

京都大学	博士（医学）	氏名	増尾 謙志
論文題目	SNAIL2 contributes to tumorigenicity and chemotherapy resistance in pancreatic cancer by regulating IGFBP2 (SNAIL2はIGFBP2の制御によって膵癌の腫瘍形成と化学療法抵抗性に寄与する)		
(論文内容の要旨) 膵癌は予後不良であり、その原因とされる高い腫瘍形成能や治療抵抗性には癌幹細胞(Cancer stem cell: CSC)の関与が考えられている。一部の癌種ではCSCの制御において上皮間葉転換誘導転写因子(epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors: EMT-TFs)が寄与していると報告されているが、膵癌については十分に解明されていない。 本研究では、まずヒト膵癌培養細胞株11種におけるEMT-TFsの発現レベルを定量的RT-PCR法にて解析した結果、C2H2型ジンクフィンガー転写因子でSNAILスーパーファミリーの1つであるSNAIL2が最も高発現していることが判明した。そこで、SNAIL2の膵癌CSCに対する役割を明らかにすることを本研究の目的とした。 上記の膵癌細胞株の中からスフィア形成アッセイと免疫不全マウスを用いた皮下移植アッセイで腫瘍形成能を有する細胞株を複数種類同定し、その中からKLM1とKMP5を用いることとした。SNAIL2を標的とするshort hairpin RNA (shRNA)の遺伝子導入によってノックダウンした安定クローン(以下shSNAI2)を作成したところ、上記2つのアッセイでいずれも腫瘍形成能が低下することが示された。また、shSNAI2ではflow cytometry解析でCD44(膵癌におけるCSC表面マーカー)陽性の分画が減少しており、加えて細胞増殖アッセイではgemcitabineに対する感受性が上昇していることも明らかになった。さらに、外科的に切除されたヒト膵癌組織から樹立した腫瘍スフェロイド(以下Sph)を用いてshSNAI2を作成して評価したところKLM1、KMP5と同様の結果が認められた。 そのメカニズムを探るためにKLM1とSphを用いてSNAIL2ノックダウン有無による遺伝子発現変化のマイクロアレイ解析を行ったところ、両検体共にshSNAI2ではEMTと幹細胞分化に関わる遺伝子発現が有意に減少していた。さらにinsulin-like growth factor binding protein (IGFBP)に関連する遺伝子発現が大きく変化していることを見出し、そのファミリーの中でIGFBP2の発現が最も減少していた。 そこでIGFBP2に着目して解析をすすめた。KLM1を用いたスフィア形成アッセイで抗IGFBP2中和抗体を添加したところ、腫瘍形成能の低下を認めた。次に、SNAIL2とIGFBP2の相関を評価するためshSNAI2に対してSNAIL2とIGFBP2の全長cDNA plasmidをそれぞれ遺伝子導入してCSCの性質が回復するか検討した。SNAIL2またはIGFBP2の強制発現によって、いずれも腫瘍形成能およびgemcitabineに対する治療抵抗性が回復することが明らかになった。このとき、SNAIL2の強制発現によってIGFBP2発現の上昇を認めたが、一方でIGFBP2の強制発現ではSNAIL2発現に変化はなかった。転写因子の機能解析ツールによる検討でIGFBP2遺伝子のプロモーター領域に2か所のSNAIL2結合候補部位が同定され、IGFBP2の発現を直接制御していることが示唆された。すなわち、IGFBP2はSNAIL2によって制御される下流標的でありIGFBP2は新たな治療標的となる可能性が示唆された。 以上の結果から、本研究によりSNAIL2はIGFBP2の制御によって膵癌の腫瘍形成能および化学療法抵抗性に寄与することが明らかになった。			

(論文審査の結果の要旨)

膵癌は予後不良な疾患であり、原因として癌幹細胞(Cancer stem cell: CSC)の性質である腫瘍形成能や治療抵抗性が関与すると考えられている。これらCSCの性質には上皮間葉転換誘導転写因子(EMT-TFs)が寄与していることが報告されており、本研究では膵癌の腫瘍形成能や治療抵抗性とEMT-TFsの1つであるSNAIL2との関わりを検討した。

まずRNA干渉を用いたSNAIL2ノックダウンにより、KLM-1およびKMP5の2つの膵癌細胞株において、*in vitro*(スフィア形成アッセイ)および*in vivo*(免疫不全マウス皮下移植アッセイ)で腫瘍形成能が低下することを明らかにした。また、gemcitabineに対する感受性が上昇し、膵癌のCSCマーカーであるCD44の発現が減少することを示した。さらに、外科切除した膵癌から樹立したオルガノイドを用いた実験でも同様の結果が得られた。マイクロアレイ解析を行ったところ、SNAIL2ノックダウンによりInsulin-like growth factor binding protein(IGFBP)に関連する遺伝子群の発現が変化しており、特にIGFBP2の発現が減少していた。また、抗IGFBP2中和抗体によって*in vitro*で腫瘍形成能の低下を認めた。さらに、SNAIL2ノックダウン下でのSNAIL2またはIGFBP2の強制発現によって、*in vitro*と*in vivo*での腫瘍形成能およびgemcitabineに対する治療抵抗性の回復を認めた。

本研究は、SNAIL2が下流標的遺伝子であるIGFBP2を通じて膵癌の腫瘍形成能および化学療法抵抗性に関与していることを示したもので、膵癌の新たな治療法開発に寄与する可能性がある。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和4年6月23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降