

論 文 要 旨

The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer

膀胱癌における TAGLN2 を介した
miR-1 と miR-133a の癌抑制的作用

吉野 裕史

【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 は様々なヒトの癌に関与するという報告がみられるが、我々は膀胱癌で発現が特異的に低下している miRNA のサブセットを報告した。その中で特に抗腫瘍効果が強かった miR-1 と miR-133a に注目し miRNA transfectant において oligo microarray を行い、膀胱癌において共通して発現が低下した Transgelin 2(TAGLN2)に注目した。TAGLN2 はアクチン関連タンパクで発癌に関与するという報告がある。我々は膀胱癌における TAGLN2 の制御機構の解明と機能解析を行った。

【材料および方法】

臨床膀胱癌 11、正常 5 検体を用いて miRNA アレイ解析を行った。癌で低発現であった miRNA の発現を real-time PCR で臨床検体において検証した。標的遺伝子については、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で解析した。標的遺伝子への結合を検証するためにルシフェラーゼアッセイを行った。標的遺伝子の臨床検体における発現を免疫染色で評価した。またトランスフェクタントにおける gain-of-function study を行い、増殖、遊走、浸潤能、およびアポトーシス誘導を評価した。

【結 果】

MiR-1 と miR-133a は膀胱癌において最も発現が抑制され、また腫瘍抑制効果は最も大きかった。Oligo microarray より miR-1 と miR-133a transfectant で共通して発現が低下した TAGLN2 を miR-1 と miR-133a の標的遺伝子とし実験を行った。ルシフェラーゼアッセイで miR-1 と miR-133a が TAGLN2 の 3' 非翻訳領域に結合することを確認した。TAGLN2 は増殖・遊走・浸潤・アポトーシスに関与することが示唆された。免疫染色では TAGLN2 の発現強度と Grade に有意な相関関係を認めた。

【結論及び考察】

膀胱癌の miRNA 発現プロファイルから、癌抑制的に働く miR-1 と miR-133a を見だし、その標的遺伝子で癌遺伝子的作用を有する TAGLN 2 を同定した。この経路は膀胱癌の進展において重要な役割をもち膀胱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。

(British Journal of Cancer Vol.104, No.5 2011 年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第137号		学位申請者	吉野 裕史
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堂地 勉	副査	古川 龍彦
	副査	上野 真一	副査	武田 泰生

The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer
 (膀胱癌において miR-1 と miR-133a は TAGLN2 を標的とし癌抑制的に働く)

MicroRNA 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、分解や翻訳抑制により発現を抑制する。最近、学位申請者らは膀胱癌で発現が特異的に低下している microRNA の新たなサブセットを報告した。その中で miR-1 は他の癌種でも発現低下が報告されているが、そのターゲット遺伝子については良く分かっていない。今回、膀胱癌で発現が最も低下していた miR-1、miR-133a に注目し、oligo microarray を用いてそのターゲット遺伝子を検索、機能解析を行った。microRNA と TAGLN2 の 3' 非翻訳領域との結合は luciferase reporter assay にて確認した。各 microRNA および Transgelin 2 (TAGLN2) の機能解析として、膀胱癌細胞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、apoptosis assay を行った。また正常膀胱 8 検体、膀胱癌 47 検体において TAGLN2 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) Oligo microarray では miR-1、miR-133a トランスフェクタントにおいて TAGLN2 は共通して発現が低下した遺伝子であった。
- 2) Luciferase reporter assay では miR-1 と miR-133a は TAGLN2 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。
- 3) 膀胱癌細胞の増殖、遊走、浸潤能は miR-1、miR-133a トランスフェクタントおよび si-TAGLN2 トランスフェクタントにおいて有意に抑制された。また si-TAGLN2 トランスフェクタントではアポトーシスの亢進を認めた。
- 4) 臨床検体による免疫染色では TAGLN2 の発現は正常膀胱と比べ膀胱癌において有意に上昇し、さらに癌細胞の異型度や転移の有無において有意な相関関係を認めた。

