

論 文 要 旨

LY6K is a novel molecular target in bladder cancer on basis of integrate genome-wide profiling

網羅的ゲノム解析を基に見出した
LY6K は膀胱癌の新規標的遺伝子である

松田 良一郎

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

これまでも comparative genomic hybridization (CGH) 法によって、膀胱癌を含む様々な固形癌における染色体の増減については証明されてきた。最近のアレイベースの CGH 法では、オリゴヌクレオチドを用いて、より細かな領域の染色体の不安定さ、増減を報告する論文が散見されるようになった。膀胱癌においては、1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 8q, 10p, 11q, 12q, 17q, 19q, 20q の染色体に増幅が認められ、2q, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 18q での減少が認められている。また、CGH で染色体の増幅が見られる領域では、そこに座する 40~60% の遺伝子の発現が上昇していることも報告されている。これらの報告から、染色体増幅のある領域に、癌発生、進展に関連する遺伝子が座する可能性があると仮定し、5 種の膀胱癌セルラインを用いたアレイ CGH のデータと、以前教室で行った臨床検体でのマイクロアレイ結果から 8q24.3 上の LY6K に着目し、機能解析を行うこととした。

【材料および方法】

- 1) 膀胱癌細胞株 (BOY, T24, UMUC, J82, KK47) から得られた DNA を用いて、アレイ CGH (Human Genome CGH Microarray 244K) を行い、CGH Analytics Software を用いて各染色体の増幅、減少のデータを得た。また、同細胞株から RNA を抽出し、オリゴマイクロアレイ (Whole Human Genome Microarray 44K) を用いて遺伝子発現のプロファイルを得た。
- 2) 手術で得られた 91 例の臨床膀胱癌検体と 37 例の正常膀胱粘膜を用いて、real-time RT-PCR 法にて LY6K mRNA の発現量を解析した。
- 3) 膀胱癌細胞株 (BOY, T24, UMUC, J82, KK47) のパラフィン包埋組織を用いて、LY6K 領域の BAC probe と、8 番染色体の動原体領域の probe をそれぞれ赤と緑でラベルして FISH を行った。
- 4) LY6K の発現量が比較的減少していた細胞株 (T24) の LY6K トランスフェクタントを作成し、また、発現量が上昇していた細胞株 (BOY, KK47) とを用いて、それぞれ、XTT assay・wound healing assay・MMT assay を行い細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化を評価した。また siRNA

を用いて LY6K のノックダウンを行い、同 assay を再検し function を調べた。

【結果】

- 1) アレイ CGH の結果、5 細胞株すべてで有意な増幅を示したのは 6p21.33-p21.32, 8q24.3, 9q34.13, 11q13.1-q14.1, 12q13.12-q13.13, 16p13.3, 20q11.21-q13.33 であった。その中で、最も頻度の高かった 8q24.3 に着目した。
- 2) 同細胞株でのオリゴマイクロアレイの結果、8q24.3 に座する 91 遺伝子のうち 56 遺伝子が高発現しており、その中で LY6K は正常膀胱粘膜に比べて平均で 28.62 倍と最も高発現していた。KK47、BOY ではそれぞれ 184.9 倍、43.6 倍と高発現を示し、T24 では 7.2 倍であった。
- 3) 膀胱癌の臨床サンプルで LY6K mRNA は、正常膀胱粘膜に比べて高発現していた。しかし発現量と臨床病理学的な相関は得られなかった。LY6K の高発現が、遺伝子の増幅と相関しているかを FISH 法で確認したが、KK47、BOY では T24 に比べ、コントロールよりも多く発光が確認された。
- 4) KK47、BOY の si-LY6K トランスフェクタントでは、XTT assay で有意に増殖が抑制された。BOY の si-LY6K トランスフェクタントでは、wound healing assay、MMT assay とともに有意に遊走能、浸潤能が抑制された。
- 5) T24 の LY6K トランスフェクタントでは、XTT assay で有意に増殖が増強された。wound healing assay、MMT assay では有意に遊走能、浸潤能が増強された。
- 6) 上記 T24/LY6K トランスフェクタントの si-LY6K を用いたノックダウン株では、XTT assay で有意に増殖が抑制され、wound healing assay、MMT assay では有意に遊走能、浸潤能が抑制された。

