

論 文 要 旨

***miR-218* on the genomic loss region of chromosome 4p15.31
functions as a tumor suppressor in bladder cancer**

〔 染色体欠失領域にコードする *microRNA-218* は
膀胱癌において癌抑制的に機能する 〕

鑪野 秀一

【序論および目的】

microRNA は約 22 塩基対からなる non-coding RNA であり、標的となる messenger RNA に相補的に結合することで、その翻訳抑制を起こすエピジェネティックな発現調節機構である。その発現異常は癌の発症や進展に関わるとされるが、*microRNA* の発現機除については現在のところ明らかになっていない。そこで我々は膀胱癌の染色体欠失領域に癌抑制的な *microRNA* が存在すると仮定した。Comparative Genomic Hybridization (CGH)アレイから、染色体欠失領域に存在する *microRNA* をマッピングし、膀胱癌細胞株における癌抑制的 *microRNA* の探索を行った。

【材料および方法】

以前我々が報告した膀胱癌細胞株のアレイ CGH データにおいて、4つの細胞株 (BOY, KK47, T24, J82) に共通する欠失領域であった 4 番染色体に注目した。この領域には 23 の *microRNA* がコードされており、そのうち primer が入手可能であった 19 個の *microRNA* について膀胱癌細胞株での発現を stem-loop RT-PCR 法により検証した。膀胱癌細胞株で発現低下が著明であった候補 *microRNA* について、さらに臨床検体 (正常膀胱粘膜 6 検体、膀胱癌 16 検体) で Real-time RT-PCR を施行。臨床検体における *microRNA* の発現を検証し、候補となる *microRNA* を絞り込んだ。

候補 *microRNA* の機能解析として、mature *microRNA* を膀胱癌細胞株 (BOY, T24) に導入しトランスフェクタントを作成して、XTT assay、Wound healing assay、Invasion assay、Flow cytometry を行い、細胞増殖、遊走、浸潤能、およびアポトーシス誘導について実験した。候補 *microRNA* の標的遺伝子については、候補 *microRNA* のトランスフェクタント (BOY, T24) を用いて oligo-microarray 解析を行った。さらに膀胱癌細胞株 (BOY, T24)、臨床検体 (正常膀胱粘膜 10 検体、膀胱癌 28 検体) における標的遺伝子の発現を Real-time RT-PCR にて検証した。

【結果】

Real-time RT-PCRの結果、4番染色体欠失領域に存在する19個のmicroRNAのうち、4つの膀胱癌細胞株で発現が著明に低下していたのは、miR-95、miR-218、miR-578であった。これら3つのmicroRNAについて臨床検体（正常膀胱粘膜6検体、膀胱癌16検体）でReal-time RT-PCRを行った結果、発現が有意に低下していたのはmiR-218($P < 0.0005$)であった。そこでmiR-218を2つの膀胱癌細胞株(BOY, T24)に導入して機能解析を行った。XTT assayではmiR-218トランスフェクタントにおいて有意に細胞増殖の抑制を認め(BOY: $P < 0.0001$, T24: $P < 0.0001$)、Wound healing assayでは有意に細胞遊走能の抑制(BOY: $P = 0.0001$, T24: $P = 0.0018$)、Invasion assayでは有意に浸潤能の抑制(BOY: $P = 0.0008$, T24: $P = 0.0008$)を認めた。Flow cytometryでは有意なアポトーシスの誘導が観察された(BOY: $P = 0.00016$, T24: $P = 0.0008$)。Oligo-microarray解析では、miR-218トランスフェクタント(BOY, T24)において162個の遺伝子の発現がコントロールと比べて2倍以上に発現亢進していた。また337個の遺伝子の発現が1/2以下に抑制されていた。これらの中には癌の進展に関与する多くの遺伝子の発現が含まれていた。発現が抑制されていた遺伝子の中にはmiR-218の標的遺伝子の可能性があり、2つの膀胱癌細胞株(BOY, T24)に共通して発現が1/2以下に低下していた遺伝子に注目した。その中で最も発現が抑制されていたTMX1はWeb上のデータベースであるTarget Scanでも3'UTRに相補的に結合する領域が認められたため、miR-218の標的遺伝子と考えられた。Real-time RT-PCRでTMX1の発現を検証したところ、正常膀胱粘膜と比較して膀胱癌細胞株(BOY, T24)では有意に発現が亢進しており(BOY: $P = 0.0004$, T24: $P = 0.0029$)、miR-218トランスフェクタントでは有意に発現の抑制が認められた(BOY: $P = 0.0004$, T24: $P = 0.0017$)。臨床検体(正常膀胱粘膜10検体、膀胱癌28検体)でTMX1の発現をReal-time RT-PCRで検証したが、膀胱癌ではその発現が高い傾向にあるものの、有意差は認められなかった($P = 0.0734$)。

