

学位論文審査結果の要旨

氏名	行本 敦
審査委員	主 査 今村 健志
	副 査 高田 泰次
	副 査 青戸 守
	副 査 藤岡 徹
	副 査 武森 信暁

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のアポトーシスを誘導する

審査結果の要旨

小胞体ストレスの主要分子である PKR like endoplasmic reticulum kinase (PERK) の肝細胞がんのアポトーシスへの関与およびその分子メカニズムを明らかにし、新たな肝がん治療標的候補を見出すために研究を行なった。

具体的には、2種類の肝がん細胞株 Huh7 と HLE を用いて、PERK siRNA トランスフェクションによる loss-of-function 実験と PERK 発現 plasmid トランスフェクションによる gain-of-function 実験を行い、その表現型を、real-time RT-PCR 法、Northern blotting 法、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー法、TUNEL 法、ルシフェラーゼアッセイにより生化学的、分子生物学的、組織化学的に解析した。PERK 発現をノックダウンした細胞においては、トランスクリプトーム解析を用いて発現変化のある分子のスクリーニング・同定し、同定した分子の機能解析を行なった。

まず、トランスクリプトーム解析を用いて、PERK ノックダウンで発現が変動する分子をスクリーニングし、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 の1種である RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP) を同定した。PERK 発

現 plasmid を用いた gain-of-function 実験により PERK を細胞で強制発現すると RMRP の発現は低下した。

次に、小胞体ストレスと PERK/ RMRP の関係を明らかにするために、肝がん細胞株において Tunicamycin により小胞体ストレスを誘導すると、PERK の発現が mRNA およびタンパク質レベルで増加し、RMRP の発現は低下した。よって肝がん細胞株においては、小胞体ストレスによって PERK 発現上昇を介して RMRP 発現が抑制されることが示唆された。

さらに、RMRP siRNA を用いた RMRP のノックダウンによって、肝がん細胞株のアポトーシス誘導が認められた。その時に、Bcl-2 の発現低下、cleaved カスパーゼ 3 の増加がウエスタンブロット法で確認された。また、カスパーゼ 3 とカスパーゼ 9 の活性増加がルシフェラーゼアッセイで確認された。一方、カスパーゼ 8 活性には有意な変化は認められなかった。加えて、PERK の高発現によって RMRP の発現低下が起こり、内因性経路を介してアポトーシスを誘導した。

臨床検体による解析では、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。

本研究は、肝細胞がんにおいて、小胞体ストレスの主要分子 PERK が、長鎖ノンコーディング RNA である RMRP を抑制し、Bcl-2 を介したアポトーシスを誘導することを明らかにし、RMRP を標的にした治療薬が肝細胞がんの新たな治療戦略となりうる可能性を初めて明らかにしたものであり、明瞭な結果と十分な考察が提示されている。

公開審査会は、令和 3 年 8 月 5 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の質問がなされた。

- 1) 実験に使用した 2 種類の肝がん細胞株の分化度などの特徴について
- 2) 正常細胞や肝がん以外のがん種の細胞株での PERK/RMRP の機能について
- 3) PERK の発現上昇の分子メカニズムについて
- 4) PERK 以外の ER ストレス分子と RMRP との関係について
- 5) PERK/RMRP のターゲット、上流・下流の分子について
- 6) eIF2 α の上流における PERK と PKR の関係について
- 7) PERK/ RMRP からアポトーシス経路とオートファジーとの関連について
- 8) 臨床検体におけるがんの性質、再発・転移と PERK/ RMRP との関係について
- 9) 臨床検体の検体数や統計学的処理について
- 10) 治療を考えた場合の薬剤の DDS について

以上、実験方法、分子の機能から臨床応用に関してまで幅広く多くの質問に対し、申請者は日本語で的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。