【結論及び考察】

膀胱癌細胞株において、アレイ CGH の結果より、8q24.3 領域の増幅頻度が高いことが分かった。同時に行ったオリゴマイクロアレイでは、同領域で LY6K が最も高発現していた。また、以前教室で行った 14 臨床検体を用いたマイクロアレイでも LY6K は高発現していた。同領域には MYC, PVT1, DDEF1, PTK2, GML, BOP1 といった oncogene が座しており、LY6K も同様に oncogenic な働きがあるのではないかと思われた。

LY6K は既に、頭頸部扁平上皮癌、乳癌、肺癌、食道癌で高発現していることが報告されており、非小細胞肺癌や食道癌では LY6K の高発現が予後不良と関与しており、乳癌では遊走能との関与が示されている。我々のデータでは臨床病期や病理学的悪性度との相関を得られなかったが、膀胱癌細胞株における今回の実験においては、LY6K のトランスフェクタントによって、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能の増強が認められた。

また LY6K は cancer/testis antigen としても報告されており、その抗原に対する特異的細胞障害性 T リンパ球を用いた免疫治療も肺癌や食道癌で研究されている。膀胱癌においても、LY6K が新たな免疫治療のターゲットとなる可能性を示唆するものと思われた。

(British Journal of Cancer (2011) 104, 376-386 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 197 号	学位申請者	松田 良一郎
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学 ・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査 米澤 傑
	副査	谷本 昭英	副査 有馬 直道

**LY6K is a novel molecular target in bladder cancer
on basis of integrate genome-wide profiling**

(網羅的ゲノム解析を基に見出した LY6K は膀胱癌の新規標的遺伝子である)

これまでにも comparative genomic hybridization (CGH) 法によって、膀胱癌を含む様々な固形癌における染色体の増減が証明されてきた。最近の CGH 法でより細かな領域の染色体の不安定さ、増減を報告する論文が散見されるようになった。また、CGH で染色体の増幅が見られる領域では、そこに座する 40~60% の遺伝子の発現が上昇していることも報告されている。これらの報告から、染色体増幅のある領域に、癌発生、進展に関連する遺伝子が座する可能性があると仮定し、5 種の膀胱癌セルラインを用いたアレイ CGH のデータと、マイクロアレイ結果から 8q24.3 上の LY6K に着目し、機能解析を行うこととした。

- 1) 膀胱癌細胞株 (T24, BOY, KK47) で FISH を行い、LY6K 領域のコピー数を調べた。
- 2) 91 例の臨床膀胱癌検体を用いて、LY6K mRNA 発現量を解析し検討した。
- 3) BOY と KK47 で LY6K のノックダウンを行い mRNA の発現量・蛋白質発現量変化の解析・細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化を評価した。
- 4) LY6K トランスフェクタントを作成し、mRNA の発現量・蛋白質発現量変化の解析・細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化を評価した。また同トランスフェクタントでノックダウンを行い mRNA の発現量・蛋白質発現量変化の解析・細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化を評価した。

その結果以下のことが判明した。

- 1) FISH の結果、膀胱癌細胞株 T24, BOY, KK47 の順で LY6K 領域のコピー数が増幅していることを確認した。
- 2) 臨床膀胱癌検体と正常検体を比較した結果、LY6K mRNA の発現は癌検体では有意に亢進していた。
- 3) BOY と KK47 で LY6K のノックダウンを行うと、mRNA の発現量・蛋白質発現量は低下し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能が有意に抑制された。
- 4) LY6K トランスフェクタントにおいては mRNA の発現量・蛋白質発現量は有意な上昇を確認し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能の有意な亢進を認めた。更に同トランスフェクタントをノックダウンすると mRNA の発現量・蛋白質発現量は低下し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能は有意に抑制された。

以上より、膀胱癌において LY6K 遺伝子の発現は癌細胞の増殖・遊走能、浸潤能を亢進させている可能性が考えられ、また癌精巢抗原でもあることから新たな膀胱癌免疫治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