【結論及び考察】

膀胱癌における欠失領域のひとつである4番染色体には複数のmicroRNAがコードされ、その中で膀胱癌細胞株および臨床検体で発現が低下していたmiR-218は機能解析実験にて、癌抑制的作用を持つmicroRNAと考えられた。

miR-218については他の癌腫(胃癌、肺癌、子宮頸癌、頭頸部癌、前立腺癌)でも発現が低下しているという報告があり、今回の実験で膀胱癌においても癌抑制的なmicroRNAであることが始めて示唆された。

膀胱癌において癌抑制的なmicroRNAであるmiR-218は、染色体欠失がその発現機序の一因であると思われた。癌におけるmicroRNAの発現調節機序は十分には明らかになっていないが、染色体の欠失による癌抑制的なmicroRNAの発現抑制は癌の発生・進展に重要な役割を有することが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 138 号		学位申請者	鑪野 秀一
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	古川 龍彦
	副査	東 美智代	副査	原口 みさ子
<p>MiR-218 on the genomic loss region of chromosome 4p15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer</p> <p>(染色体欠失領域にコードする miRNA-218 は膀胱癌において癌抑制的に機能する)</p> <p>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、70から100塩基対のヘアピン形状の前駆体(pre-microRNA)から切断される。microRNAはヒトの癌において異常な発現パターンを示す事がわかっており、このことはmicroRNAが癌遺伝子の機能や癌抑制的機能を持つ可能性を示唆している。癌におけるmicroRNAの発現機序に関して、SNPやpri-microRNAのmutation、コピー数の変化、Dicerの低下などの報告がある。以前、我々は複数の膀胱癌細胞株におけるCGHアレイを行い、4番染色体が共通した欠失領域であることを報告した。そこで、膀胱癌において染色体欠失領域である4番染色体に癌抑制的なmicroRNAが存在すると仮説を立てた。この領域には23のmicroRNAがコードされており、その発現をstem-loop RT-PCRにより検証した。候補microRNAの機能解析として、mature microRNAを膀胱癌細胞株にトランスフェクションし、XTT assay、wound healing assay、invasion assay、flow cytometryを行い、細胞の増殖、遊走、浸潤能、およびアポトーシス誘導を評価した。候補microRNAの標的遺伝子については、トランスフェクタントを用いてオリゴマイクロアレイで解析した。</p> <p>その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 4番染色体欠失領域に存在するmicroRNAのうちの19個で、膀胱癌細胞株4株で低下していた3つのmiRNAのうち、miR-218は臨床検体でも発現が有意に低下していた。 2) miR-218は膀胱癌細胞の増殖、遊走、浸潤能を有意に抑制し、アポトーシスを誘導した。 3) オリゴマイクロアレイでは、癌の進展に関与する多くの遺伝子の発現が影響を受けていた。発現が最も低下していた遺伝子TMX1はmiR-218の標的遺伝子の候補と考えられた。 4) 膀胱癌細胞株においてTMX1は発現が上昇しており、miR-218のトランスフェクションにより、その発現が低下した。 <p>本研究では、miR-218が膀胱癌において染色体の欠失領域(4p15.31)に存在し、発現が抑制されている癌抑制的なmicroRNAであると考えられた。miR-218の機能解析実験では、細胞の増殖、遊走、浸潤の抑制およびアポトーシスの誘導に関与することが示されたことは非常に興味深い。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。</p>				

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 138 号	学位申請者	鑪野 秀一
審査委員	主査	小澤 政之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査 古川 龍彦
	副査	東 美智代	副査 原口 みさ子
<p>主査および副査の5名は、平成23年7月26日、学位申請者 鑪野 秀一 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) miR-218 トランスフェクションで down-regulation されるトップ20の遺伝子リストに Migration や Wound healing に関与する他の遺伝子はあるのか。</p> <p>(回答) Gene Ontology で検索した結果ではトップ20のリストの中にはそのような遺伝子は存在しなかった。子宮頸癌で報告されている LAMB3 は miR-218 の標的遺伝子のひとつであるが、我々のリストでは52位にランクされていた(コントロール比0.34倍)。LAMB3 は基底膜のタンパク質であるラミニン5のサブユニットで、細胞の遊走に関わるとする報告がある。我々は膀胱癌細胞株で LAMB3 をノックダウンしたとき、Wound healing アッセイで細胞の遊走能が抑制されることを確認している。</p> <p>質問2) 鼻咽頭癌では miR-218 で抗アポトーシスタンパクである Survivin (BIRC5) が down-regulation されると報告されているが、膀胱癌において検討しているか。</p> <p>(回答) 今回の実験では Survivin (BIRC5)の機能解析実験は行っていないが、miR-218 トランスフェクションにより down-regulation される遺伝子のリストで132位にランクされていた(コントロール比0.40倍)。興味の持たれる遺伝子であり今後検討したい。</p> <p>質問3) アレイ CGH 解析でコピー数が下がっているのにいくつかの microRNA の発現が上がっている機序は何か。</p> <p>(回答) アレイ CGH で100%の loss とあるのは、発現が全くないということではなく、5つの膀胱癌細胞株すべて(100%)において対象領域のゲノムの増幅が正常膀胱に比べ相対的に loss していたことを示している。可能性としては片方の allele では loss が全く起こっていないケースもあるので、そこにコードされている microRNA の発現が正常膀胱に比べ亢進していることは十分にあり得る。</p> <p>質問4) miR-218 トランスフェクタントはアポトーシスを起こしているが、細胞増殖、浸潤能、遊走能の抑制と関連があるのか？</p> <p>(回答) アポトーシスが強く誘導されれば、細胞増殖だけでなく、浸潤能、遊走能の抑制に影響することは考えられるので、細胞浸潤能、遊走能の変化についてはさらに詳しく検討する必要がある。</p> <p>質問5) TMX1 の機能は？</p> <p>(回答) TMX1 に関しては報告が少なくよくわかっていない。Pub Med で2報の報告があり、小胞体内で酸化還元に関わったり、アポトーシスとも関連するとされる。</p> <p>質問6) microRNA のトランスフェクション効率はどれくらいか、確認はしているか。</p> <p>(回答) microRNA のトランスフェクション効率についてはPCRで発現確認をしても、バックグラウンドの microRNA も検出されてしまうため正確でない。このため評価実験として miR-1 をトランスフェクションし、その</p>			