膀胱癌においては miR-1 と miR-133a が直接 TAGLN2 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。この経路は膀胱癌の進展において重要な役割を持ち、膀胱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、膀胱癌における腫瘍抑制的 microRNA の発現と標的遺伝子 TAGLN2 の関連と機能を検討したものであり、その結果 TAGLN2 の発現は膀胱癌で有意に亢進し、癌細胞の異型度や転移に関係することが示された。また、TAGLN2 が癌細胞自身の増殖能、遊走能、浸潤能を促進しアポトーシスに関連すること、さらにその働きは膀胱癌で発現が低下している miR-1、miR-133a で制御されることを示した点で非常に興味深い。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137号		学位申請者	吉野 裕史
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堂地 勉	副査	古川 龍彦
	副査	上野 真一	副査	武田 泰生
<p>主査および副査の5名は、平成23年8月17日、学位申請者 吉野 裕史 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-1/miR-133a の正常組織での発現はどうか。 (回答) 心筋、骨格筋に特異的に発現していると多くの論文で報告されている。また、心筋肥大や心筋梗塞では miR-1/miR-133a の発現が低下しているとの報告がある。</p> <p>質問2) TAGLN2 はアクチン関連蛋白質であり浸潤や増殖に関与するのは理解できる。しかし TAGLN2 をノックダウンするとアポトーシスが誘導されているが本当に TAGLN2 が関与しているのか。 (回答) TAGLN2 のノックダウンによりアポトーシスが誘導される機序はわかっていないが TAGLN2 が他のアポトーシス関連遺伝子を制御し間接的に関与している可能性はある。今後 TAGLN2 をノックダウンした細胞で免疫蛍光染色を行いカスパーゼ3、カスパーゼ7の活性化を確認したい。</p> <p>質問3) ルシフェラーゼアッセイは conserved site が複数あるがどのように行ったのか。 (回答) それぞれの conserved site を別々のベクターに組み込み解析を行った。</p> <p>質問4) TAGLN2 は細胞骨格蛋白質だがバイオマーカーとしての利用はどうか。 (回答) 膀胱癌患者の尿中には剥離癌細胞が存在するので ELISA 法などで TAGLN2 の発現を測定しバイオマーカーとしての有用性を検討したい。</p> <p>質問5) miR-1/miR-133a の発現はどのような機序で調節されているか。 (回答) microRNA の発現量は染色体レベルでの欠失・増幅、癌関連 microRNA 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化異常などが関係していると報告されている。miR-1/miR-133a は 18 染色体上にコードされているが、我々の以前の報告で膀胱癌の CGH アレイ解析において 18 番染色体は loss しており、染色体レベルでの欠失が関与している可能性が考えられる。</p> <p>質問6) in vivo study をしていないが miR-1/miR-133a をノックアウトしたらどうなるのか。 (回答) miR-1/miR-133a ノックアウトマウスにおいて癌化が誘導されるかどうかは報告がない。miR-1/miR-133a のノックアウトで個体が生存できるかどうか未確定であり、今後の検討課題である。</p> <p>質問7) miR-1 と miR-133a を同時にトランスフェクトするとどのような変化が起こるのか。片方のトランスフェクタントだけでは、癌抑制作用は不十分か。 (回答) XTT アッセイでは miR-1 と miR-133a を同時にトランスフェクトしても増殖抑制効果の相乗効果はなかった。これはターゲットにしている重要な遺伝子はある程度重複している可能性を示している。また、片方のトランスフェクタントでも 50%程の増殖抑制効果を認める。</p> <p>質問8) 膀胱癌転移症例に miRNA を投与するのは有用か。 (回答) TAGLN2 が細胞の遊走や浸潤にかかわり免疫染色で浸潤度、転移にも関連したことなどから考えると、癌化の初期ではなく癌細胞が浸潤、転移を起こすところに関係しているのではないかとと思われる。そのため miR-1/miR-133a を投与し TAGLN2 をノックダウンすると浸潤や転移を抑制する可能性があると考えている。</p> <p>質問9) 膀胱癌の発症に性差はあるのか。また予後に関しては、予後で男女差があるか。 (回答) 膀胱癌は男女比 3:1 の罹患率である。予後と性別に関連はない。</p> <p>質問10) 婦人科領域での miR-1/miR-133a の報告は。 (回答) 婦人科領域では miR-1/miR-133a に関連した報告はない。</p> <p>質問11) miRNA microarray の検体選択に性差を考慮しなかったのか。 (回答) 今回は検討していないが、性差が生じる可能性はあり今後検討したい。</p> <p>質問12) 正常膀胱粘膜は何を用いたのか。 (回答) 膀胱癌は多中心性発生であり、同一患者の正常に見える膀胱粘膜にはすでに前癌病変である可能性がある。そのためコントロールは根治的前立腺摘除術時に採取した膀胱粘膜を使用した。</p> <p>質問13) その場合、コントロールも男性だけになるがそれで良いのか。</p>				

(回答) 指摘のとおりであり、今後の検討課題としたい。

質問 1 4) 免疫染色は一人で判定したか。意見が合わないときはどうしたか。

(回答) 2人で判定した。判定スコアが異なる場合は2人のスコアの平均値を採用した。

質問 1 5) TAGLNは何種類あるか。

(回答) TAGLNは3種類ある。TAGLN1はTAGLN2と同様にアクチン関連蛋白質であり平滑筋に発現している。TAGLN3は神経特異的蛋白質である。

質問 1 6) miR-1、miR-133aはspecificにTAGLN2を制御しているのか。

(回答) TAGLN2を制御する他のmiRNAは存在する可能性がある。今回の研究ではルシフェラーゼアッセイによりTAGLN2の3' UTRにmiR-1、miR-133aがそれぞれ直接結合することが証明されておりmiR-1、miR-133aはspecificにTAGLN2を制御していると考えられる。

