

Title	miR-130 familyの膀胱癌治療標的としての評価と seed-targeting LNAによる核酸医薬創製に向けた研究
Author(s)	江川, 博
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56169
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (江川 博)

論文題名

miR-130 familyの膀胱癌治療標的としての評価と
Seed-targeting LNAによる核酸治療薬創製に向けた研究

論文内容の要旨

膀胱癌は世界中で年間15万人近くの命を奪っており、罹患者数は年々増加している。特に浸潤性膀胱癌は極めて予後不良であり、革新的新薬が切望されている。私は治療標的としてnon-coding RNAの一種であるmicroRNA (miRNA)に注目し、膀胱癌部で発現上昇する4種類のmiRNA群を同定した。このうちmiR-130b, miR-301a, miR-301bの3種類は共通したSeed配列を有するfamily分子であった。新規性の観点から本研究ではmiR-130 familyに焦点を当てて解析を進めることとした。膀胱癌細胞を用いてmiR-130 familyの機能阻害実験を行った結果、細胞遊走能・浸潤能の低下が観察された。主に運動性を調節していると考えられたため、細胞の運動性に重要なストレスファイバー形成をPhalloidin染色によって評価すると、miR-301a/b阻害剤の導入によってこれが抑制されていた。関連するシグナル伝達経路であるFAK/Aktなどのリン酸化も抑制されており、これが遊走能低下機構の一端であると推測される。miR-130 family過剰発現UM-UC-2細胞を用いた解析ではこれらの表現型が亢進しており、miR-130 familyは細胞の運動性亢進によって膀胱癌悪性化に寄与していると推測された。

次にmiR-130 familyの標的遺伝子探索に着手し、候補遺伝子としてPTENに注目した。PTENはPI3K/Aktシグナル伝達経路の抑制遺伝子で、極めて有名な癌抑制遺伝子である。また脂質のみならずタンパク質にもホスファターゼ活性を示し、FAKのチロシン残基も基質として報告されていることから、ここまでで示されている表現型を制御できる。miR-130 family高発現UM-UC-2細胞においてDual-luciferase reporter assayとWestern blotを行った結果、miR-130b高発現細胞においてLuciferase活性並びにタンパク質量の低下を認めた。興味深いことにmiR-301a/b高発現細胞においてもPTEN発現低下が認められ、これらのmiRNAは間接的にPTENを下方制御していると推測される。PTENは細胞内局在によってもその安定性並びに活性が制御されるが、miR-130 family 高発現UM-UC-2細胞においては細胞膜局在が低下しており、これがその一端であると推察される。制御メカニズムに違いはあるが、miR-130 familyを高発現する5637細胞に対してPTENを過剰発現させたところ、細胞遊走能の抑制が確認されたので、確かにPTENは膀胱癌における重要な標的遺伝子と推測される。次にmiR-301a/bの標的遺伝子を同定するため、網羅的解析手法を駆使して新たな標的遺伝子の探索を試みた。miRNAはArgonaute2を含むタンパク質と共にRNA-induced silencing complex(RISC)を形成して機能するため、Ago2抗体を用いた免疫沈降によってmiRNAが標的とするmRNAを包括的に精製することが可能である。本研究においては臨床検体で最も高い発現量を示し、また顕著な表現型を示しているmiR-301b高発現細胞を使用してAgo2免疫沈降を行い、精製したmRNAに対してGene array解析を行った。Mock細胞株に対して沈降量が上昇したmRNAのうちmiR-130 familyの予測標的を抽出し、FAKに対する脱リン酸化酵素であるPTPN11/SHP-2に注目した。Dual-luciferase reporter assay並びにウエスタンブロット解析の結果miR-130b及びmiR-301bの標的遺伝子であることが解明された。PTPN11はその機能阻害変異体の導入によりストレスファイバーの形成並びに接着斑形成の促進が報告されているが、miR-130 family高発現UM-UC-2細胞においても接着斑の形成促進が観察されたことから、膀胱癌においてもmiR-130 familyの制御下で細胞骨格再編成に寄与している可能性が示唆された。ここまでの*in vitro*解析結果が臨床的に意義のあるものか判断するために、膀胱癌臨床検体を用いてPTEN並びにPTPN11/SHP-2の免疫組織化学を行った。12例の膀胱癌臨床検体のmiR-130 family発現量をRT-PCRにより測定し、高低3例ずつを選出した。両遺伝子共にmiR-130 family発現量と逆相関した染色像が観察でき、特にmiR-130 family発現量に最も差のある検体間ではその傾向は特に顕著であった。以上の結果より、実際の臨床症例においてもmiR-130 familyが2つのタンパク質発現を抑制している可能性が示唆された。

miR-130 familyのいずれもが膀胱癌でoncomiRとして機能することが解明されたため、family分子を同時に阻害するため、共通したseed配列を標的としたseed-targeting LNAをデザインした。過去の報告からseed-targeting LNAのデザインにおいては標的miRNAの2-9塩基目に相補的な配列が、最も効率的に標的miRNAを機能阻害することが明らかとなっている。これらの知見を踏襲してmiR-130 family seed-targeting LNAを設計、Dual-luciferase reporter assayによってこのLNA

