

## 論 文 要 旨

**Identification of novel microRNA targets based on  
microRNA signatures in bladder cancer**

膀胱癌における microRNA 発現の特徴に基づいた新規  
microRNA ターゲットの同定

一 美 貴 弘

## 【序論および目的】

microRNA は従来 non-coding RNA とされてきた 22 塩基対ほどの小さな RNA で、標的となる mRNA に相補的に結合することで、その切断や翻訳抑制を起こす。我々は膀胱癌で特異的に発現が変動する microRNA のプロファイルを同定するために 156 種類の microRNA のスクリーニングを行った。さらに膀胱癌で発現が低下している microRNA のターゲット遺伝子を調べることにより、癌抑制的機能をもつ新規の遺伝子の探索を試みた。

## 【材料および方法】

2003 年から 2007 年の間に鹿児島大学病院とその関連病院で膀胱全摘術と経尿道的膀胱腫瘍切除術を施行された 104 人の膀胱癌患者から組織検体を得た。この中で、14 の検体をランダムに選択し 156 種類の microRNA のスクリーニングテストを行った。ISOGEN®を用いてヒト組織と膀胱癌細胞 (T24, KK47, BOY) から total RNA を抽出した。相対的 microRNA 発現データは GeneSpring GX version 7.3.1 ソフトウェアを用いて解析した。microRNA 発現データの標準化は global normalization 法と内在性コントロールである actin beta (ACTB)を用いた標準化法の 2 つを用いた。更にリアルタイム RT-PCR 法を用いて膀胱癌組織における microRNA と KRT7 を定量化した。microRNA のターゲットの予測は、我々が以前に行った膀胱癌における mRNA 発現プロファイルに基づき、Web 上のターゲット予測ツール (miRanda) を用いたアルゴリズムにて絞り込みを行った。microRNA のトランスフェクションは pre-microRNA を Lipofectamine RNAiMAX により細胞にトランスフェクション後プレーティングを行った。si-KRT7 の移入を行った後、KK47 細胞株の生存度を企業のプロトコルに従って XTT assay で検証した。ウエスタンブロットはモノクローナルサイトケラチン 7 抗体 (300 倍) と GAPDH 抗体で行った。統計解析は real-time PCR を基にした実験で得られた 2 変数と数値の関係は Mann-Whitney U-test で、microRNA 発現と KRT7 mRNA 発現の関係は Spearman rank correlation で分析した。

## 【結果】

初めに、臨床膀胱癌 14 検体、正常膀胱粘膜 5 検体、3 つの膀胱癌細胞株において 156 種の microRNA のスクリーニングを行ったところ、膀胱癌で有意に発現が変動する 27 の microRNA が global normalization 法で同定された。これらの microRNA の中には膀胱癌で発現が上昇しているものが 8 つ、低下しているものが 19 あった。さらに ACTB による標準化を行ったところ、膀胱癌で有意に発現が低下する 10 の microRNA が同定された。2 つの標準化に共通したのは 7 つの microRNA (miR145, miR30a-3p, miR133a, miR133b, miR195, miR-125, miR199a\*) であった。これら 7 つの microRNA について臨床膀胱癌 104 検体と正常膀胱粘膜 31 検体における発現を検討した結果、膀胱癌では正常膀胱粘膜に比べて、いずれの microRNA の発現も有意に低下していた (miR133b は miR133a と 1 塩基のみが異なるので、これを除いた 6 つの microRNA の発現を測定)。ROC カーブ分析ではこれら 6 つの microRNA の測定は、高い感度、特異度をもって膀胱癌と正常膀胱粘膜を区別することが可能であった。この結果は、もしこれらの microRNA が血清や尿で検出可能であれば、有効な診断的マーカーとなりうる可能性を示唆するものと思われた。

