

## 論 文 要 旨

**Tumor suppressive *microRNA-1285* regulates novel molecular targets:  
Aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma**

癌抑制型 miR-1285 による新しい標的遺伝子の制御

: 腎細胞癌における発現変化とその機能的重要性

日高 英雄

## 【序論および目的】

microRNA (miRNA)は非翻訳領域にコードされる 22 塩基ほどの短い RNA で、タンパクをコードする messengerRNA の分解や翻訳阻害により遺伝子の制御を行っている。miRNA の発現異常は、癌の発生や進展さらには転移に関わることが明らかとなってきている。我々は、腎細胞癌臨床検体の miRNA 発現プロファイルを作成し、癌抑制的機能を有する miRNA の探索を行った。さらに癌抑制的 miRNA の標的遺伝子を同定し、腎細胞癌における新しい分子メカニズムの解明を試みた。

## 【材料および方法】

腎細胞癌臨床検体(正常 5 例、腎細胞癌 10 例)を用いて 667 種類の miRNA について発現解析を施行し、miRNA 発現プロファイルを作成した。発現低下を認めた上位 20 種類の miRNA について、腎癌細胞株に成熟型 miRNA を導入し細胞増殖抑制能の検討を行った。癌抑制的 miRNA の標的遺伝子を探索するため、候補 miRNA のトランスフェクタントを用いてオリゴマイクロアレイ解析を行った。標的遺伝子と候補 miRNA の結合を検証するためルシフェラーゼアッセイを行った。標的遺伝子のノックダウンによる機能解析を行い、増殖、遊走、浸潤能の変化を評価した。さらに、免疫組織学的染色を行い標的遺伝子の臨床検体における発現を評価した。

## 【結 果】

癌部で発現が低下していた上位 20 種類の miRNA について、細胞増殖抑制能を調べた結果、microRNA-1285(miR-1285)が最も顕著に癌細胞の増殖を抑制した。更に、miR-1285 を導入することにより、遊走能、浸潤能が有意に抑制された。miR-1285 のトランスフェクタントで発現低下を認めた標的遺伝子群から、Transglutaminase 2 (TGM2) を見出した。ルシフェラーゼアッセイから、miR-1285 は直接 TGM2 に結合し、発現を制御していることが判明した。TGM2 をノックダウンした機能解析では細胞の増殖、遊走、浸潤能が有意に低下し、TGM2 は癌遺伝子の機

能を有することが判明した。TGM2 の免疫組織学的染色では正常腎細胞に比べて腎細胞癌でその発現が有意に亢進していることが確認された。

【結論及び考察】

腎細胞癌における miRNA 発現プロファイルから、癌抑制的に働く miR-1285 を見いだした。またその標的遺伝子で癌遺伝子的作用を有する TGM2 を同定した。本研究から、癌抑制型 miR-1285 を基点とする腎癌細胞における新規分子ネットワークの一端が明らかとなった。

(Oncotarget 2012 Jan;3(1):44-57 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 226 号	学位申請者	日高 英雄
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	谷本 昭英	副査 武田 泰生
	副査	米澤 傑	副査 原口 みさ子

Tumor suppressive *microRNA-1285* regulates novel molecular targets: Aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma

(癌抑制型 *miR-1285* による新しい標的遺伝子の制御：腎細胞癌における発現変化とその機能的重要性)

MicroRNA (miRNA)は長さ約 22 塩基の小さな non-coding RNA であり、ターゲットの mRNA に配列特異的に結合し、分解や翻訳阻害により発現を抑制する。最近、学位申請者らは腎細胞癌における microRNA の発現プロファイルを報告した。今回、腎細胞癌で発現低下を認めた上位 20 個の miRNA について、それぞれ腎細胞癌株にトランスフェクションし細胞増殖抑制能の検討を行った。最も抑制能の強かった microRNA-1285 (miR-1285)に注目し、oligo microarray を行いその標的遺伝子として Transglutaminase2 (TGM2) を同定した。miR-1285 と TGM2 の 3' 非翻訳領域との結合は luciferase reporter assay にて確認した。miR-1285 および TGM2 の機能解析として、腎細胞癌株のトランスフェクタントを作成して XTT assay、wound healing assay、cell invasion assay を行った。また正常腎 10 検体、腎細胞癌 70 検体において TGM2 の発現を免疫染色で評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 腎細胞癌における新規の癌抑制型 miRNA の候補として miR-1285 が探索された。
- 2) Oligo microarray では miR-1285 トランスフェクタントにおいて TGM2 は発現が低下した遺伝子であった。
- 3) Luciferase reporter assay では miR-1285 は TGM2 の予測結合部位に結合し、それぞれの luciferase 活性は著明に減少した。
- 4) 腎細胞癌株の増殖、遊走、浸潤能は miR-1285 トランスフェクタントおよび si-TGM2 トランスフェクタントにおいて有意に抑制された。
- 5) 臨床検体による免疫染色では TGM2 の発現は正常腎臓と比べ腎細胞癌において有意に上昇を認めた。