が5637細胞の内在性miR-130 familyのいずれもを阻害することを確認した。膀胱癌細胞におけるLNAの表現型解析を実施した結果、正常様膀胱細胞株であるSV-HUC-1細胞の細胞増殖能に対しては影響を与えずに、5637細胞の細胞増殖能・細胞遊走能・細胞浸潤能をいずれも顕著に抑制した。これまでに観察されたストレスファイバー形成や関連シグナル分子の発現変動も観察でき、微弱ではあるがLNA単独でPTENとPTPN11に対する翻訳阻害の抑制と、タンパク質発現の回復が誘導された。以上の結果から膀胱癌においてもSeed-targeting という概念を適用することで、miRNA阻害効果を増強できる可能性が示唆された。最後にmiR-130 family seed-targeting LNAが抗腫瘍作用を示すかどうか*in vivo* xenograft modelを用いて検討を行った。5637細胞由来の腫瘍に対して、Controlもしくはseed-targeting LNAをアテロコラーゲンを担体として投与した結果、摘出腫瘍重量の低下傾向と相対腫瘍体積の有意な低下が観察された。

本研究により膀胱癌におけるongomiR-familyとしてmiR-130 familyとその標的遺伝子を複数同定し、更に同familyに対するSeed-targeting LNAが膀胱癌においても有効である可能性が示唆された。本研究が20余年間停滞していた膀胱癌治療の発展と一助となることを期待する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (江 川 博)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 辻川和丈
	副 査 教授 土井健文
	副 査 教授 水口裕之

論文審査の結果の要旨

膀胱癌は世界中で年間およそ38,000人が発症し、150,000人もの命を奪っている。初発性膀胱癌の55-60%は表在性癌として発症するが、経尿道的膀胱腫瘍切除術の予後は比較的良好で治療満足度も高い。一方で浸潤性膀胱癌患者の5年生存率は60%に留まっており、遠隔転移を呈する症例に至っては生存期間中央値が15カ月と非常に予後不良である。筋層浸潤を呈した浸潤性膀胱癌治療の第一選択は膀胱全摘出術であるが、患者の著しいQOL低下を招くという側面も併せ持っている。この状況はここ20年近く変わっておらず、有効な治療薬創成に繋がる標的分子の発見が期待されている。

このような背景において本研究では、治療標的としてnon-coding RNAの一種であるmicroRNA (miRNA)に注目した。miRNAは20-25bpのnon-coding RNAであり、標的mRNAの翻訳阻害あるいは分解によって遺伝子発現を制御することが知られている。また一つのmiRNAは平均200個もの標的遺伝子を有しており、また哺乳類の遺伝子の約60%はmiRNAによる制御を受けていると試算されている。つまり癌で発現上昇しているOncomiRを標的とすることで、多様な癌関連シグナル伝達経路を制御出来る可能性があると考えた。一方、それぞれの標的遺伝子に対するmiRNAの翻訳阻害作用は極めて小さいため、多様性を保ちつつ高い薬効を示すためには、複数の癌特異的miRNAを同時に標的とする戦略が有効であると考えた。そして研究により以下の知見を得た。

1. 腎盂尿管癌並びに膀胱癌臨床検体においてmiR-130b, miR-301a, miR-301bを含むmiR-130 familyが非癌部よりも高発現し、ステージやグレード進展に伴い発現上昇が観察される。
2. miR-130 familyは膀胱癌細胞の運動性亢進に寄与しており、FAKとAktのリン酸化レベルの向上、並びにMMP-9タンパク質発現上昇がその分子メカニズムの一端である。
3. 膀胱癌細胞株においてmiR-130bはPTENとPTPN11/SHP-2を、miR-301bはPTPN11/SHP-2を直接の標的遺伝子とする。
4. miR-130 family seed-targeting LNAは各miRNA個別阻害によって引き起こされる作用を単独で誘導し、更にin vivoで抗腫瘍作用を示す。

本研究では膀胱癌における治療標的分子としてmiR-130 familyを同定し、その標的遺伝子も複数明らかにした。さらに、miR-130 familyに対するSeed-targeting LNAが膀胱癌においても有効であることを示し、その膀胱癌治療薬としての可能性を明示した。

よって、上記研究成果は博士(薬科学)の学位を授与するにふさわしいものとする。