次に独自のアルゴリズムでは、Keratin 7 (KRT7) はこれら 6 つの microRNA に共通のターゲットであることが予測された。KRT7 の mRNA 発現は膀胱癌検体では正常膀胱粘膜に比べて有意に上昇していた。さらに KRT7 の発現と各 microRNA の発現には有意な逆相関が見られた。KRT7 はサイトケラチン gene family のひとつである。免疫染色ではサイトケラチンは上皮性腫瘍のマーカーであるが、癌の進展におけるその役割は良く解っていない。XTT アッセイによる細胞増殖試験では si-RNA で KRT7 をノックアウトした細胞はコントロールと比べて細胞増殖が有意に抑制されていた。さらに各 microRNA を細胞にトランスフェクションすると、miR30a-3p, miR133a, miR195, miR199a\* では細胞増殖が有意に抑制された。KRT7 の mRNA 発現は miR30a-3p, miR133a, そして特に miR199a\* のトランスフェクタントで有意に抑制されていた。ウエスタンブロットでは KRT7 のタンパク発現は 199a\* のトランスフェクタントで著明に抑制されていた。

## 【結論及び考察】

我々の実験において膀胱癌では miR30a-3p, miR133a, miR199a\* は KRT7 の発現抑制を介して、癌抑制的に機能することが示唆された。また KRT7 は癌遺伝子的な作用を有する可能性が示唆された。膀胱癌で特異的に変動する microRNA を探索することにより、新しい癌進展のメカニズムを解明する手がかりになるものと思われた。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 93 号		学位申請者	一美 貴弘
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	米澤 傑	副査	谷本 昭英
	副査	竹内 亨	副査	古川 龍彦

### Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer

(膀胱癌における microRNA 発現の特徴に基づいた新規 microRNA ターゲットの同定)

MicroRNA はタンパクをコードしない 22 塩基対ほどの小さな RNA であり、mRNA の翻訳抑制や分解を通してターゲット遺伝子の発現を抑制する。幾つかの microRNA は癌で異常な発現がみられ、発癌や癌抑制的機能に関わる可能性が示唆される。膀胱癌では特異的に発現する microRNA やそのターゲット遺伝子は十分には解明されていない。今回、申請者らは膀胱癌 (n=14)、正常膀胱粘膜 (n=5)、細胞株 (n=3) を用い、156 種類の microRNA のスクリーニングを行った。さらに、これらの結果を確かめるために膀胱癌 (n=104) と正常膀胱粘膜 (n=31) を用いて real-time RT-PCR-based の実験を行い、以下の知見を明らかにした。

- 1) 膀胱癌において 7 つの microRNA (miR-145, miR-30a3p, miR-133a, miR-133b, miR-195, miR-125b, miR-199a\*) の発現は有意に低下していた。
- 2) これらの microRNA は癌と正常膀胱粘膜を 70%以上の感度と 75%以上の特異度で区別できた。
- 3) 独自に考案したターゲット検索アルゴリズムによってこれら microRNA の共通のターゲット遺伝子の一つに Keratin7 (以下 KRT7) があることを明らかにした。
- 4) KRT7 mRNA の発現は、膀胱癌では正常膀胱粘膜に比べて有意に上昇しており、KRT7 mRNA とこれら microRNA の間には有意な逆相関が認められた。
- 5) 膀胱癌細胞株 KK47 にこれら microRNA をトランスフェクションした結果、KRT7 の発現抑制効果を認めた。  
さらに 3 つの microRNA (miR-30a3p, miR-133a, miR-199a\*) の導入株で細胞増殖の抑制が観察された。また si-KRT7 のトランスフェクションでも細胞増殖の抑制が観察された。