腎細胞癌において、miR-1285 は直接 TGM2 遺伝子を制御し、癌抑制的作用を有する可能性が示唆された。この経路は腎細胞癌の進展において重要な役割を持ち、腎細胞癌の新たな治療のターゲットやバイオマーカーとなる可能性を示唆するものと思われた。本研究は、腎細胞癌における癌抑制型 miRNA の発現と標的遺伝子 TGM2 の関連と機能を検討したものであり、TGM2 の発現は腎細胞癌で有意に亢進し、癌遺伝子機能を有することが示された。また、TGM2 が癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を促進し、さらにその働きは miR-1285 で制御されることを示した点では今後臨床応用への期待もあり非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 226 号		学位申請者	日高 英雄
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	谷本 昭英	副査	武田 泰生
	副査	米澤 傑	副査	原口 みさ子

主査および副査の5名は、平成24年12月19日、学位申請者 日高 英雄 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) miR-1285 を研究対象に選んだ理由はなにか。

(回答) 4つの細胞株に対する細胞増殖抑制能の平均を求め、最も抑制能の強かった miR-1285 を選択した。

質問2) miR-1285 選択の段階で、cell growth 以外に、migration や invasion を評価した miRNA はあるか。

(回答) 今回、miR-1285 のみを解析したが、今後、他の miRNA についても評価する予定である。

質問3) Table 2 において miR-1285 のターゲットサイトを持つ遺伝子はいくつかあるが、TGM2 を選んだ理由は何か。

(回答) ターゲットサイトをもつ遺伝子群について臨床組織検体で mRNA の発現を検証し、癌組織で唯一、有意な発現亢進を認めた TGM2 を候補遺伝子とした。

質問4) miRNA-array 解析に用いた臨床検体は様々な grade のものが存在するのに、Figure 6 の免疫染色に用いた検体では Grade 1 しか提示がないが、他の grade のものは染色しなかったのか。

(回答) 全ての grade が含まれている市販の tissue microarray を用いて免疫染色により評価した。Figure 6 は代表的な結果を示したものであり、偶然 Grade 1 のみになった。

質問5) 膵管癌や乳癌で TGM2 発現亢進の報告があるようだが、泌尿器科領域では TGM2 は腎細胞癌に限ったものなのか、あるいは他の癌腫でも報告があるのか。

(回答) 検索しうる限り、TGM2 と腎細胞癌の報告が1報あるのみで、他の泌尿器癌における TGM2 の報告はない。

質問6) miRNA-array 解析に用いた臨床検体の組織型は全て clear cell type であるか。

(回答) 全て clear cell type である。

質問7) 仮に clear cell type でなく他の組織型 (papillary type, chromophobe type, collecting duct carcinoma など) で miRNA-array 解析を行った場合、違う結果が出たと考えるか。

(回答) 組織型が異なれば恐らく違う発現プロファイルになると思われる。今回は、腎細胞癌の中で最も頻度の高い clear cell type に限定して解析を行った。

質問8) ATCC から購入した cell line について、培養状態でも臨床的な clear cell type の特徴はあるのか。具体的には脂肪染色をすると細胞内に脂肪滴が観察されるのかどうか。

(回答) 培養細胞を脂肪染色したことがなく不明であるが、今後、確認したい。

質問9) Array 解析は臨床検体を用い、免疫染色は市販の tissue microarray を使用しているがその理由は何か。

(回答) 作業効率と実験条件の統一を考え、免疫染色は tissue microarray を使用した。今後、院内病理由来のパラフィン切片でも TGM2 の発現を検討したい。

質問10) 免疫染色においては同じ腫瘍内でも部位によって強弱があり、組織内の発現分布が均一でないことがあるが、tissue microarray で、その分布の違いを評価できるのか。

(回答) 御指摘のとおり heterogeneity の問題は、tissue microarray では解決困難と思われる。今後は院内病理由来の whole tissue における TGM2 の免疫染色を検討したい。

質問11) 免疫染色の評価について intensity を4段階で評価しているが、その定義をどのように行ったか。

(回答) まず、それぞれの段階の染色強度を表す共通のテストサンプルを定め、そのイメージを元に、二人の判定者が各検体をみて点数化した。それを複数回行い、誤差の軽減につとめた。

質問12) miRNA-microarray は 778 個の miRNA について検討しているがこれらの miRNA の選択基準は何か。

(回答) 今回、Agilent 社のプラットフォームを使用している。この発売当時に明らかであった miRNA は約 1000 種類であった。また、この製品は2枚のプレートを使用し、1つのプレートには 448 種類の miRNA 搭載が可能で、理論的に

は 896 種類の解析が可能である。778 個の miRNA の選択基準については不明である。

質問 13) miRNA をコードする遺伝子は存在するのか。

(回答) miRNA をコードしている遺伝子はプロセスされた成熟型 miRNA よりはるかに長く、多くの miRNA は pre-RNA ホスト遺伝子のイントロン中に存在し、それらの発現制御要素、一次転写物を共有し、類似した発現様式を持つことが知られている。例えば miR-15, miR-16 が LEU2 遺伝子上に存在することや、miR-21 のプロモーターには、AP-1, PU-1, NF1-B, C/EBP  $\alpha$  の結合領域が同定されている。

