

学 位 論 文 要 旨

氏 名 行本 敦

論 文 名 長鎖ノンコーディング RNA である RMRP は PERK により抑制され肝細胞
がんにアポトーシスを誘導する

学位論文要旨

[背景と目的]

小胞体ストレスは、炎症、細胞の変性に関与し、発がんおよびがん進展にも重要な役割を担う。PKR like endoplasmic reticulum kinase (PERK) は、小胞体ストレスの主要分子であり、小胞体ストレスにより活性化する。また、PERK の下流に eIF2 α があり、同じく下流に eIF2 α を持つ PERK は肝がん細胞において高発現し、腫瘍増殖を促してがん促進に作用する。一方、小胞体ストレスは細胞にアポトーシスを誘導するが、肝細胞がんにおける PERK のアポトーシス誘導機序についてはこれまでの既知の蛋白との関係のみでは十分に解明されていない。PERK により影響を受けるノンコーディング RNA をはじめとする細胞内分子を同定するとともに、その役割を明らかにすることで、PERK の肝細胞がんへの関与、PERK および小胞体ストレスのがん進展への影響を解明できる可能性がある。肝細胞がんにおいて PERK に影響される新規の細胞内分子を同定するとともに、同分子のがん進展における役割について検討することを研究の目的とした。

[材料と方法]

1. 肝がん細胞株である Huh7、HLE に、合成した PERK siRNA をトランスフェクションし、PERK の発現をノックダウンした。トランスクリプトーム解析を用いて、コントロール群と PERK ノックダウン群を比較し、発現変化のある分子を同定した。
2. PERK 発現 plasmid を複数の肝がん細胞株にトランスフェクションし PERK を発現させ、同定した細胞内分子の発現変化を real-time RT-PCR 法、Northern blotting 法で解析した。
3. 肝がん細胞株に Tunicamycin を用いて小胞体ストレスを誘導し、同定した分子の発現変化を real-time RT-PCR 法、Northern blotting 法で解析した。

4. 同定した分子の siRNA を作成しノックダウン効果を確認した。同分子のノックダウンによるアポトーシス誘導の変化を、フローサイトメトリー法、TUNEL 法を用いて解析した。
5. さらに、アポトーシス経路における作用機序を明らかにするために、アポトーシス関連分子の変化を Western blotting 法、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。
6. 肝細胞がん患者より採取した臨床検体を用いて、real-time RT-PCR 法により肝細胞がん組織中の PERK と同定した分子の発現量を定量し、PERK との関連を検討した。同研究は愛媛大学医学部の臨床研究倫理委員会によって承認されている(承認番号 1411010)。

[結果と考察]

肝がん細胞株における PERK のノックダウンを real-time RT-PCR 法、Western blotting で確認した。トランスクリプトーム解析で PERK をノックダウンした際に最も発現が増加する分子として長鎖ノンコーディング RNA である RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP) を同定した。また、PERK 発現 plasmid により PERK を高発現したところ、RMRP の発現は低下していた。肝がん細胞株において Tunicamycin により小胞体ストレスを負荷すると、PERK の mRNA 発現、PERK 蛋白発現は増加し、RMRP の発現は低下した。これにより RMRP は細胞への小胞体ストレスにより PERK の高発現を介して抑制されることが示唆された。

次に、RMRP siRNA を用いた RMRP のノックダウンを行った結果、肝がん細胞株のアポトーシス誘導がみられた。同時に Western blotting 法において Bcl-2 の発現低下、cleaved カスパーゼ 3 の増加がみられた。また、ルシフェラーゼアッセイではカスパーゼ 3、カスパーゼ 9 の活性増加がみられた。一方でカスパーゼ 8 活性に有意な差はみられなかった。PERK の高発現による RMRP の発現低下は内因性経路を介してアポトーシスを誘導した。さらに肝細胞がん患者の組織検体においても肝がん細胞株の結果と同様に、PERK と RMRP の発現量には逆相関がみられた。

これらの結果から、小胞体ストレスで誘導される PERK を介した内因性アポトーシス経路において、長鎖ノンコーディング RNA である RMRP は key molecule であり、肝細胞がんおよびその増殖の制御に関わることが示された。

[結論]

肝細胞がんにおいて、長鎖ノンコーディング RNA である RMRP が PERK により抑制され、Bcl-2 を介した内因性経路により、アポトーシスを誘導することを明らかにした。同定した RMRP は、肝細胞がんにおける新たな治療標的となる可能性がある。

キーワード (3~5)

肝細胞がん 小胞体ストレス PERK RMRP アポトーシス