本研究は、膀胱癌において 7 つの microRNA の発現が特異的に低下していることを初めて示し、これらの microRNA が細胞増殖を抑制することを見出した。また、そのターゲットと予測された KRT7 は膀胱癌検出や原発巣の鑑別診断を行うための免疫染色のマーカーとして臨床的に有用であると考えられた。本研究において、KRT7 遺伝子がヒト膀胱癌で癌遺伝子としての機能を持ち、これらの microRNA が癌抑制的な役割を果たす可能性を示した。さらに申請者らが考案した独自のアルゴリズムが KRT7 のような新規のターゲット遺伝子を発見するための新しい方法であることや、これらの microRNA が膀胱癌の新しいバイオマーカーや遺伝子治療に対する有望な候補であることを示した点が非常に興味深い。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 93 号		学位申請者	一美 貴弘
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	米澤 傑	副査	谷本 昭英
	副査	竹内 亨	副査	古川 龍彦
<p>主査および副査の5名は、平成21年12月16日、学位申請者 一美 貴弘 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。</p>				
<p>質問1) keratin7 (KRT7) の免疫染色は行ったか。また KRT7 の発現と癌の stage や grade との相関関係はあったのか。  (回答) KRT7 の免疫染色は行ったが、癌の stage や grade との明らかな相関関係は認めなかった。</p>				
<p>質問2) KRT7 は正常細胞でも染まるのか。  (回答) 抗サイトケラチン7抗体は、正常細胞では重層扁平上皮、肝細胞、大腸上皮、および一部の前立腺上皮で陰性となるが、その他全ての上皮細胞とたまに血管内皮で陽性となる。この抗体により腺細胞のサブグループ分別が可能であるとされる。腫瘍細胞において扁平上皮癌、肝細胞癌、腎癌、前立腺癌、大腸癌などで陰性。胃癌では陽性率は約50%で、それ以外の癌では強陽性となる事が多いとされる。</p>				
<p>質問3) 膀胱癌細胞株 T24、KK47、BOY における KRT7 mRNA の発現量をみているが、KK47 における KRT7 mRNA の発現量が一番高い理由は何か。  (回答) KK47 と T24 は金沢大学と京都大学において樹立された grade I のヒト膀胱癌細胞株であり、BOY は我々の教室で grade III の高浸潤性ヒト膀胱癌から樹立された。よって KRT7 mRNA の発現量と grade や stage には関連はないと思われる。KK47 における KRT7 mRNA の発現量が高い理由については明らかではないが、この細胞は細胞塊となって増殖する (focal growth) 特徴が他の細胞と異なりこの現象に関係している可能性はある。</p>				
<p>質問4) 正常膀胱粘膜と膀胱癌における microRNA の発現量の違いを用いたバイオマーカーなどへの臨床応用は行っているのか。また、その場合、何か一つの microRNA の発現を見ているのか、それとも幾つかの microRNA の発現の組み合わせを調べているのか。  (回答) microRNA は尿中や血清中にも存在することが確認されており、健常人と膀胱癌患者における microRNA の発現量の違いを PCR を用いて検出することは可能である。現在、尿を用いた実験でバイオマーカーへの応用を模索中である。また、感度、特異度を上げるために複数の microRNA の組み合わせを検討している。</p>				