本研究は、膀胱癌における LY6K の発現が発癌、進展に関与していることを明らかにし、新たな膀胱癌免疫治療のターゲットとなる可能性が示唆された点で興味深い。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 197 号	学位申請者	松田 良一郎
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学 ・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査 米澤 傑
	副査	谷本 昭英	副査 有馬 直道
<p>主査および副査の5名は、平成24年5月11日、学位申請者 松田 良一郎 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) LY6K は精巣、卵巣、胎盤での発現があるが、それらの臓器内での役割は分かっているのか。 (回答) リンパ球や造血細胞上で LY6 family genes (LY6A, B, C) などが発見され、cell signaling pathway や cell adhesion に関与するとされる。精巣における LY6K の働きは分かっていないが、細胞分裂の活発な正常組織に発現していることから、細胞の増殖能に深く関わっていると推測される。</p> <p>質問 2) LY6 ファミリーは 8q24.3 以外にもあるが、それらについてはどういう報告があるのか。 (回答) CD59 は 11p13 に、SP-10 は 11q23-q24 に、CD177 は 19q13 に存在する。それぞれ膜溶解攻撃からの防御、abnormal RNA のスプライシング、真性赤血球増加症での発現亢進という働きや特徴が報告されている。</p> <p>質問 3) LY6K mRNA の発現と膀胱癌の臨床病理学的な因子とは有意な相関が無かったが、その原因は何か。 (回答) 個々の症例では LY6K 発現による単独の影響より他の oncogene、tumor suppressor gene の影響が大きいことが考えられる。またリン酸化やユビキチン化などのエピジェネティクスにより実際に機能する蛋白発現はメッセンジャー RNA 発現とは異なる可能性がある。さらに検体採取においては、経尿道的切除での検体は正常粘膜の混入や電気凝固による組織変性の影響も考えられる。</p> <p>質問 4) 血中のマーカーとして、LY6 を測定したか。あるいはその報告はあるか。 (回答) 今回の実験では行っていない。非小細胞性肺癌と食道扁平上皮癌で血中の LY6K を測定している報告があり、診断の感度はそれぞれ 33.9%、32.2%だが、CEA と組み合わせると肺腺癌で 54.7%、CYFRA21-1 と組み合わせると肺扁平上皮癌で 70.4%、食道扁平上皮癌で 52.5%まで感度が上昇したと報告されている。</p> <p>質問 5) 用いた cell line の組織型は、すべて Urothelial carcinoma でよいのか。 (回答) すべて Urothelial carcinoma である。</p> <p>質問 6) 培養細胞で FISH を行っているが、あえてパラフィン切片にした理由は何か。 (回答) 誤った記述である。当初、臨床検体の FISH を検討していたために、その記述が修正されないまま残ってしまった。実際は 1%バッファーホルマリン (20mM MgCl₂) で 10 分間固定し、PBS で洗浄後にエタノールで脱水している。</p> <p>質問 7) siRNA をトランスフェクションするのにリバーストランスフェクション法で行ったのはなぜか。 (回答) はじめはフォワードトランスフェクション法 (細胞をウェル中にプレートし、翌日にトランスフェクション混合液を添加) にて行ったが、うまく siRNA が細胞に入らなかったため、リバーストランスフェクション法で行った。</p> <p>質問 8) 臨床検体で、CGH アレイは行ったか。 (回答) 行っていない。重要な指摘と思われるがコストの問題などもあった。</p> <p>質問 9) 8q24.3 は増幅領域であるが、逆に 4 番染色体のように完全に loss しているような部位に癌抑制的な遺伝子の存在はあるのか。 (回答) 以前当教室の仕事で、4 番染色体上には癌抑制的 micro RNA (miR-218) があり、その target gene である oncogenic な TMX1 の発現を抑制したという報告をした。</p> <p>質問 10) 臨床検体での免疫染色はできなかったのか。 (回答) 当時入手できた抗体は、ウェスタンブロット用の polyclonal 抗体が 1 種類であった。これを用いて免疫染色</p>			

最終試験の結果の要旨

をしたが、うまく染色できなかった。過去に monoclonal 抗体を自作し免疫染色をして、肺扁平上皮癌、食道扁平上皮癌で臨床病期に応じて蛋白発現が亢進していることが報告されている。

質問 11) Fig. 2A で human normal tissue のサンプルを使用しているが、どうやって手に入れたのか。

(回答) 今回は受託実験によるデータであるが、human normal tissue のサンプルは市販されている。

質問 12) Table 3 で T24 における LY6K の発現は 20 倍くらいであるが、どうしてそれより低い発現の UMUC でトランスフェクタントを作成しなかったのか。

(回答) UMUC は focal に増殖するため機能解析実験(遊走能実験、浸潤能実験)に不向きである。そのため 2 番目に発現の低かった T24 でトランスフェクタントを作成し実験を行った。

