

論 文 要 旨

***miR-145 and miR-133a* function as tumour suppressors
and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer**

膀胱癌における FSCN1 制御を介した
miR-145 と miR-133a の癌抑制的作用

千代丸 剛

【序論および目的】

microRNA は長さ約 22 塩基の小さな non-coding RNA であり、ターゲットの messengerRNA に配列特異的に結合して、分解や翻訳抑制によりその発現を抑制する。最近、microRNA が様々なヒトの癌に関与するという報告がみられる。我々は膀胱癌で発現が特異的に低下している microRNA のサブセットを報告した。その中で miR-145 と miR-133a 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-145 に注目し、miR-145 transfectant において oligo microarray を行い、コントロールと比べて最も発現が低下した FSCN1 に注目した。FSCN1 はアクチン関連タンパクで癌細胞の遊走・浸潤に関係するという報告がある。我々は、膀胱癌における FSCN1 の制御機構の解明と機能解析を行った。

【材料および方法】

各 microRNA と FSCN1 の 3' 非翻訳領域との結合の有無は luciferase reporter assay にて確認した。各 microRNA および FSCN1 の機能解析として、膀胱癌細胞株 (BOY, KK47, T24) 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。また膀胱癌 66 検体において FSCN1 の発現を免疫染色で評価し、さらに in situ hybridization にて miR-145 と FSCN1 の発現を検討した。

【結 果】

oligo microarray では miR-145 transfectant において著明に発現が低下した遺伝子数は 200 であったが、その中で FSCN1 の発現はコントロールと比べて最も低下していた。Web データベースによる検索では miR-145 のみならず miR-133a も FSCN1 をターゲットとする可能性が示唆された。luciferase reporter assay では miR-145 と miR-133a は FSCN1 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。

miR-145 と miR-133a transfectant では mRNA レベル、タンパクレベルにおいて FSCN1 の発現が著明に抑制された。膀胱癌細胞の増殖、遊走、浸潤能は miR-145, miR-133a transfectant および si-FSCN1 transfectant において有意に抑制された。臨床検体による免疫染色では FSCN1 の発現強度とステージは有意に相関した。in situ hybridization では miR-145 の発現は腫瘍部において低下しており、逆に FSCN1 は強発現していた。

【結論及び考察】

膀胱癌においては miR-145 と miR-133a が直接 FSCN1 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。

(British Journal of Cancer Vol.102, No.5 2010年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 109 号		学位申請者	千代丸 剛
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	谷本 昭英
	副査	竹内 亨	副査	古川 龍彦

miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer

(膀胱癌における FSCN1 制御を介した miR-145 と miR-133a の癌抑制的作用)

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 のサブセットを報告した。その中で miR-145 と miR-133a 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-145 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 FSCN1 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 FSCN1 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 を行った。また膀胱癌 66 検体において FSCN1 の発現を免疫染色で評価し、さらに in situ hybridization にて miR-145 と FSCN1 の発現を検討した。

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-145 transfectant において著明に発現が低下した遺伝子数は 200 であり、その中で FSCN1 の発現はコントロールと比べて最も低下していた。
- 2) Luciferase reporter assay では miR-145 と miR-133a は FSCN1 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-145, miR-133a transfectant および si-FSCN1 transfectant において有意に抑制された。
- 4) 臨床検体による免疫染色では FSCN1 の発現強度と Stage は有意に相関した。
- 5) In situ hybridization では miR-145 の発現は腫瘍部において低下しており、逆に FSCN1 は強発現していた。

膀胱癌においては miR-145 と miR-133a が直接 FSCN1 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 FSCN1 の関連と機能を検討したものであり、その結果 FSCN1 の発現は、Stage に関係することが示された。また、FSCN1 が癌細胞自身の増殖能、遊走能、浸潤能を促進すること、さらにその働きは膀胱癌で発現が低下している miR-145, miR-133a で抑制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 109 号		学位申請者	千代丸 剛
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	谷本 昭英
	副査	竹内 亨	副査	古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成22年9月15日、学位申請者 千代丸 剛 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) Pre-microRNA と mature-microRNA の働きはどう違うか？

(回答) Pre-microRNA から Dicer と呼ばれる酵素により切断され mature-microRNA となり初めて機能する。Pre-microRNA は mature-microRNA の前駆体であり機能はないと考えられている。

質問2) Wound Healing assay は具体的にどのように行っているのか説明せよ。

(回答) 6 well plate に細胞を20万個まいて、48時間後にコンフルエントになった細胞シートの中央を20 μ L ピペットチップで直線状に細胞を剥がす。さらに24時間後に両側から細胞が遊走してくるので、その移動距離を測定する。

質問3) Fig. 1. の FSCN1 の mRNA とタンパクレベルで発現抑制に差がある理由は？

(回答) microRNA は mRNA を直接破壊することや mRNA からの翻訳を阻害することでタンパクの発現を抑制する。miR-145 では直接破壊したために FSCN1 mRNA が検出されず、miR-133a は主に翻訳阻害に働いたために FSCN1 mRNA は破壊されず、比較的その発現が高かったと思われる。これらの違いがどうして起こるかは不明である。

質問4) In situ hybridization ではすべてで miR-145 の発現は抑制されるのか？また、miR-133a の発現は確認したのか？

(回答) 免疫染色は66検体すべてで行っているが、コストの問題で In situ hybridization は数検体しか行っていない。そのいずれでも miR-145 は癌部で抑制されていた。miR-133a の発現は癌部で抑制されていたが、筋層等の正常部位と明らかな差は観察されなかった。この原因は不明である。