質問 1 7) 臨床レベルでmiR-1/miR-133aは膀胱癌の新たな治療の手段となりうるのか。

(回答) miR-1/miR-133aを膀胱内注入や静脈内に投与することでTAGLN2をノックダウンし抗腫瘍効果をもたらす可能性が期待され、今後実験を計画したい。

質問 1 8) 筋肉ではmiR-1/miR-133aはHDAC4 (histone deacetylase) やSRF (serum response factor)を制御しているが膀胱癌ではこれらの遺伝子に発現の変化があったか。

(回答) miR-1/miR-133aトランスフェクタントにおけるoligo microarrayの結果では膀胱癌においてHDAC4やSRFの発現の変化は認めなかった。

質問 1 9) Table.1のTOP5は何の順番か。

(回答) 膀胱癌において発現が低下していたものをfold-changeの大きいものから順に表示している。

質問 2 0) 筋と正常膀胱においてmiR-1/miR-133aの発現差はどの程度か。

(回答) 筋と正常膀胱においてmiR-1、miR-133aの発現量を比較した報告はなく、今後実施したい。

質問 2 1) miR-1/miR-133aとTAGLN2のin vitroのfunction studyの結果をみるとこれらのmiRNAが制御しているのはTAGLN2だけでもいいようだが他の遺伝子はどうか。

(回答) 論文掲載のTable 2にあるPNP、SFRS9、PTMA遺伝子はmiR-1に制御されoncogenic functionをもつ可能性があることをすでに実験で確認している。

質問 2 2) 細胞増殖が高度に抑制されれば遊走・浸潤の抑制も当然である。miR-1/miR-133aの遊走・浸潤抑制効果はどのように説明できるか。また、論文掲載のFigure 2Dで同じmiR-133a導入細胞でもBOYとT24の間に浸潤能に相違を認めるがなぜか。

(回答) TAGLN2はアクチン結合蛋白質でありmiR-1/miR-133a導入により細胞の遊走・浸潤能が変化すると考えているが、当然アポトーシスの誘導も結果に影響していると考えられるので、今後異なる実験系での検討が必要と思われる。さらにmiRNAは複数の遺伝子を制御しているが、ターゲットの遺伝子の発現は細胞株により異なる可能性があり、そのためBOYとT24の間で浸潤能の相違が出た可能性がある。

質問 2 3) TAGLN2は膀胱癌で発現が上昇しているのか、低下しているのか。

(回答) 論文審査要旨の表現は誤解を招いた。正確には「Oligo microarrayの結果、miR-1、miR-133aトランスフェクタントにおいて共通して最も発現が低下した遺伝子はTAGLN2であった。」とすべきであった。wild typeの膀胱癌細胞株および臨床膀胱癌組織においてはTAGLN2の発現は上昇している。

質問 2 4) 免疫染色はなぜtissue microarrayを用いたのか。大きな剖面ではheterogeneityがあるのか。

(回答) 実験の精度や費用を考慮しtissue microarrayを用いて免疫染色を行っている。ハイグレード癌や転移部位のような濃染を認める切片ではheterogeneityは認めなかった。しかし院内病理由来のパラフィン切片における大きな癌組織での染色性は確認しておらず今後検討する必要がある。

質問 2 5) 同一組織でTAGLN2とmiR-1/miR-133aの発現が逆相関しているかどうか対比はできるのか。

(回答) miRNAのin situ hybridizationを行えばmiR-1、miR-133aの発現とTAGLN2との比較も可能であるが今回は行っていない。以前miR-145とそのターゲットであるFSCN1の発現が逆相関することを確認している。

質問 2 6) 免疫染色で血管系が染色されるのはcontrolとしてみているのか。血管は平滑筋であるが、一般的に平滑筋にはTAGLN2は染まっていると考えているのか。また腫瘍血管では特に濃く染まるのか。

(回答) 血管系がそまるのはcontrolとして示している。miR-1/miR-133aは心筋、骨格筋に特異的に発現しているがTAGLN2は平滑筋のマーカーとして知られており、血管平滑筋に発現している。正常血管と比し腫瘍血管で濃染される可能性はあるので今後検討したい。

質問 2 7) 免疫染色で用いたtissue microarrayはどのようにして入手したのか。

(回答) US Biomax社より購入した。

質問 2 8) miRNA microarrayで使用した検体での免疫染色は行ったか。

(回答) miRNA microarrayで使用した検体と免疫染色の検体は異なるものである。実験の精度や費用を考慮し今回は実施しなかったが、重要な指摘であり今後パラフィンからmiRNAの抽出を行い実験を計画したい。

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。