

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 号	氏 名	麻田 貴志
<p>[論文題名]</p> <p>Integrin α6A (ITGA6A)-type Splice Variant in Extracellular Vesicles Has a Potential as a Novel Marker of the Early Recurrence of Pancreatic Cancer</p> <p>[細胞外小胞におけるインテグリン α 6A (ITGA6A) 型スプライスバリエントは、膵臓癌の早期再発の新規マーカーとしての可能性を有する]</p> <p>Anticancer Research, Accepted March 2, 2022, 13 pages</p>			
<p>[要 旨]</p> <p>膵癌（膵管癌：PDAC）は予後不良の疾患である。世界の年間死亡者数で男性で 5 位、女性で 4 位に位置しており、PDAC の患者数はさらに増加している。PDAC は臨床症状が乏しいために診断が遅れる傾向があり、遠隔転移や局所進行の診断がついた時には切除不能である症例が多い。したがって、治癒的切除は症例の約 35%にしか期待できず、5 年生存率は 2%~9%と低いため、患者の予後転帰の点においてすべてのがん部位の中で最下位にランクされている。</p> <p>このように早期診断の難しさから、本研究の目的は PDAC の新規および転移再発の早期診断につながるバイオマーカーを細胞外小胞 (EV) から単離同定することであった。我々は膵臓癌細胞株 (PK- 1) の培養上清中から EV を回収し、二次元電気泳動法 (2D- PAGE) により EV 中に含まれるタンパク質を単離した。タンパク質同定は、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 分析により行った。同定されたタンパク質を分類し、マウス膵臓癌 PAN02 細胞由来の EV について以前に報告された結果と比較し、PDAC 細胞株および患者由来 PDAC 組織を用いてそれらの発現特異性を調べた。また、PDAC 患者の手術後の血中 EV 中のバイオマーカーの変化に基づいて、選択したバイオマーカーの有意性を調べた。</p> <p>質量分析により膵臓癌細胞株 (PK- 1) の培養上清中の EV に含まれる 163 個のタンパク質を同定した。この中には 34 個の膜タンパク質を含んでおり、その中から PANC02 細胞株と PK-1 細胞株の双方の EV に見出されたインテグリン α 6 (ITGA6) に着目した。以前の研究で、ITGA6 の高発現が PDAC 患者の予後不良、浸潤、転移と関連していることが報告されている。</p> <p>さらに、ITGA6 には選択的スプライシングにより形成される異性体が存在するが、こ</p>			

のうち2つのPDAC細胞株由来のEVに含有される異性体はITGA6A スプライスバリエントであった。このことから、PDAC細胞では選択的スプライシングによりITGA6Aの発現が誘導されていると予想した。

この仮説を実証するため、まず正常膵臓組織を対象にRT-PCRを実施し、正常な膵臓細胞が2つの形態のITGA6、すなわちITGA6AとITGA6BのmRNAを発現することを見出した。そこで、PDAC細胞におけるITGA6 mRNAの発現を調べるため手術の際に採取した正常膵臓組織とPDAC組織を用いて半定量的RT-PCR解析を実施した。興味深いことに正常な膵臓組織においてはITGA6B mRNAはITGA6A mRNAよりも高発現していたが、PDAC組織においてITGA6A mRNAの発現はITGA6B mRNAの発現よりも有意に高かった。続いて6つのPDAC細胞株(PK-1、PK-8、PK-45P、KLM-1、SUIT-2、およびPanc-1)におけるITGA6の発現形態を同様に確認したところ、ITGA6A mRNAはすべてのPDAC細胞株において有意に発現していた。

次に、ウェスタンブロット解析を用いて6つのPDAC細胞株由来の全細胞溶解物および培養上清中のEVにおけるITGA6タンパク質の発現を調べた。その結果、6つのPDAC細胞株すべてからの細胞溶解物において、ITGA6Aの発現量はITGA6Bのそれよりも高かった。さらに、EVに含まれるITGA6Aは高発現していた。これらの結果より、PDAC細胞においてITGA6Aの発現が誘導されていると考えられた。そして、血液中のEVに含まれるITGA6AがPDAC患者の潜在的なバイオマーカーとして使用され得ると考えた。

そこで、PDAC患者3人の血漿EVと販売されている数十人の健康なボランティアから分離されたEVの混合物を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、ITGA6Bは主に健康なボランティアの混合EVから、ITGA6Aは主にPDAC患者の血漿EVから検出された。続いて切除術前後のPDAC患者2名の血液試料からのEVにおけるITGA6の発現パターンを時系列に沿って調べたところ、EVにおけるITGA6Aの発現は手術後に有意に減少し、臨床的再発を確定する数ヶ月前に増加した。さらに、EVにおけるITGA6Aの発現増加は、CA19-9の発現よりもはるかに早く起こった。

以上の結果より、PDAC患者における血中EVにおけるITGA6A発現量の定量は、PDAC再発の早期診断に有用な血液マーカーとなり得ると考えられた。

備考 論文要旨は、和文にあつては2,000字程度、英文にあつては1,200語程度