

論文内容要旨

論文題目

MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer (ヒト膵臓癌細胞において MAPK 活性に関わるマイクロ RNA の同定)

責任講座: 山形大学医学部内科学第二講座

氏名: 池田 祐之

【内容要旨】(1,200 字以内)

<背景と目的> 膵癌は非常に予後不良な難治癌の一つであり、より効果的な新規治療法の開発が急務とされている。膵癌はその大部分に K-RAS 遺伝子の変異を伴い、変異 RAS により誘導される mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路の恒常的活性化は膵癌の悪性形質に強く関与していると言われている。一方マイクロ RNA(miRNA)の発現異常は膵癌を含む種々の癌で確認されており、機能的重要性が明らかになりつつあるが、そのメカニズムおよび意義については未だに不明な点が多い。そこで申請者は、MAPK 活性による膵癌細胞増殖制御における miRNA の関与の可能性とその機序について検討した。

<方法と結果> MAPK 活性を抑制した培養ヒト膵癌細胞と抑制していないコントロール細胞において、183 種類の miRNA の発現を比較した。その結果、MAPK 活性に依存して発現変化している可能性のある miRNA として 11 種類を抽出した。その 11 種類について MAPK を活性化または抑制した HEK293 細胞を用いて確認実験を行い、MAPK 活性依存的に発現変化する miRNA として miR-7-3、-34a、-181d、193b の 4 種類を同定した。miR-7-3 は MAPK 活性により発現が促進され、それ以外の 3 種類は抑制される。続いて膵癌細胞にこれら 4 種類の miRNA を過剰発現させた場合とノックダウンした場合の、細胞増殖に与える影響を検討した。その結果 4 種類いずれにおいても、膵癌細胞に過剰発現させると増殖が抑制されたが、中でも miR-193b で最も効率よく抑制された。以上のことから、細胞増殖抑制効果の強い miR-193b は膵癌細胞においては MAPK 活性によりその発現が抑制されており、膵癌の増殖に寄与していることが示唆された。次に miR-193b による細胞増殖抑制のメカニズムを解明するために、標的遺伝子の検索を行った。膵癌細胞において miR-193b によって発現が抑制される遺伝子をアレイ解析により同定し、さらに遺伝子配列から miR-193b が直接結合しうる遺伝子を絞り込んだ。これらの候補遺伝子に対してルシフェラーゼレポーターアッセイ法を応用し、miR-193b が直接結合を介して機能抑制している可能性のある遺伝子、すなわち miR-193b の標的遺伝子として *CCND1*、*NT5E*、*PLAU*、*STARD7*、*STMN1*、*YWHAZ* の 6 遺伝子を同定した。

<結論> 膵癌における miRNA の発現異常には MAPK 活性が関与している可能性がある。MAPK 活性依存的に発現変化する miRNA の中で、miR-193b は特に細胞増殖抑制効果が強く、新しい膵癌治療に応用できるポテンシャルを有すると考えられる。

平成 23年 1月 12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： 池田 祐之

論文題目：MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer (ヒト膵臓癌細胞において MAPK 活性に関わるマイクロ RNA の同定)

審査委員：主審査委員 北中 千史



副審査委員 早坂 清



副審査委員 後藤 薫



審査終了日：平成 23年 1月 12日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

膵がんはヒトがんの中でも最も予後不良な難治がんの一つであり、より効果的な新規治療法の開発が必要である。膵がんではその大部分でK-RAS遺伝子に変異が認められ、RAS活性化により誘導されるいわゆるMAPK経路の異常活性化がその増殖に寄与していることが示唆されてきた。しかしながらMAPK経路による膵がん細胞の増殖制御についてはいまだ不明な点が残されている。そこで池田氏は本論文において、近年がん細胞における機能的重要性が明らかになりつつあるマイクロRNA(miRNA)に着目し、MAPK経路による膵がん細胞増殖制御におけるmiRNAの関与の可能性とその機序について検討を行い、もって膵がん治療における新たな分子標的の探索を試みた。

まずMAPK経路を人為的に抑制した膵がん細胞で発現レベルが変化するmiRNAのスクリーニングを行ない、得られた候補miRNAに対して、人為的にMAPK経路を活性化/抑制したHEK293細胞を用いて確認実験を行った。その結果、MAPK経路依存的発現制御が強く示唆されるmiRNAとしてmiR-7-3, miR-34a, miR-181d, miR-193bが同定された。次に膵がん細胞においてこれらmiRNAの過剰発現および発現抑制が増殖に与える影響を検討したところ、miR-193bの過剰発現により膵がん細胞の増殖が効率よく抑制された。miR-193bは上記検討からMAPK経路抑制時に発現亢進することがわかっているので、この結果はMAPK経路が「増殖抑制的機能をもつmiR-193b」の発現を抑制することで膵がん細胞の増殖に寄与している可能性を示唆するものである。そこでさらにこのmiR-193bがいかなる機序で膵がん細胞の増殖を抑制しているかにつき検討を行った。一般にmiRNAは遺伝子のmRNAに結合し、mRNA分解促進や翻訳抑制を通じて遺伝子機能を抑制する。そこで池田氏はmiR-193b発現により膵がん細胞で発現が抑制される遺伝子をアレイ解析により同定し、さらに遺伝子配列からmiR-193bが直接結合すると予測される遺伝子を絞り込んだ。これらの候補遺伝子に対してルシフェラーゼレポーターアッセイ法を応用し、直接結合を介してmiR-193bにより機能抑制を受けている可能性のある遺伝子、すなわちmiR-193bの標的遺伝子として、CCND1, NT5E, PLAU, STARD7, STMN1, YWHAZの6遺伝子を同定した。

以上の結果はmiR-193bがMAPK経路を介する膵がん細胞の増殖制御に関与しうることを初めて明らかにしたものであり、膵がん治療における新たな分子標的探索において有用な知見を与えるものである。従って本審査委員会は本研究が学位(医学)の授与に値するものと判定する。

(1, 200字以内)