

審査の結果の要旨

氏名 清宮 崇博

本研究は、膵癌における circular RNA (circRNA)の発現を網羅的に探索し、膵癌で高発現する新規 circRNA を同定し、バイオマーカー応用の可能性を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 膵癌および正常膵組織由来の RNA を用いて circRNA に特化した RNA シークエンスを行い、既存のデータベースに登録されていない新規の circRNA が膵癌で高発現していることを見出した。以降、この新規 circRNA を circPDAC RNA と呼ぶ。
2. circPDAC RNA を特異的に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、circPDAC RNA の全長配列を決定した。circPDAC RNA は全長 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 から形成されていることを同定した。
3. 膵癌および正常膵組織に対する RNA in situ hybridization によって、circPDAC RNA は膵癌において高発現していることを確認した。circPDAC RNA はリンパ節転移を有する症例で有意に高発現し、膵癌の病期が進行するほど circPDAC RNA を高発現する症例の割合が多くなる傾向を認めた。また、種々の細胞株を用いた定量 RT-PCR および大腸癌・乳癌・前立腺癌組織に対する RNA in situ hybridization によって、膵癌のみならず他臓器癌でも circPDAC RNA が発現している可能性が示唆された。
4. circPDAC RNA 発現コンストラクトを作成し、膵癌細胞株 BxPC-3 に circPDAC RNA を強制発現させたところ、細胞増殖は抑制された。circPDAC RNA が miRNA sponge として機能しているか検証するために、circPDAC RNA と miRNA の結合部位を検索したが、miRNA 結合部位は各 miRNA につきせいぜい 1 箇所しか認めず、circPDAC RNA が miRNA sponge として機能する可能性は低いことが示唆された。circPDAC RNA がタンパク翻訳のテンプレートとして機能しているか検証するために、circPDAC RNA の配列に存在する open reading frame から産生が予測されるペプチドに対する抗体を作成し、circPDAC RNA 強制発現細胞を用いて ELISA、免疫細胞染色、western blotting を行ったが、ペプチドの産生は認めなかった。
5. 前増幅を併用した droplet digital PCR 法による血清 circPDAC RNA 測定を行い、膵癌患者 20 例中 9 例、健常コントロール 20 例中 2 例で circPDAC RNA は陽性であった。血清 circPDAC RNA 測定による膵癌診断能は、感度 0.45、特異度 0.90 であった。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。

以上、本論文は膵癌と正常膵組織における circRNA の網羅的な発現解析により膵癌で高発現する新規 circRNA を同定し、この新規 circRNA が膵癌および IPMN の新たな診断バイオマーカーとして応用できる可能性を示した。よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。