

## 論文の内容の要旨

論文題目 膵癌で高発現する新規 circular RNA の同定とバイオマーカー応用

氏名 清宮崇博

膵癌の部位別癌死亡者数は全世界で第7位、5年生存率は9.3%にとどまり、他の悪性腫瘍と比較しても、膵癌は予後不良な難治癌の代表である。したがって、膵癌の病態解明およびそれを基盤にした新たな早期診断法および治療法の開発が強く求められている。

近年の RNA シークエンス技術の発展によって、circular RNA (circRNA) と呼ばれるノンコーディング RNA の一種が、膵癌をはじめとした様々な癌で異常発現していることが明らかになってきた。circRNA は環状構造を有する 1 本鎖の RNA であり、下流のエクソンが上流のエクソンと結合するバックプライミングと呼ばれるプロセスを介して pre-mRNA から生成される。circRNA は独自の生物学的機能を有することが知られている。例えば、microRNA (miRNA) と結合することによって miRNA とターゲット RNA との結合を競合的に阻害する、miRNA sponge と呼ばれる機能や、タンパクと直接結合してそのタンパクの作用を調節する機能や、タンパク翻訳のテンプレートとなりうることが報告されている。また、circRNA はエクソソームと呼ばれる細胞外小胞を介して血清中に遊離し、血清中で安定して存在するため、バイオマーカーとしての応用も期待されている。

本研究では、膵癌と正常膵組織由来の RNA を用いて circRNA に特化した RNA シークエンスを行い、既知の circRNA にとどまらず新規の circRNA も含めて網羅的に探索した。さらに、膵癌で高発現する新規 circRNA の全長配列を決定し、バイオマーカーとしての有用性について検討した。

まず、膵癌および正常膵組織で発現する circRNA を網羅的に同定するために、2 例の膵癌と 2 例の正常膵組織由来の RNA に対して、RNase R 処理を行い直鎖 RNA のみを分解した後、RNA シークエンスを行なった。全体で 58,050 種類の circRNA を同定し、そのうち 40,619 種類は既存のデータベースに登録のない新規の circRNA であった。正常膵組織と膵癌の間で有意に発現変動する circRNA を解析し、12 番染色体から転写される新規 circRNA が膵癌で高発現することを見出した。以降、この新規 circRNA を circPDAC RNA と呼ぶ。

RNA シークエンスのバリデーションとして定量 RT-PCR を行った。RNA シークエンスの結果と合致して、circPDAC RNA は正常膵組織由来の RNA からは発現を認めず、膵癌由来 RNA からは発現を認めた。circPDAC RNA を増幅する外向きプライマーを用いた RT-PCR とサンガーシークエンスによって、この circPDAC RNA の全長配列を決定した。circPDAC RNA は 268 塩基長であり、ノンコーディング RNA の LOC107987178 のエクソン 3 とノンコーディング RNA の LOC100507377 のエクソン 2

とエクソン 3 から形成されていた。

つづいて、circPDAC RNA の組織における発現様式を調べるために RNA in situ hybridization を行った。RNA シークエンスの結果と同様に、circPDAC RNA は正常膵組織と比較して膵癌組織に有意に高発現していた。また、リンパ節転移を有する症例で有意に高発現しており、癌の病期が進行するほど circPDAC RNA が高発現する症例の割合が増加する傾向を認めた。一方で、膵癌の前癌病態である pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) では circPDAC RNA の発現は認めなかった。

膵癌以外の悪性腫瘍における circPDAC RNA の発現を検証するために、種々の細胞株を用いた定量 RT-PCR を行った。癌細胞株のうち、大腸癌細胞株 Caco-2、肝癌細胞株 Huh-7、乳癌細胞株 MCF-7、肺癌細胞株 A549 で circPDAC RNA の発現を認めた。また、非癌細胞株のうち、293T でも circPDAC RNA の発現を認めた。大腸癌、乳癌、前立腺癌組織に対して RNA in situ hybridization を行った結果、前立腺癌では正常前立腺組織と比較して circPDAC RNA が高発現していた。以上の結果から、circPDAC RNA は膵癌のみならず他臓器癌でも発現している可能性が示唆された。

circPDAC RNA の発現は、同じ遺伝子座から転写されるノンコーディング RNA の LOC107987178 と LOC100507377 の発現とは一致していなかった。血清飢餓下で培養することにより細胞増殖を抑制して定量 RT-PCR で新規 circRNA の発現量を測定したが、血清飢餓によって circPDAC RNA の発現量は変化しなかった。

つづいて、circPDAC RNA の機能解析を行うために、circPDAC RNA 発現コンストラクトを作成した。ショウジョウバエの *laccase2* 遺伝子は上流と下流のイントロンに相補性の高いトランスポゾン配列を有しており、これが細胞内で自律的にバックスプライシングと環状化を誘導することが知られている。このことを利用して、circPDAC RNA の上流と下流に相補的なトランスポゾン配列を組み込み、circPDAC RNA 発現プラスミドを作成した。レンチウイルスを用いて circPDAC RNA を恒常的に発現する BxPC-3 細胞株を樹立し細胞増殖アッセイを行った結果、変化は限定的だが、circPDAC RNA の発現は BxPC-3 の細胞増殖を有意に抑制した。

circPDAC RNA が miRNA sponge として機能するかを検証するために、circPDAC RNA 配列中に miRNA のターゲットとなりうる配列が含まれているか mirTarget を用いて検索したが、各 miRNA とせいぜい 1 カ所の結合部位しか有していなかった。このことは、circPDAC RNA は miRNA sponge として機能していることを積極的に支持するものではないと考えられた。

circPDAC RNA からペプチドが翻訳されるかについて検討した。circPDAC RNA の配列中にそれぞれ 27 アミノ酸、78 アミノ酸をコードする 2 つの open reading frame (ORF1, ORF2) が存在していた。これら 2 つのペプチドに対する抗体を作製し、enzyme-linked immunosorbent assay、免疫蛍光染色、免疫沈降ウェスタンブロッティングを行ったが、circPDAC RNA からのペプチド産生は確認できなかった。

最後に、circPDAC RNA のバイオマーカー応用の可能性を検討した。circPDAC RNA を強制発現させた細胞の培養上清に分泌されたエクソソームから RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行い、circPDAC RNA がエクソソーム中に豊富に存在することを確認した。つづいて、20 例の膵癌患者の血清と悪性腫瘍および膵疾患既往のない 20 例の健常コントロール血清を対象に血清から RNA を抽出し、微量の RNA の検出感度を上昇させるために、前増幅を行なった後に droplet digital PCR 法で circPDAC RNA を測定した。膵癌患者 20 例中 9 例、健常コントロール 20 例中 2 例から circPDAC RNA は検出され、膵癌診断能は感度 0.45、特異度 0.90 であった。さらに、膵癌の前癌病態として知られる膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) 患者 10 例中 6 例からも circPDAC RNA は検出された。これらの結果から、circPDAC RNA は膵癌および IPMN に対する新規診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。