最終試験の結果の要旨

ターゲットである PTK9 mRNA のノックダウン効率を確認した上で、全く同じ条件で対象 microRNA のトランスフェクションを行った。今回膀胱癌細胞への miR-1 トランスフェクション後 24 時間の PTK9 mRNA は 90%程度低下した。この結果からトランスフェクション効率は良好であると考ええる。

質問 7) トランスフェクション効果が悪いために、本当は miR-218 に致死的な効果があるのに XTT では増殖抑制が強く観察されない可能性もあるのではないか。

(回答) 前述のようにトランスフェクション効率は良好と考えているので、miR-218 には細胞増殖を完全に抑える効果はないと考えている。

質問 8) Figure 5C で miR-218 の発現が低下している検体のみで検討すれば、TMX1 の発現に有意差はあるのか。

(回答) 今回、miR-218 の発現を測定した臨床検体と、TMX1 の mRNA の発現を測定した臨床検体は異なるために比較ができない。しかしながら重要な指摘と思われ、今後追試を検討したい。

質問 9) 測定対象となる microRNA を 3 つに絞ったのは Table III における平均 Fold change 0.01 未満を基準としたのか。

(回答) Table の平均 Fold change 0.01 未満ではなく、Figure 2A でカラーバーが薄い印象のもの、正常膀胱粘膜での発現を加味して 3 つに絞った。正常膀胱粘膜における発現が低い microRNA は候補から外した。

質問 10) 4 つの細胞株を用いて microRNA の発現をみたのに BOY、T24 の 2 つの細胞株で機能解析をおこなった理由は？。

(回答) KK47、UMUC は増殖が遅く、focal に増殖するため機能解析実験に不向きと判断した。

質問 11) TMX1 の発現はタンパク質レベルでも確認したか。

(回答) 臨床検体の mRNA レベルで有意な発現上昇が認められなかったためタンパク質の発現変化は検討しなかったが、タンパク質レベルでは発現差が生じる可能性もあり今後の検討課題としたい。

質問 12) Loss している 4 番染色体にコードされている gene には何があるか。

(回答) 4 番染色体には約 1600 の遺伝子が含まれています。miR-218 は SLIT2 を Host gene としている。miR-218 は SLIT2 遺伝子のイントロンに存在する。SLIT2-ROBO1 pathway は癌抑制的作用を有することが報告されており、興味深いと思われる。

質問 13) XTT アッセイ、Wound healing アッセイはトランスフェクション後、何時間で実験したか。

(回答) XTT アッセイはトランスフェクション 72 時間後に判定、Wound healing アッセイはトランスフェクション後 48 時間後にスクラッチし、その 24 時間後に判定した。

質問 14) 4 ページの The microRNAs located at chromosome 4p and 4q were the most numerous among the lost loci の意味は。

(回答) 膀胱癌のアレイ CGH で loss 領域が最も多かったのが 4 番染色体であり、さらに loss 領域にコードされている microRNA の数が最も多かったのも 4 番染色体であったことを指している。この領域を調べることで、癌抑制的な microRNA を発見する可能性が高いと推測した。

質問 15) miR-218 の Host gene である SLIT2 の発現は低下しているか。

(回答) 今回は SLIT2 の発現は測定しなかった。肺癌、前立腺癌では miR-218 の発現低下と SLIT の発現低下は関連しているとの報告がある。膀胱癌についても今後測定したい。

質問 16) miR-218 トランスフェクションで down-regulation されるトップ 20 の遺伝子リストに膀胱癌の発癌や進展に意義がありそうな遺伝子はあるか。

(回答) 胃癌で報告のある VOPPI1、ROBO1 などはアポトーシスに関する報告もあるので、膀胱癌においても発現や機能解析を検討する価値がある。他の遺伝子についても今後の研究課題としていきたい。

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。