質問5) FSCN1 は正常上皮で発現が低下しており、神経系や間葉系組織で過剰発現しているの、EMTに関連する遺伝子ではないか？

(回答) FSCN1 の発現は浸潤度に相関があり、その可能性はあり得るが今後の検討が必要である。

質問6) 細胞株の中で FSCN1 の発現は KK47 が最も高いが、KK47 に focal growth の性質があるということであれば、FSCN1 が遊走・浸潤能と関連するということと逆の結果ではないか？

(回答) FSCN1 の細胞内の分布や活性は細胞外マトリックス components (TSP-1, IGF-1, NGF-1, fibronectin など) によって動的に制御されている。よって FSCN1 の発現量は単に遊走・浸潤能を反映しないこともありうる。

質問7) Fig. 3C, D に関して Wound healing assay では BOY, T24 とともに miR-145, 133a で遊走が抑制されているのに invasion assay では BOY のみでしか浸潤が抑制されていない。細胞株により違う結果が表れたのはなぜか？

(回答) Wound Healing assay は主に細胞の遊走を見る実験だが、同時に細胞の増殖能も反映していると思われる。Wound healing assay でみられた T24 の有意差は、その増殖能をおもに反映しているものと思われる。

質問8) Fig. 4D で T24 は FSCN1 をノックダウンすると浸潤が抑制されるのに、Fig. 3D では miR-145 をトランスフェクションしても T24 の浸潤が抑制されないのはなぜか？

(回答) miR-145 をトランスフェクションすると FSCN1 をノックダウンするが、他の遺伝子もノックダウンする。リストによれば200種類の遺伝子が1/2以下に抑制されている。これらの中に、FSCN1 による細胞浸潤能に拮抗する重要な pathway が存在するのかもしれない。

質問9) Table 2でFSCN1と同様の働きをもつような遺伝子はあるか？

(回答) PubMedで検索したが癌で重要な役割を果たしているという報告がある遺伝子はほとんどなかった。我々は他の癌腫(前立腺癌・食道癌)でも同様のアレイを行っており、共通して抑制される遺伝子にFSCN1とSWAP70があった。SWAP70はactin-binding proteinの一つであり、現在前立腺癌で機能解析が進行中である。

質問10) microRNAとsiRNAとの違いは？

(回答) siRNAはウイルスや植物内に存在し、最近では人でもわずかに存在することが分かってきた。両者とも低分子で遺伝子発現抑制作用を有する点は共通しているが、遺伝子発現抑制作用のメカニズムはsiRNAが、完全相補的な配列のmRNAを分解し遺伝子発現を抑制するのに対し、microRNAでは、mRNAに完全に相補的でない場合でもmRNAを分解せずに翻訳阻害のみを引き起こし発現を抑制するという相違点がある。またmicroRNAは内在遺伝子の発現調節のためのシステムで、siRNAは外来遺伝子に対応するための抑制システムであると考えられている。

質問11) トランスフェクションでリバース法を用いている理由は？

(回答) 従来のフォワード法より簡便で効率も良いため。

質問12) 免疫組織学染色で核も染色されているように見えるが？

(回答) これまでにFSCN1の核内発現の報告はない。実際のスライドを複数観察すると細胞質のみ染色されていると思われるが、その証明には共焦点レーザー顕微鏡を用いた実験が必要であり、今後検討したい。

質問13) RNAのアレイ解析は鹿児島大学泌尿器科で行われているか？

(回答) 共同研究施設である千葉大学の機能ゲノム学教室で行っている。

質問14) microRNAの取り扱いについて注意している点は？

(回答) 唾液中や汗にRNaseは含まれるため、マスクと手袋を装着している。

質問15) FSCN1や膀胱癌に関して職業や環境因子、ウイルスとの関連はあるか？

(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。またヒトパピローマウイルスと膀胱癌との関連を示唆する論文はあるが一般的とは考えられていない。

質問16) miR-145は発癌のどの段階で役割を担っているか？

(回答) FSCN1が細胞の遊走や浸潤にかかわり浸潤度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。

質問17) Luciferase assayでmiR-145が結合すると予測される部位は4か所中2か所という結果であったが、なぜその部位なのか？

(回答) Web上に公開されているmicroRNAの標的遺伝子検索サイトは複数ありいずれも独自のアルゴリズムを用いてmRNAの3'UTR上の結合部位を予測している。実際に結合するかどうかは、luciferase assayで証明して初めて判明する。現在、どのような配列パターンが結合に寄与するのか詳細なメカニズムはわかっていない。

質問18) microRNAは診断のマーカーとなるのか？治療のツールとなるのか？

(回答) 両方である。膀胱癌で発現の高いmicroRNAを尿中で検出し、診断のマーカーとして感度・特異度ともに高い結果が得られている。miR-145は腫瘍抑制効果が他の癌腫での報告も多くあり、in vivoでmiR-145を局注・静注することにより抗腫瘍効果を認めている。

質問18) microRNAの発現低下の機序は？

(回答) microRNAのプロモーター領域のメチル化、染色体のloss、microRNAをプロセッシングするDicer等の酵素の異常等が報告されている。

質問19) Western blotは72時間で評価しmRNAの発現は24時間で評価しているのはなぜか？

(回答) mRNAの発現はトランスフェクション後数時間で大きく変化が表れるのに対し、タンパク発現は72時間程度たたないと変化が現れないため。

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。