OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
Author(s)	三賀森, 学
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67036
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

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） 三賀森 学

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 道三郎
副査	大阪大学教授	奥村 明之進

論文審査の結果の要旨

膵癌に対する抗癌剤治療では耐性化を管理することが重要な課題である．エクソソームは細胞間伝達に重要な役割を果たし，抗癌剤耐性能を伝搬することに関与している．一方，癌細胞の抗癌剤耐性能は種々のmicroRNAが変化することで誘導されているが，両者間の関連について報告はなく，本研究を行った．

GEM耐性膵癌細胞における網羅的遺伝子解析の検討からmiR-155を同定し，miR-155が抗アポトーシス作用の誘導のみならず，エクソソームの分泌増加を来してGEM耐性能を伝搬していることを示し，異種皮下移植マウスモデルを用いて証明した．膵癌患者の臨床検体を用いた検討でも，組織中のmiR-155高発現が全生存期間の有意な危険因子であった．

以上より膵癌において，miR-155の発現がエクソソームの分泌を調整しGEM耐性能を誘導・伝搬していることが証明され，新たな治療標的の可能性を示した．本論文は学位論文に値する．

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	三賀森　学
論文題名 Title	MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (浸潤性膵管癌においてmicroRNA-155はエクソソーム合成を調整しゲムシタビン耐性を促進する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

難治性疾患である浸潤性膵管癌(以下:膵癌)に対し，ゲムシタビン(GEM)を基軸とした抗癌剤治療が行われているが，長期投与と共に耐性を来す事も知られており，GEM耐性機構の解明は膵癌の克服に不可欠である．GEM耐性機構には様々な因子が関わるが，多様な癌細胞集団において薬剤耐性を獲得する理由として，耐性化した細胞が耐性因子を効率的に伝搬させていると考えられる．本研究ではエクソソームを介した細胞間伝達に着目し，これに関わるmicroRNA(miR)を検討した．

〔方　法(Methods)〕

膵癌細胞株(Panc1)にGEMを暴露し継代を重ねて作成したGEM耐性株とその親株を用いて網羅的にmiR遺伝子発現を比較した．同定したmiR-155の臨床におけるGEM感受性への影響検討のため，術後抗癌剤治療を行った症例(n=45)の切除標本を用い，腺癌部分をLaser capture microdissectionにて分離し，qRT-PCRにてmiR-155の発現を調べ，予後への影響を検討した．また，術前血漿が保存されていた症例(n=23)において血漿からエクソソームを抽出し，エクソソーム内のmiR-155を測定して組織のmiR-155発現と比較した． miR-155のGEM耐性機能解析のため，3種類の膵癌細胞株(Panc1, MiaPaCa2, PSN1)にpre-/anti-miR-155/蛍光色素標識したmiR-155を導入し，GEMに対する感受性の変化(MTTアッセイ)，抗アポトーシス能の変化(Annexin Vアッセイ，Caspase 3/7活性測定)を評価し，既知標的蛋白でありアポトーシス誘導蛋白であるTP53INP1の発現変化を評価した(細胞免疫染色，ウェスタンブロット法)．エクソソーム分泌能の評価として，細胞培養上清からExoQuick-TCを用いてエクソソームを抽出し，Bradford法による分泌量の測定，電子顕微鏡観察(EM)による細胞質内のエクソソーム前駆体である多小胞体割合を計測した．抽出したエクソソームの機能評価のため，エクソソーム内のmiR-155発現をqRT-PCRにて測定し，培養上清に添加し(50μg/ml)，細胞免疫染色およびGEM感受性試験にて変化を調べた．エクソソームの分泌阻害実験はsiRab27Bの遺伝子導入により行った．膵癌細胞異種皮下移植マウスモデルでの検証では，GEM(125mg/kg)を週1回腹腔内投与して治療を行い，miR-155強制発現細胞およびコントロール細胞の培養上清から抽出したエクソソームを週3回皮下腫瘍周囲に投与し，腫瘍への影響を検討した(腫瘍体積測定，TUNEL染色)．

〔成　績(Results)〕

親株と比しGEM耐性株で共通して高発現しているmiRのうち抗癌剤耐性と関与し得るmiR-155に着目した．切除標本にてmiR-155高発現の症例は全生存期間(OS)および無病生存期間(DFS)の短縮が認められ(OS: p=0.008, DFS: p=0.021)，血漿中のmiR-155発現と高い正の相関が認められた(p<0.01, r=0.71)．膵癌細胞株ではmiR-155過剰発現は，GEMの50%効果濃度(EC50)を増加させ(6.32倍)，アポトーシス細胞数の有意な低下を認め(Annexin V：0.59倍，Caspase 3/7活性：0.68倍)，TP53INP1の抑制を認めたが，siRab27Bによるエクソソーム分泌阻害によってこれらの変化は有意に減弱した．Panc1においてエクソソーム分泌はmiR-155強制発現で有意に増加し(Bradford：1.42倍，EM：2.27倍)，発現抑制では有意に低下した(Bradford：0.67倍，EM：0.68倍)．miR-155過剰発現細胞の培養上清から抽出したエクソソームでは内包するmiR-155発現は増加していた．蛍光色素標識miR-155を遺伝子導入した膵癌細胞から抽出したエクソソームをコントロール細胞に添加すると，標識miR-155が取り込まれTP53INP1の発現が抑制されることを確認した．miR-155高発現のエクソソーム添加は，GEMのEC50を4.67倍増加させ，アポトーシス細胞数を有意に低下させた(Annexin V：0.65倍，Caspase 3/7活性：0.82倍)．*In vivo*ではmiR-155高発現のエクソソーム投与群ではGEMによる腫瘍体積抑制効果が有意に低下し(p<0.05)，アポトーシス細胞は有意に減少していた(p<0.05)．

〔総　括(Conclusion)〕

miR-155は，膵癌細胞のエクソソーム分泌を増加させ耐性因子を伝搬することでGEM耐性化を促進していた．