<p>質問5) 膀胱癌細胞株 KK47、T24、BOY における KRT7 mRNA の発現量をみているが、T24、BOY における KRT7 のタンパク発現量は調べたのか。  (回答) 今回の実験ではまず KRT7 mRNA の発現量を測定したが、BOY、T24 に比較して KK47 が一番高かったため、その後のウェスタンブロットを含む実験は KK47 を使用して行われた。よって T24、BOY における KRT7 のタンパク発現量は調べていないが、重要と思われる今後検証したい。</p>				
<p>質問6) microRNA スクリーニングにおいて膀胱癌 104 検体と正常膀胱粘膜 31 検体からランダムに臨床膀胱癌 14 検体、正常膀胱粘膜 5 検体選択したとしてあるが、どのような基準で選択したのか。  (回答) 膀胱癌検体には経尿道的膀胱腫瘍切除術と膀胱全摘除術によって得られたものがあるが、経尿道的膀胱腫瘍切除術から得られる検体量は少ないので抽出可能な RNA は微量である。従ってマイクロアレイに使用するための十分な質と量の RNA を得るためには膀胱全摘除術によって得られた検体を選択せざるを得ない。このような理由で、これがスクリーニングに使用した検体には high grade (G2, G3) の癌が多くなり、実際には厳密な意味でのランダムな選択は行われていない。</p>				
<p>質問7) ウェスタンブロットにおいて複数のバンドが出ているが理由を説明せよ。  (回答) KRT7 にはスプライシングバリエーションによる複数のアイソフォームがあることが知られており、このためバンドも複数に出ている。</p>				
<p>質問8) ウェスタンブロットにおいて miR-199a*, miR-145, miR-30a-3p のトランスフェクションでタンパクの発現レベルが減少しているとしているが、サイズの小さなアイソフォームが減少しただけではないのか。  (回答) KRT7 mRNA には複数のタグサイトが存在している。比較的小さい KRT7 のアイソフォームに存在するタグサイトにより効率的に miR-199a*, miR-145, miR-30a-3p が結合していると考えられ、アイソフォームを中心とした KRT7 の発現量を減少させているものと考えられる。</p>				
<p>質問9) KRT7 は oncogenic function を持つ可能性があるとしているが、それはどういうことか。  (回答) siRNA を用いて KRT7 遺伝子をノックダウンすることによって細胞増殖能が低下したことをもって oncogenic function を持つ可能性があるとした。oncogenic という表現は単独でその遺伝子をトランスフェクションした時に細胞が癌化するとか、ヌードマウスに癌を作ることができるなどの証拠が必要であるとする意見もあり、その見地からは oncogenic という表現は適切ではないのかもしれない。</p>				
<p>質問10) 今回検体を得た癌患者において職業やライフスタイルの特徴はあったか。  (回答) 膀胱癌のリスク要因として、喫煙、職業性曝露 (ナフチルアミン、ベンジジン、アミノフェニル) などが考えられているが、今回検体を得た患者においてはそれらとの明らかな関連性は認められなかった。</p>				
<p>質問11) microRNA は mature な段階になるまでは2本鎖だが、それがどのような機序によって1本鎖になるのか。  (回答) 通常100塩基以上の大きさの初期転写産物 (Pri-microRNA) は Drosha とよばれる酵素によって70塩基程度のステムループ構造をもつ前駆体 Pre-microRNA にプロセッシングされる。その後、microRNA 前駆体は核内から細胞質に移動し、Dicer とよばれる酵素によって21-25塩基程度の mature microRNA にプロセッシングされる。</p>				

