



Title	Significance of signal recognition particle 9 nuclear translocation: Implications for pancreatic cancer prognosis and functionality
Author(s)	佐藤, 広陸
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/98742
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	佐藤 広陸
論文題名 Title	Significance of signal recognition particle 9 nuclear translocation: Implications for pancreatic cancer prognosis and functionality (Signal recognition particle 9 (SRP9)の核内移行の意義：膵癌の予後と機能性への影響)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>膵癌は世界的に増加している疾患で、本邦でも現在、年間癌患者死亡の4位となっている。切除以外に根治可能な治療は少なく、腫瘍制御のために転移浸潤のメカニズム解析が必要である。本研究では、蛋白合成を促進するSignal recognition particles (SRPs)に着目した。SRPsは細胞質に存在するリボヌクレオ蛋白であり、細胞質内でリボソームを小胞体に輸送して蛋白合成を促す働きがあり、6つのサブユニットで構成される。この6つのサブユニットのうち、RNA結合ドメインを持ち、SRPsの機能を調節する蛋白がSRP9である。SRP9は乳癌や大腸癌で高発現しており、腫瘍増殖に関与していると報告されている。膵癌におけるSRP9の発現の意義はこれまで検討されていないが、Human Protein Atlas databaseでの解析では、SRP9が高発現している膵癌は全生存期間が短縮する傾向が示されている。また、GeneCardsのデータベース上、SRP9は一般に細胞質蛋白であるとされているが、膵癌切除検体のSRP9の免疫組織染色では、核染色される細胞が一部認められた。以上から、本研究ではSRP9の細胞内局在と関連する機能が癌の進展に寄与する可能性に着目し、切除後の治療成績（無再発生存期間(RFS)）との関係と、核移行の意義について検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>まず、術前無治療で切除を行った膵癌38例の切除検体を用いて、SRP9発現の意義を免疫組織染色で検討した。SRP9の核染色率は10%～90%で、50%を境界とした2峰性であった。核染色率を50%で分類すると、核染色率が50%を越える群(n=24)は、核染色率50%以下の群(n=14)よりもRFSが有意に良好であった(5年RFS 26.4% vs 0%, p=0.037)。</p>	
<p>SRPsは蛋白合成に関与することから、必須アミノ酸のSRP9の核移行への影響を評価した。膵癌細胞株MIA PaCa-2細胞を用い、必須アミノ酸欠乏培地を用いて24時間培養した後にSRP9とDAPIで染色し、ランダムな16視野を観察しSRP9の核移行率を算出した。必須アミノ酸欠乏培地で培養した場合、DMEMで培養した場合よりもSRP9の核移行率は有意に低下した(核移行率 DMEM/メチオニン欠乏培地/トリプトファン-ナイアシン欠乏培地/ メチオニン-トリプトファン-ナイアシン欠乏培地(中央値[範囲]%)、71.2 [62.5-81.9] / 48.3 [27.7-68.9] / 53.7 [22.3-66.1] / 56.4 [28.7-67.1] , p<0.0001)。以上から、必須アミノ酸の欠乏下において、SRP9の核移行は抑制される可能性が示唆された。</p>	
<p>次に、SRP9の核移行に重要な配列を同定することとした。SRP9はExon1～4の4つのエクソンをもち、成熟mRNAの段階でExon1、2、3からなるバリアント1(v1)と、Exon1、2、4からなるバリアント2(v2)の2つのスプライシングバリアントがある。この2つのバリアント(v1、v2)、または両者の共通部分(Exon1、2)を赤色蛍光ベクター(DsRed)に組み込み、MIA PaCa-2に導入したところ、3者(v1、v2、v1とv2の共通部分)とも核における発光が認められ、核移行に重要な配列はExon1、2に含まれていることが示された。</p>	
<p>最後に、v1とv2が核に移行することによる機能を評価した。v1またはv2に核移行シグナル・FLAG tag・GFPを付与したプラスミドを作成し、MIA PaCa-2に導入後、GFPの発色を確認し、細胞抽出蛋白を抗FLAG抗体でRNA免疫沈降後に、RNAシーケンスを行った。k-meansによるクラスタリング解析で、蛋白質の合成に関わる遺伝子(MT-TV、MT-TI、MT-TS2)と経路(Mitochondrial translational elongation、Mitochondrial translational termination、Translational termination)が、v1およびv2で抑制されていた。また、Gene set enrichment analysisで、癌の進行に関わる経路(MYC、E2F、G2M checkpoint、KRAS)が抑制されており、これは前述の免疫組織染色によるRFSの結果に矛盾なかった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>膵癌においてSRP9の核移行が認められた症例では、切除成績が良好であった。SRP9の核移行は、必須アミノ酸欠乏下で抑制されること、蛋白質の合成や癌の進行に関わる経路の抑制に関与することを示した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 佐藤 広陸		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	江口 英季
	副 査 大阪大学教授	谷内田 真一
	副 査 大阪大学教授	古井 第一
論文審査の結果の要旨		
<p>Signal recognition particles (SRPs) の構成要素であるSRP9は、乳癌で高発現するが、その機能は明らかではない。GeneCardsでは、SRP9が主に細胞質に発現していることが示されており、Human Protein Atlasデータベースでは、肺癌においてSRP9の高発現が予後不良因子であると報告されている。</p> <p>本研究では、肺癌におけるSRP9の細胞内局在を観察したことから、その局在が癌の進展に与える影響に注目して、切除後の無再発生存期間(RFS)との関係と、核移行の意義について検討した。肺癌切除術を施行した38例の切除標本を用いて、SRP9の免疫組織染色を行った。SRP9の核染色率が50%を超える場合と50%以下の場合で比較したところ、核染色率が50%を超える場合にRFSが良好であることが分かった（5年RFS 26% vs 0%, p=0.037）。SRP9は複数のスプライシングバリエント（v1, v2）を持つ。SRP9 v1およびv2の共通配列（Exon1およびE2）または特異的配列（Exon3または4）を赤色蛍光ベクターに組み込み、肺癌細胞株に導入したところ、いずれのプラスミドでも核での発光が認められ、核移行に重要な配列はExon1およびExon2に含まれていることが示された。さらに、核移行したSRP9 v1およびv2の機能を調べるため、RNA免疫沈降（RIP）後にRNAシーケンスを行い、遺伝子セット解析（GSEA）を実施した。その結果、SRP9 v1およびv2は、癌の進行に関わるpathway（MYC, R2E, G2M checkpoint）を抑制することが分かった。</p> <p>核移行をはじめとするSRP9の詳細なメカニズムに着目した報告はこれまでになく、本研究は新規性のあるものであり、今後は肺癌治療への臨床応用も期待される研究成果であることから、学位の授与に値すると考える。</p>		