

令和 5 年 9 月

坂口弘美 学位論文審査要旨

主 査 磯本 一
副主査 藤井 進也
同 吉田 賢史

主論文

NEAT1 confers radioresistance to hepatocellular carcinoma cells by inducing autophagy through GABARAP

(肝細胞癌におけるNEAT1のGABARAPを介したオートファジーによる放射線抵抗性の誘導メカニズム)

(著者：坂口弘美、土谷博之、北川寛、谷野朋彦、吉田賢史、内田伸恵、汐田剛史)

令和4年 International journal of molecular sciences 23巻 711

参考論文

1. NEAT1 confers radioresistance to hepatocellular carcinoma cells by inducing PINK1/parkin-mediated mitophagy

(肝細胞癌におけるPINK1/parkinを介したマイトファジーによるNEAT1の放射線抵抗性の誘導メカニズム)

(著者：土谷博之、篠永りりこ、坂口弘美、北川寛、吉田賢史、汐田剛史)

令和4年 International journal of molecular sciences 23巻 14397

学位論文要旨

NEAT1 confers radioresistance to hepatocellular carcinoma cells by inducing autophagy through GABARAP

(肝細胞癌におけるNEAT1のGABARAPを介したオートファジーによる放射線抵抗性の誘導メカニズム)

放射線抵抗性の要因に癌幹細胞の存在が挙げられる。今回我々は肝細胞癌(HCC)における癌幹細胞性を制御する因子として、長鎖非コードRNAの一種であるnuclear enriched abundant transcript 1 (NEAT1)に注目し、このNEAT1が放射線抵抗性にどのように関与しているかを検討した。

方法

ヒト肝細胞癌細胞株(HuH7, HLF, HuH6)を使用した。NEAT1ノックアウト(NEAT1-KO)細胞は、CRISPR-Cas9システムにより作製した。遺伝子のノックダウンはshort hairpin RNA発現アデノウイルスベクターを用いて行った。NEAT1過剰発現HCC細胞株は、NEAT1発現ベクターの安定導入により作製した。細胞の放射線処理はX線照射装置(MX-160Labo, mediXtec Japan)を使用した。放射線感受性はコロニー形成アッセイにより評価した。遺伝子発現は定量的逆転写PCRおよびウェスタンブロットにより測定した。

結果

HLFおよびHuH6にX線を照射し、放射線感受性をコロニー形成アッセイで評価した結果、NEAT1のノックダウンにより放射線感受性が亢進した。照射後のautophagy fluxを調べると、オートファジーが抑制されていた。HuH7から作製したNEAT1-KO細胞でもオートファジーが抑制され、NEAT1の過剰発現により亢進した。HLFおよびHuH6においても、NEAT1のノックダウンによって放射線によるオートファジー抑制が増強された。これに対しHLFおよびHuH6でNEAT1 variant 1 (NEAT1v1)を過剰発現させたところ、オートファジーが亢進し放射線感受性が低下した。このときHuH7のNEAT1-KO細胞で発現低下していたオートファジー関連因子として γ -aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAP)が同定された。GABARAPの発現は、HLFやHuH6においても、NEAT1のノックダウンにより発現低下し、NEAT1v1の過剰発現により上昇していた。そこでNEAT1v1過剰発現細胞において

GABARAPをノックダウンした結果、オートファジーが抑制され、放射線感受性が亢進した。

考 察

本研究において、NEAT1v1がHCC細胞の放射線抵抗性を誘導する長鎖非コードRNAであることが示された。さらにそのメカニズムにおいて、NEAT1v1によって発現誘導されたGABARAPによるオートファジー促進作用が関与していることを明らかにした。

オートファジーは正常細胞において初期の発癌過程に対し抑制作用を持つ一方、癌細胞では腫瘍の成長や悪性化、治療抵抗性に関与していることが示唆されている。本研究でもGABARAPの発現が全生存率の低下と関連することが示され、GABARAPによって誘導されるオートファジーは、HCCにおいて悪性化を促進する要因であることが示唆された。

本研究から放射線により損傷を受けた細胞内小器官の、オートファジーを介した分解・再生がHCCの放射線抵抗性メカニズムの一つである可能性が示唆され、このメカニズムの一因がNEAT1およびGABARAPであることが示された。そのため、NEAT1v1やGABARAPの抑制によりHCCに対する放射線療法の治療効果の改善が期待できる。しかしこれとは逆に、放射線により誘導されたオートファジーが細胞死を誘導し放射線感受性を亢進させる報告もあり、更なる検討が必要である。

また、オートファジーは癌幹細胞の増殖や癌幹細胞性の維持に必要な機能であり、癌幹細胞のオートファジー依存性は正常幹細胞よりも強いことが示唆されていることから、NEAT1v1によるGABARAPを介したオートファジー誘導は、癌幹細胞性維持の一つのメカニズムである可能性が考えられる。

結 論

NEAT1はGABARAPを介してオートファジーを促進することにより、HCCの放射線抵抗性を誘導していることが示唆された。そのためNEAT1を標的とすることで、放射線治療成績の改善が期待できる可能性がある。