氏 名	南 幸 一 郎
(ふりがな)	(みなみ こういちろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成29年7月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	MiR-145 negatively regulates Warburg effect by silencing KLF4 and PTBP1 in bladder cancer cells (膀胱癌における KLF4 と PTBP1 を介した microRNA-145 とワーバーグ効果の関係性の解明)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 朝 日 通 雄 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

我々はこれまで miR(microRNA)-145 が膀胱癌細胞株に対して抗腫瘍作用を示すことを報告してきた。また、Warburg 効果は癌特異的なエネルギー代謝であることがメタボローム解析から明らかになりつつあり、我々は大腸癌において miR-124 や miR-133 が Warburg 効果を調節していることを報告してきた。加えて近年、miR-145 により発現が制御されている KLF4 と Warburg 効果の関係性が指摘されていたが、その詳細は明らかにされていなかった。本研究では miR-145/KLF4/PTBP1 ネットワークの膀胱癌における Warburg 効果の調節機構への関与の検証を目的とした。

《方 法》

ヒト正常尿路上皮細胞株 (HUC)、膀胱癌細胞株 (T24、253JB-V)、膀胱癌腫瘍サンプルにおける miR-145 の発現をリアルタイム PCR にて解析した。miR-145 の抗腫瘍作用を検証するため、膀胱癌細胞株に miR-145 を導入し、細胞動態および Warburg 効果関連蛋白発現を Western blot 法、ヘキスト染色、蛍光免疫染色にて検討した。miR-145 の Warburg 効果への修飾作用をさらに検討するため、siR-PTBP1、siR-c-Myc および siR-KLF4 を用いて同様の実験を行った。miR-145 の KLF4 プロモーター活性への修飾作用を検討するため、Luciferase assay 法を用いた。また、miR-145 導入の解糖系への影響を検討するため、エネルギー代謝産物である ATP や乳酸の測定も行った。さらに臨床サンプルにおいても Western blot 法ならびに免疫染色法にて Warburg 効果関連遺伝子の発現を検討した。

《結 果》

miR-145 の発現は、膀胱癌細胞株や膀胱腫瘍サンプルにおいて正常組織や正常尿路上皮細胞株に比し有意に低下していた。膀胱癌細胞株に miR-145 を導入すると著明に腫瘍増殖が抑制され、同時に Warburg 関連遺伝子である PTBP1、PKM2 の発現も抑制された。Luciferase assay 法にて miR-145 が KLF4 を直接標的にしており、miR-145 の細胞導入のみならず、KLF4 のノックダウンによっても腫瘍増殖抑制やアポトーシスが誘導され、その際に PTBP1 の著明な発現抑制も伴っていた。以上の結果から miR-145/KLF4/PTBP1 軸により Warburg 効果が調節され、miR-145 の導入により Warburg 効果が破綻し、細胞死が誘導されている可能性が示された。さらに miR-145 の導入により膀胱癌細胞株において、エネルギー代謝産物である ATP や乳酸も顕著に上昇していた。また、c-Myc のノックダウンにより KLF4 の mRNA の発現レベルが低下し、KLF4 のノックダウンにより c-Myc の mRNA の発現レベルが低下することから c-Myc と KLF4 は相互関係にあることが示唆された。

ヒト膀胱腫瘍サンプルにおいて、Western blot 法にて KLF4、PTBP1 および PKM2 の

発現を確認したところほぼ全例にて腫瘍組織で発現が上昇していた。免疫染色においても KLF4 は、腫瘍組織で顕著に発現していることが確認できた。

《考 察》

本研究では、膀胱癌において miR-145 が KLF4/PTBP1/PKMs 軸を介して Warburg 効果を調節していることが明らかになった。KLF4 と同様に miR-145 により発現が制御されている c-Myc も Warburg 効果調節因子として機能しているが、KLF4 と c-Myc の関係性は未知な部分が多く今後の研究課題である。また、microRNA という観点から見ると、本研究では膀胱癌において KLF4 は癌遺伝子として機能していることが示唆されたが、他の癌種では癌抑制遺伝子として働いているという報告もあり、今後様々な癌種で検証が必要である。

さらに、筋層非浸潤性膀胱癌における治療という観点から見ると、現状ではウシ型弱毒結核菌（BCG）注入療法が標準療法であるが、再発率が高い。膀胱癌細胞株およびヒト膀胱腫瘍サンプルにおいて miR-145 の発現は正常組織に比し著明に低下していたことから、今後は miR-145 補充療法による膀胱癌新規治療の可能性をさらに検討していきたい。

《結 論》

膀胱癌において miR-145 は KLF4 を標的にして、KLF4/PTBP1/PKMs 軸を介して Warburg 効果を調節していることが示された。

論文審査結果の要旨

筋層非浸潤性膀胱癌 (NMIBC : non-muscle invasive bladder cancer) は膀胱癌全体の 70~75% を占めるが、特に粘膜上皮結合織に浸潤している T1 膀胱癌は再発・進展率が高率であるため、再発・進展率の減少および再発後の治療は重要な課題である。T1 膀胱癌の術後補助療法として、ウシ型弱毒結核菌 (BCG) 注入療法は最も有効な標準治療として確立しているが、依然として腫瘍の再発・進展が問題となっているため新規治療法の開発が望まれている。MicroRNA(miR)-145 は様々な癌種において癌抑制性 miR の 1 つとして知られている。また、Warburg 効果は癌特異的なエネルギー代謝であることもメタボローム解析から明らかになっている。

本研究では miR-145 の膀胱癌に対する作用機序をさらに解明すべく miR-145 と Warburg 効果の関連性を検証した。miR-145 により発現が制御されている KLF4 と Warburg 効果の関連性は指摘されていたが、詳細は不明であった。そこで miR-145/KLF4/PTBP1 ネットワークが膀胱癌における Warburg 効果の重要な調節機構に関わっていることを明らかにした。また、Luciferase assay 法にて miR-145 が KLF4 を直接標的にしていることが確認された。miR-145 の細胞導入、KLF4 のノックダウンにより、腫瘍増殖抑制のみならずアポトーシスも誘導されていた。膀胱腫瘍サンプルにおいても KLF4 や PTBP1 の蛋白発現上昇が見られ、KLF4 が膀胱癌においては癌遺伝子として作用している可能性が示唆された。

本研究は、癌抑制性 miR の 1 つとして知られている miR-145 が、膀胱癌における Warburg 効果の調節因子としての働くことを明らかにし、同時に miR-145 あるいは Warburg 効果調節を介した抗腫瘍作用についても言及している。この知見は、依然として再発・進展のコントロールが困難な NMIBC において、miR-145 補充療法という新規治療の可能性を示し、その基盤的メカニズムを提供するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncotarget 20(8): 33064-33077, 2017

doi: 10.18632/oncotarget.16524 〈オンライン掲載〉