

安積遵哉 学位論文審査要旨

主 査 岡 田 太
副主査 藤 原 義 之
同 汐 田 剛 史

主論文

miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression

(miR-181aはRASSF1の発現抑制を介して肝細胞癌細胞のソラフェニブ抵抗性を誘導する)

(著者：安積遵哉、坪田智明、坂部友彦、汐田剛史)

平成28年 Cancer Science 107巻 1256頁～1262頁

参考論文

1. Prognostic relevance of miR-137 in patients with hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌患者におけるmiR-137の予後の関連性)

(著者：坂部友彦、安積遵哉、梅北善久、鳥口寛、波多野悦朗、廣岡保明、汐田剛史)

平成29年 Liver International 37巻 271頁～279頁

学 位 論 文 要 旨

miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression

(miR-181aはRASSF1の発現抑制を介して肝細胞癌細胞のソラフェニブ抵抗性を誘導する)

ソラフェニブはMAPK経路にあるc-Rafを阻害することによって癌細胞の増殖を抑制し、さらに、vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2)、platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) を阻害することによって血管新生を抑制する。ソラフェニブはSHARP第III相試験において、進行性肝細胞癌の患者生存期間を7.9ヶ月から10.7ヶ月に延長したが、治療効果として十分に満足いくものとは言えない。また、長期間のソラフェニブ投与はソラフェニブに対する抵抗性獲得につながるという報告もある。以上より、ソラフェニブ感受性規定因子の探索は有用であると考えられる。本研究では、ヒト肝癌細胞株HepG2、Hep3Bにおけるソラフェニブ感受性の相違点ならびにmiR-181aの発現を検討し、ソラフェニブ抵抗性の分子機序を解析した。

方 法

ヒト肝癌細胞株HepG2およびHep3Bにおけるソラフェニブ感受性の違いを、WSTアッセイ、ヘキスト染色、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー解析により検討した。また、miR-181a発現をリアルタイムRT-PCR法によって検討した。pre-miR-181aおよびanti-miR-181aを用いて、miR-181aを過剰発現あるいは発現抑制した際のソラフェニブ感受性をWSTアッセイ、ヘキスト染色により検討した。MAPK経路・アポトーシス関連遺伝子に着目し、MiRandaを用いてデータベース解析を行った。miR-181aによる標的遺伝子の直接制御について、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に標的遺伝子の3' UTR配列を組み込んだプラスミドを構築し、ルシフェラーゼレポーターアッセイによってmiR-181aがRASSF1を標的遺伝子としていることを検討した。また、siRNAを用いてRASSF1を発現抑制した際のソラフェニブの感受性の変動をWSTアッセイによって検討した。

結 果

WSTアッセイにより、HepG2細胞はHep3B細胞に比べソラフェニブ感受性が高いことが示された。ソラフェニブ処理後のヘキスト染色により、HepG2細胞はHep3B細胞より多くアポト

ーシスが引き起こされていた。この際、フローサイトメトリー解析により、HepG2細胞においてSubG1期の増加を確認した。ウエスタンブロット法により、ソラフェニブ処理によるHepG2細胞でPUMAの発現の増加、caspase-3、PARPの活性化を認めた。また、ソラフェニブ感受性の高いHepG2細胞はHep3B細胞に比べmiR-181aの発現が低いことが示された。さらに、HepG2細胞でmiR-181aを過剰発現させるとソラフェニブ抵抗性が増加し、逆に、Hep3B細胞でmiR-181a発現を抑制することによりソラフェニブ感受性が増加することが示された。MAPK経路・アポトーシス関連遺伝子に着目してmiRandaデータベース解析を行い、miR-181aの標的遺伝子候補としてRASSF1が得られた。miR-181aによるRASSF1遺伝子の直接制御の確認をルシフェラーゼによるレポーターアッセイにより行った。miR-181aの発現の抑制によりRASSF1の発現が増加し、miR-181aの過剰発現によりRASSF1の発現が抑制された。さらに、RASSF1の発現抑制によりソラフェニブ感受性が減弱することを示した。

考 察

HepG2細胞はHep3B細胞に比較し、高いソラフェニブへの感受性を示した。その機序として、ソラフェニブはHepG2細胞のアポトーシスを誘導することを示した。さらに、miR-181aの過剰発現によりソラフェニブ感受性が減弱するため、ソラフェニブへの感受性にmiR-181aが関与することが示唆された。miR-181aはRASSF1を標的としており、RASSF1の発現を抑制することによってソラフェニブ感受性が低下することを示した。RASSF1はtumor suppressorとして機能し、PUMAの発現を誘導することによってアポトーシスシグナルを活性化させる。ソラフェニブはRafを阻害し、そのリン酸化に伴うMAPK経路の活性化を抑制し、細胞増殖を抑制する作用を有する。一方、RafはRASSF1の下流にあるMST2に結合することによりRASSF1の経路を阻害する作用もある。以上より、ソラフェニブによるRafの阻害は細胞増殖を抑制するだけでなく、アポトーシス経路に促進的に作用すると考えられる。miR-181aは、RASSF1の発現抑制を介して肝癌細胞のソラフェニブ抵抗性を誘導すると考えられる。

結 論

miR-181aは、RASSF1発現抑制を介して肝癌細胞のソラフェニブ抵抗性を誘導することが示唆された。