質問 13) CGH の実験の再現性をどのように考えるか。

(回答) 今回は同一の細胞株で複数回の CGH アレイを行っていないが、5 種類の細胞株すべてに共通して増幅や欠失している領域があり実験の再現性は担保されると考える。過去の報告でも 3p, 7p, 17p の増幅と 9p の欠失は重複して報告されており、これらをターゲットにした FISH 法による尿路上皮癌の診断キットも海外では使われている。

質問 14) Fig. 2B で正常膀胱粘膜と末梢血リンパ球の間にも発現の有意差があるような印象だが、その差の意味は何か。

(回答) LY6K は lymphocyte antigen であるので末梢血リンパ球でも発現しているのではないかと指摘があり、追加実験を行ったが上昇は認められなかった。末梢血リンパ球は僅か 4 検体であり、正常膀胱粘膜との発現差は評価できない。

質問 15) Fig. 4B でノックダウン実験を行っているが、BOY において 70% の cell viability の低下があり、その低下分はアポトーシスで死滅したと考えるのか、増殖そのものが抑制されたと考えるのか。

(回答) 今回アポトーシス実験は行っていないが、supplement で行った LY6K トランスフェクタントのマイクロアレイ実験ではアポトーシスに関与する遺伝子の変動は無く、増殖そのものが抑制された可能性がある。

質問 16) T24 は比較的 LY6K の発現が少ないとされているが、腫瘍性の増殖はしているわけで、症例によっては LY6K が低下していても腫瘍性増殖は保たれると思われる。LY6K を治療のターゲットとした場合に、その有効性はあるのか。

(回答) LY6K に因らない腫瘍性増殖を来す遺伝子の存在が、T24 のようなタイプにはあると思われる。治療応用を考えた場合、LY6K 低発現の癌に対しては効果が小さいと考えるが、逆にオーダーメイド治療の展開が可能と考える。

質問 17) CGH アレイの増幅領域から、マイクロアレイで高発現している遺伝子を絞り込むという戦略だが、CGH でかなり細かな領域で増幅と欠失が隣接しているのであれば、CGH で絞り込むのは意味があるのか。最終的に標的遺伝子を調べる実験をするのであれば、マイクロアレイだけで十分ではないか。

(回答) マイクロアレイだけでは、あまりにも多くの遺伝子が抽出されるので、絞り込むツールとして CGH アレイを用いた。使用した CGH アレイは 10Kb 毎にプローブが設計されており、遺伝子の増幅・欠失を微細に検出できると思われ、その領域にコードされる遺伝子の発現と関連している可能性が高いと考えた。

質問 18) 正常膀胱粘膜での LY6K の機能は何か。

(回答) cell signaling pathway や cell adhesion の働きを持つとされるが、現在のところ良く分かっていない。正常膀胱粘膜においては低発現であることから、その発現上昇は癌化を誘導する可能性がある。

質問 19) Fig. 4 で BOY と KK47 は同じくらい蛋白も抑制されているように見えるが、KK47 がもともと非常に強い発現であり、siRNA で抑えられなかったわずかな差がこの cell viability に反映されたと考えてよいのか。

(回答) その可能性はあるが KK47 には LY6K に因らない増殖機構が中心である可能性もあり、今後検討が必要である。

質問 20) LY6K の下流のシグナルについては分かっているか。

(回答) 現在のところ、詳細は調べられていない。今後の研究課題である。

質問 21) LY6K は GPI アンカー型蛋白であり、血中で検出されるという論文があるが、尿中で検出可能か。

(回答) 血中で検出され、バイオマーカーとしての可能性が報告されている。今回は血中および尿中での LY6K の検出実験は行っていないが、重要な指摘であり今後の研究課題である。

質問 22) LY6K をターゲットとしたワクチン治療の研究があるが、その場合 cancer testis antigen (CTA) であれば正常精巣への悪影響は無いのか？

(回答) 抗原タンパク質は腫瘍細胞内で 8-12 個のペプチドまで剪断化され、これが HLA のクラス I 分子上に提示される。これを cytotoxic T lymphocyte (CTL) が認識して攻撃するとされる。正常精巣では CTA の発現はあるが、HLA のクラス I 分子を発現していない組織なので、この分子が発現していても CTL から攻撃されないと考えられている。

質問 23) 膀胱癌では実際にワクチン治療が進んでいるのか。

(回答) 食道癌で phase I 実験の報告があるが、膀胱癌では進んでいない。

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。