次の段階で2本鎖が1本鎖になるが、この明らかな機序は不明である。2本鎖 microRNA は部分的に相補配列でなく、かつ相補配列も非常に短いので1本鎖への解離には高いエネルギーを要しないものと思われる。

- 質問 1 2) microRNA の発現量を調節している因子は何が考えられるか。喫煙などとの関連はないのか。  
 (回答) microRNA の発現量は染色体レベルでの欠損や増幅などが関係していると報告されている。最近では癌関連 microRNA 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化異常が報告されている。更に microRNA の発現調節をしている microRNA もあるのではないかと推測される。喫煙との関係についての報告はない。
- 質問 1 3) microRNA の発現量は恒常的なものか。例えば、日内変動はないのか。  
 (回答) 脳に特異的な microRNA である miR-219 and miR-132 が哺乳動物の日周期性を調節しているとの報告があり、このことは間接的に光などの影響によって microRNA の発現量が変動していることを示していると思われる。
- 質問 1 4) microRNA をバイオマーカーとして用いる場合にはその安定性が問題となるが、血清、尿、剥離細胞から検出する場合、その検出率の安定性はどうか。  
 (回答) 一般に RNA は非常に不安定であり、RNase により簡単に分解されてしまうとされているが、microRNA はサイズが小さいために分解されても検出が可能である。検体を常温で一晩おいた状態でも通常の 7 割程度の検出が可能であるとの報告があり、適切な保存方法を用いて可及的速やかに Real-time PCR を行えば検出率に問題は無いと思われる。
- 質問 1 5) それぞれの microRNA のターゲット遺伝子の候補はどのようにして見つけたのか。  
 (回答) 我々は以前の網羅的解析研究で正常膀胱粘膜に対して膀胱癌で発現レベルが 2 倍以上増加していた遺伝子のリストを作成した。このデータを Web 上のターゲット予測サイト (miRanda) にインプットして、それぞれの microRNA と完全相補的な配列のタグサイトを持った候補遺伝子を抽出した。
- 質問 1 6) Stem-loop RT primer を用いた Real time PCR で塩基配列のわずかな違いは判別できるのか。  
 (回答) 企業の手元データによれば let7 family における 1 塩基の違いがある場合の検出率を確かめており、97%以上の確率でその違いを検出できることが分かっており、その特異性は保証されている。
- 質問 1 7) KRT7 を miRNA のターゲット遺伝子の候補として選択しているが、他の候補で癌と関係するものはあったか。  
 (回答) 我々のアルゴリズムにある候補遺伝子のなかで、ALK は、その突然変異が神経芽腫の原因の一つであるとされており、EML4-ALK 融合遺伝子は肺癌患者の 1 割に認められるとされている。また癌抑制遺伝子 PVOX の欠損は乳癌の原因とされている。
- 質問 1 8) KRT7 のアイソフォームの内、サイズの大きさによりアイソフォームの機能に違いはあるのか。  
 (回答) そのような報告はない。
- 質問 1 9) ウェスタンブロットにおいて非常に沢山のバンドが出ているが alternative splicing でこれだけ沢山の mRNA が出ているのか。  
 (回答) Alternative splicing に対する解析は行っていないが、抗体を開発した企業によると 6~7 のバンドが出る可能性があるとしており、ウェスタンブロットの結果はこれと矛盾しないものと考えられる。
- 質問 2 0) ウェスタンブロットにおいて miR-195 は KRT7 をノックアウトしていないにも関わらず、miR-195 トランスフェクタントにおいて細胞増殖が一番阻害されたのはなぜか。  
 (回答) miR-195 の他のターゲットが細胞増殖に関係しているのではないかと推測される。例えば我々の実験でターゲットの候補として考えられた FLNB や KRT8 を介して細胞増殖阻害を示している可能性があり今後の検討が必要である。
- 質問 2 1) この実験において膀胱癌において発現が上昇する microRNA と発現が低下する microRNA が得られているが、なぜ発現が低下するものを次の実験に用いたのか。また、バイオマーカーとして臨床応用する場合にはどちらがより有用だと考えられるか。  
 (回答) 膀胱癌において発現が低下する microRNA に関してはトランスフェクションにより機能解析が容易であるため次の実験に用いた。現在は膀胱癌において発現が上昇する microRNA についても実験を進めている。バイオマーカーとして臨床応用する場合には発現が上昇する microRNA の方が有用であると考えている。
- 質問 2 2) 他のグループも膀胱癌において同様の実験を行っているが、その中に同じ microRNA は挙がっているか。  
 (回答) 最近 Gottardo らが microRNA に対するカスタムマイクロアレイを用いた実験で、膀胱癌 25 検体において有意に発現が上昇している 10 の microRNA を同定した。しかしながら、我々と彼らの研究で一致した microRNA はない。また、彼らは膀胱癌において発現が低下した microRNA は何も同定していない。同じキットを用いた他の癌腫の研究では miR-145、miR-195、miR-133a などの共通した microRNA が報告されている。
- 質問 2 3) 細胞の悪性度または浸潤性を見るためには invasion assay や migration assay が必要であると考えられるが今回の実験では行われているのか。  
 (回答) 本論文では行っていない。現在投稿中の論文ではこれらの実験を行いポジティブな結果を得ている。
- 質問 2 4) 正常膀胱粘膜検体はどのようにして得たものなのか。  
 (回答) 正常膀胱粘膜検体は根治的前立腺摘除術で膀胱と前立腺を切り離した後に膀胱側をトリミングする際に得られたものを使用した。膀胱癌は多中心性発生といわれており、癌患者の一見正常に見える膀胱粘膜には前癌病変の変化が起こっている可能性があるためコントロールとして不適と考えられる。
- 質問 2 5) 遺伝子治療への展望はどうか。  
 (回答) 最近、血清中の microRNA が細胞へ運ばれて機能しているの可能性を示す報告があり、microRNA を血液中に投与することによって治療に応用できる可能性を考えている。
- 質問 2 6) バイオマーカーとして用いる場合、そのカットオフ値はどのようにして決定するのか。  
 (回答) 例えば尿中の microRNA 発現量をバイオマーカーとして用いる場合には、膀胱癌患者と健康者の尿を多数集め ROC カーブ分析を行うことでカットオフ値を決定する。対象患者と正常検体数を増やしながら解析することでカットオフ値は安定するものと思われる。

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)の学位を授与するに同意した。