質問 14) Pri-microRNA に機能はあるのか。

(回答) Pri-microRNA に機能はないと考えられる。1 本鎖 mature miRNA が RISC 蛋白に取り込まれて初めて機能する。

質問 15) miRNA が mRNA の 3'UTR に結合することで mRNA の発現が低下する、その機序は分かっているのか。

(回答) miRNA は mRNA の 3'UTR に配列特異的に結合し、mRNA の分解や翻訳阻害をおこす。その機序として、RISC 複合体の構成タンパクである Ago1 と、その結合タンパクである GW182 が NOT1 と直接結合することにより、CCR4-CAF1-NOT 複合体を mRNA に呼び込みポリ A 鎖の分解を誘導すると考えられている。ポリ A 鎖の分解により mRNA の不安定化や分解を誘導するとともに、翻訳そのものも抑制するとの研究報告がある。

質問 16) 癌組織で TGM2 の mRNA は高発現しているが、これは miR-1285 の発現が低下することで TGM2 が安定化し発現が亢進していると考えてよいのか。

(回答) 癌組織で miR-1285 の発現が低下すると、TGM2 mRNA のポリ A 鎖の分解が起こらないため、TGM2 mRNA の発現が安定するものと考えられる。

質問 17) miR-1285 の発現と臨床病期分類や悪性度などと相関関係はあるのか。

(回答) 今回の検討では、miR-1285 の発現と臨床病理パラメーターに相関関係は認めなかった。症例数が 36 例と少ないこと、T3 以上の症例が 6 例のみと症例の背景に偏りがあることなどの理由で本来の相関関係を示せなかった可能性がある。

質問 18) TGM2 の発現は乳癌や肺癌などにおいても亢進しているのか。

(回答) 肺癌、乳癌では TGM2 は発現亢進しているとの報告がある。また、肺癌においては TGM2 がシスプラチン耐性のマーカーになり得るとの報告があり、乳癌においては腫瘍の悪性度と正の相関関係があるとの報告がある。

質問 19) miR-1285 のトランスフェクタントにおいて XTT, invasion, migration assay で細胞の viability が低下しているが、apoptosis が誘導されているのか、あるいは増殖が抑制されているだけなのか。

(回答) miR-1285 のトランスフェクタントはプレート上でかなり apoptosis 様の変化を起こしており、実際、A498 細胞を用いた apoptosis assay では apoptosis が誘導されるのを確認している。

質問 20) miR-1285 を治療に用いた場合、正常細胞にどのような影響がでると考えるか。

(回答) 臨床検体を用いた PCR では、正常細胞でも miR-1285 の Ct 値は 28~30 とそれほど発現は高くない。miR-1285 の導入により正常細胞が障害される可能性はあり、具体的には骨髄抑制などの影響が考えられる。miR-1285 を投与した際の正常細胞に与える影響については今後、in vivo での検証が必要であると考えられる。

質問 21) 癌組織において miR-1285 の発現が低下するメカニズムは分かっているのか。

(回答) miRNA の発現量の変化については染色体レベルでの欠失・増幅、プロモーター領域のメチル化、Dicer 等の酵素の異常などが報告されている。miR-1285 は 7q21-q22 に存在するが、我々が以前に行った CGH アレイにてこの領域のゲノムコピー数の減少が観察されている。

質問 22) miR-1285 が p53 を制御するとの報告があるが使われた細胞株は何か。

(回答) Neuroblastoma (SH-SY5Y) と乳癌 (MCF-7) の細胞株である。

質問 23) Protein coding genes の 30% を miRNA が制御するとのことだが、その見積もりはどのようにしているのか。

(回答) miRNA の review (Filipowicz, *et al.* Nat Rev Genet 2008;9:102-114) から引用しているがその算出基準は不明である。

質問 24) TGM2 以外に miR-1285 の下流で動く有力な腫瘍促進性の候補遺伝子があるか。

(回答) Table 2 の遺伝子について PubMed で検索したが、有力な候補遺伝子は見つからなかった。

質問 25) TGM2 の biological な働きは何か分かっているのか。

(回答) TGM2 はタンパク質の架橋反応に関わる酵素であり、生体内に広く分布し生体構造の構築や安定化を行う一方、細胞内シグナル伝達、細胞接着、細胞の分化・増殖、アポトーシスに関与するとされている。

質問 26) 今回の array 解析で p53 は挙がってこなかったのか。

(回答) 今回の解析では p53 は fold change 順で 9460 位と解析対象にならなかった。Neuroblastoma と乳癌の細胞株を用いた実験で miR-1285 が p53 を制御するとの報告があるが、癌腫や細胞株により miRNA の作用は異なる可能性がある。

質問 27) TGM2 は血中や尿中での腫瘍マーカーとして応用できると考えているか。

(回答) 今後、腎細胞癌患者の血中や尿中の TGM2 を ELISA 法で測定し、腫瘍マーカーとしての有用性を検討したい。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。