radiation therapy (放射線曝露後にmiR-181b-5p, ETS1を介して増加するc-Metの発現は、膵癌患者の予後予測因子である)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>浸潤性膵管癌（膵癌）に対する唯一の根治的治療法は外科切除であるが、切除単独での予後は不良であり、治療成績の改善を目指し様々な集学的治療法が模索されてきた。Gemcitabine（GEM）による術後補助療法は有意に予後を改善したが、5年生存率は20.7%と十分ではなく、さらなる予後の改善が求められた。近年では術前治療の追加が注目され、術前化学放射線療法（Chemo-radiation therapy; CRT）の有用性が報告されてきた。一方で他癌において、化学療法や放射線療法後に残存した癌細胞は癌幹細胞を多く含むため、治療後に悪性度を亢進して増殖し、症例によっては逆説的に転移を引き起こす可能性が示されている。本研究では膵癌幹細胞マーカーであるc-Metに着目し、c-Metの発現と膵癌予後との関連、またCRTがc-Met発現に与える影響、その機序について検討した。</p>	
〔方法 (Methods)〕	
<p>2007年4月から2012年8月の間に根治切除を施行した術前CRT施行/非施行を含む膵癌92例を対象とし、免疫組織学的染色法によりc-Metの発現を調べ、予後との関連を検討した。細胞実験では遺伝子発現をqRT-PCRにて、蛋白発現を細胞免疫染色およびウエスタンブロット法にて評価した。膵癌細胞株（Panc1）にGEMを反復曝露し樹立したGEM耐性株（Panc1-GR）、またPanc1に放射線を反復曝露し樹立した放射線耐性株（Panc1-RR）を用い、親株（Panc1-P）と比較することで抗癌剤/放射線の長期曝露がc-Met発現に与える影響を検討した。Panc1-RRにおいてc-Metの発現亢進を認めたことから、放射線曝露後のc-Met、および下流経路（PI3K/AKT/ERK/STAT3/beta-Catenin）の変化を膵癌細胞株（MiaPaCa2）で検討した。また、放射線曝露によるc-Met発現変化に関わるmicroRNA（miR）を選出する目的で、Panc1-P、Panc1-RR、放射線単回曝露後の細胞株（Panc1-IR）の網羅的遺伝子解析を行った。同定したmiRおよびその標的蛋白の機能解析のため、リポフェクション法による遺伝子導入を行った。pre-miRによる候補miRの強制発現とsmall interfering RNA（siRNA）による標的蛋白の発現抑制を行い、放射線曝露によるc-Met発現変化の機序について検討を行った。標的蛋白とc-Met発現の関係を臨床検体で検証するため、c-Met発現を評価した切除標本の連続切片を用い、免疫組織学的染色法にて標的蛋白の発現を評価した。</p>	
〔成績 (Results)〕	
<p>c-Metの発現から高発現症例43例、低発現症例49例に分類し、両群の臨床病理学的背景を比較したところ術前CRT施行群に有意にc-Met高発現症例を多く認めた（$P<.05$）。全生存期間の中央値はc-Met高発現群/低発現群が23.7/46.8ヶ月（$P<.01$）でありc-Met高発現は有意な予後不良因子であった。多変量解析の結果、c-Met発現は唯一の独立予後因子であった。c-Metは放射線耐性株にて有意な発現上昇を認め（3.1 ± 0.6倍）、GEM耐性株では増加を認めなかった。放射線単回曝露では6時間後にc-Metの遺伝子発現は有意に増加し（3.9 ± 0.3倍）、48時間後にはいずれの下流経路も蛋白発現が賦活されていた。Panc1-IR、2つのPanc1-RRで共通して変化したmiRは40候補で、その内、c-Met発現にmiR-181b-5pの低下が間接的に関与することが想定された。MiR-181b-5pはc-Metの転写因子であるETS1（v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1）を標的とし、放射線曝露によりETS1発現は有意に増加を認めた。一方、ETS1発現抑制細胞に放射線曝露したところ、c-Metの発現上昇を認めなかった。MiR-181b-5p強制発現細胞株では、放射線曝露後にETS1、c-Metの発現上昇が消失した。臨床検体を用いたETS1発現とc-Met発現の関連についての検討では、ETS1高発現症例は有意にc-Met高発現症例を多く含み（$P<.01$）、腫瘍内の局在を検討すると、ETS1高発現癌細胞部位にc-Met高発現癌細胞を認めた。また術前CRT施行群にETS1高発現症例を有意に多く認めた（$P<.01$）。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>膵癌細胞の中には、放射線曝露によりmiR-181b-5pが抑制されることでETS1の発現が増加して、c-Met発現増加を来す経路が存在し、c-Metの発現が高い膵癌患者は有意に予後不良であった。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 富原 英生	
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 小川 和彦
	副 査 大阪大学教授 山本 浩文
論文審査の結果の要旨	
<p>通常型膵癌（以下、膵癌）において、長期に渡り局所を制御する術前化学放射線治療（以下CRT）は有望な治療法であるが、遠隔転移に対しては十分な制御効果を示せていない。本研究は、この原因が癌幹細胞の存在にあると仮説を立て、CRTが膵癌幹細胞マーカーであるc-Met発現に及ぼす影響について検討することを目的とした。膵癌根治切除症例における免疫組織化学染色の結果、c-Met高発現群の累積生存期間は低発現群と比較し有意に短く、独立した予後因子であった。c-Met発現に関してCRT施行は高発現の独立因子であり、細胞実験では放射線暴露がc-Metを誘導していた。網羅的miRNA解析から着目したmiR-181b-5pは、放射線暴露によって低下し、標的蛋白である転写因子ETS1がc-Metプロモーターに作用してc-Met発現を増加していることを証明した。本研究は、CRTへの上乗せ治療としてc-Met標的治療の有用性を示唆しており、学位に値するものと認める。</p>	