

# 論文内容要旨

## 論文題目

ヒト膵癌オルガノイドを用いた Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway 制御に関連する long non-coding RNA の発現解析

責任講座： 内科学第二 講座  
氏名： 名和 慈仁

## 【内容要旨】 (1,200 字以内)

【背景】膵癌は最も予後不良な固形癌であり、新たな治療標的分子や早期診断バイオマーカーの発見は必須である。膵癌の分子病態の中心をなす Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway は分子標的薬の重要な標的となり、いくつかの薬剤が臨床応用されているが、その有効性は乏しい。Long non-coding RNA (lncRNA) は様々な分子生物学的プロセスの制御因子として注目され、膵癌の発生や進行において重要な働きを担っている事が示されている。今回私は、lncRNA が MAPK pathway の制御因子であると仮定し、ヒト膵癌生検検体から作成した患者由来膵癌オルガノイドにおいて MAPK 活性に関連する lncRNA の発現解析を行う事を目的とした。

【方法】2020年3月～2024年3月の期間に山形大学医学部附属病院第二内科で診療した膵癌症例 58 例の EUS-FNA 検体から膵癌オルガノイドを作成した。樹立・冷凍保存できた膵癌オルガノイドに対し MEK 阻害薬を添加して培養し、添加群/非添加群から全 RNA を抽出した。Nanopore シークエンサーを用いた direct RNA Sequence による発現解析を行った。得られたデータから lncRNA を絞り込んで発現量 (TPM 値: Transcripts Per Million) で t 検定を行い、添加群/非添加群において有意な発現変動 (P value < 0.01) が見られたものを同定した。またその近傍の coding 遺伝子について、P value と log<sub>2</sub>FC (発現増減の対数値: log<sub>2</sub>FoldChange) を用いて重み付けし、上位 5% の coding 遺伝子を同定した。

【結果】54 症例のうち 39 症例でオルガノイド樹立が確認された。冷凍保存後安定した培養・継代が可能だった例は 18 例だった。MEK 阻害薬添加後に RNA Sequence が可能な質・量の RNA が確保できたのは 8 例だった。添加群/非添加群の合計 16 検体において lncRNA は平均 880.7 個検出された。このうち有意な発現変動の見られた 12 の lncRNA (LINC02983、MICA-AS1、ZNF778-DT、LOC131696449、LINC00941、TRIM52-AS1、ALOX12-AS1、LINC00857、APTR、SNHG19、C2CD4D-AS1、IER3-AS1) が同定された。TCGA データベース解析を行ったところ LINC00857 の高発現と SNHG19 の低発現が膵癌の予後不良に関連していることが分かった。LINC00941 は細胞株を用いた既報と同様に有意な発現低下が見られた。また重み付けによって上位 5% の 14 の Coding 遺伝子を同定した。

【結論】膵癌オルガノイドを用いた検討において MAPK pathway を阻害した際に発現変動が見られた lncRNA を確認することができ、細胞株を用いた検討との一致が見られた。これらは膵癌において MAPK pathway の下流に存在していると考えられた。他癌種において癌増殖や転移に影響している可能性が示唆されており、膵癌においても予後予測マーカーや治療標的遺伝子になりうる可能性がある。

令和 年 12月 25日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 名 和 慈 仁

論文題目：ヒト膵癌オルガノイドを用いた Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway  
制御に関連する long non-coding RNA の発現解析

審査委員：主審査委員 中 島 修  
副審査委員 吉 岡 孝 志  
副審査委員 太 田 康 之



審査終了日： 令和 6年 12月 19日

### 【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

膵癌は、その早期診断の困難さに加え、近年、多くの癌種で高い治療効果が報告されている分子標的薬でもその効果が限定であり、この状況を打開するため、新たな分子標的の同定が求められている。名和氏は、long non-coding RNA (lncRNA)が膵癌の浸潤転移・幹細胞性などに関与し、一部のlncRNA (*LINC00941*)がMAPK pathway制御下での膵癌細胞増殖を制御することに注目し、本研究において、MAPK pathway制御因子として膵癌予後に関連し、新たな診断マーカーや治療標的となり得るlncRNAの探索を、膵癌患者オルガノイドを用いて行った。

膵癌症例の58例から膵癌オルガノイドの作成を試み、樹立・凍結保存可能であった8例について、膵癌オルガノイドに対しMEK阻害薬処理を行い、RNANanoporeシーケンサーによるdirect RNA Sequence発現解析で比較した。MEK阻害薬処理により有意な発現変動しMAPK pathway依存性が確認された12種のlncRNAが同定された。The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベース解析から、これらのlncRNAの中に、原発腫瘍組織と正常膵組織間で発現が有意に異なる*LINC02983*, *APTR*, *LINC00857*, *SNHG19*の4遺伝子が、*LINC00941*以外にも同定された。さらに、生存時間解析から、*LINC00857*の高発現、および*SNHG19*の低発現が予後不良に関連していることが明らかとなった。

本研究により、膵癌予後に関連するlncRNAとして、*LINC00857*と*SNHG19*が新規に同定されたことは意義深く、今後の発展が期待される。また、MEK阻害薬処理による*LINC00857*と*SNHG19*の発現低下にもかかわらず、発現変動の予後への影響はお互いが逆となっており、lncRNAによる膵癌悪性化への関与は複雑であり、さらなる分子メカニズムの解明が待たれる。

論文内の統計処理に関する記載が一部、不十分な点を修正すること、実験当初、54例からオルガノイド作成をしたものの、解析に至った症例が8例と少なく、バイアスの可能性をリミテーションとして論文内に言及すること、さらに、症例の遺伝的背景を部分的にでも明確にするため、解析した膵癌症例のK-Ras変異の有無に言及すること、これらの点に修正が可能であれば、審査委員会では、本研究論文は博士(医学)の授与に値すると判定した。

(1, 200字以内)