

氏 名	高 井 朋 聡
(ふりがな)	(たかい ともあき)
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30年1月24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	A novel combination RNAi toward Warburg effect by replacement with miR-145 and silencing of PTBP1 induces apoptotic cell death in bladder cancer cells (Warburg 効果を標的とした miR-145 導入及び PTBP1 抑制を併用する新規 RNA 干渉治療戦略は膀胱 癌においてアポトーシスを誘導する)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 近 藤 洋 一 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

膀胱癌は泌尿器悪性腫瘍のなかで予後不良の悪性腫瘍として知られており、年々増加傾向にある。膀胱癌は非筋層浸潤性膀胱癌 (NMIBC) と筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) の大きく 2 種類に分けられる。NMIBC は 5 年膀胱内再発率が 50-90% と非常に高く、さらにそのうちの 20% は再発時に MIBC へと進行する。MIBC の標準治療は手術療法だが、5 年生存率は 60% と決して高くない。転移性膀胱癌の標準治療は白金製剤中心の化学療法であるが薬剤耐性獲得や再発などの問題が多く、新規治療が必要な泌尿器悪性腫瘍の一つである。我々は癌特異的エネルギー代謝現象である Warburg 効果が microRNA により抑制されて

いる事を報告しており、microRNA が悪性腫瘍に対して新規治療戦略になる可能性を検討してきた。本研究では特に miR-145 に注目して、Warburg 効果を正に制御するがん遺伝子 PTBP1 に対する修飾効果を、Warburg 効果に関与する様々なカスケードとともに詳細に検討し、miR-145 を用いた膀胱癌細胞株に対しての抗腫瘍効果の検討及びその機能的解析を行った。

《材料および方法》

in vitro および *in vivo* の実験にヒト膀胱癌細胞株である 253JB-V と T24 を用いた。また同一臨床症例から採取した正常膀胱粘膜および膀胱癌の検体 12 症例計 24 検体を用いた。以上の膀胱癌細胞株及び臨床検体を用いて以下の実験を行った。

1. 定常状態の 253JB-V、T24 から RNA を採取した。市販のヒト正常尿路上皮細胞(Human Urothelial Cell:HUC)からも RNA を抽出し、それぞれの miR-145 の発現量を RT-PCR 法で比較した。さらに臨床検体の正常膀胱粘膜と膀胱癌から RNA を採取し同様に miR-145 の発現量を RT-PCR 法を用いて比較した。
2. 253JB-V と T24 を用いて hsa-miR-145 あるいは hsa-miR-145 + antagomiR-145 を導入し、トリパンブルー色素排除試験法にて各処置での生細胞数を陰性 control と比較した。次に Western blotting 法を用いて miR-145 で制御される既知の FSCN1 とともに、apoptosis の指標である cleaved PARP の発現量を比較検討した。さらに Hoechst 33342 staining 法を用いて形態も検索した。
3. hsa-miR-145、siR-PTBP1、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の各処置を行った 253JB-V と T24 において propidium iodide および annexin V の発現をマーカーとした apoptosis 細胞数の比較検討を行った。
4. 臨床症例から採取した正常膀胱粘膜と膀胱癌において、PTBP1 および PTBP1 のターゲット遺伝子である PKM2 のタンパク発現量を Western blotting 法を用いて比較検討した。

5. 253JB-V と T24 を用いて hsa-miR-145(10 nM、40 nM)、siR-PTBP1(2 nM、5 nM)、の各処置に加えて、c-Myc が PTBP1 を制御することに着目して siR-c-MYC(2 nM、5 nM)を transfection したのちに、トリパンブルー色素排除試験法で細胞増殖を、Western blotting 法を用いて c-Myc、PTBP1、PKM1、PKM2 のタンパク発現量を各処置間で比較検討した。
6. 253JB-V と T24 を用いて hsa-miR-145、siR-PTBP1、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の各処置を行い、トリパンブルー色素排除試験法を用い細胞増殖を、Western blotting 法を用いて c-Myc、PTBP1、PKM2 に加えて PKM2 の splicing isoform である PKM1 のタンパク発現量を、AKT、ERK1/2 についてはタンパク発現量とリン酸化を、RT-PCR 法を用いて PTBP1 及び c-Myc の mRNA の発現量を、ATP assay 法及び Lactate assay 法を用いて ATP 及び Lactate の産生量を各処置間で比較検討した。
7. 253JB-V と T24 を用いて hsa-miR-145、siR-PTBP1、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の各処置後、Western blotting 法を用いて autophagy 及び apoptosis のマーカーである LC3B と PARP の各タンパク発現量を、Hoechst 33342 staining 法を用いて apoptosis 誘導の有無についての比較検討を行った。さらに、電子顕微鏡を用いて形態学的変化の比較検討を行った。
8. 5 週齢のヌードマウス (BALB/cSLC-nu/nu) の右脇腹に 253JB-V を皮下移植し、control 群、hsa-miR-145 群、siR-PTBP1 群、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 群の 4 群に分けて 3 日毎に移植腫瘍内に各処置を行い、その修飾効果について 3 週間後に比較検討した。

《結 果》

1. 膀胱癌の検体では正常膀胱粘膜と比較して miR-145 の発現量は有意に低下していた。253JB-V と T24 でも HUC と比較して miR-145 の発現量も低下していた。

2. 253JB-V と T24 において miR-145 処置は有意に細胞増殖を抑制し、同時に cleaved PARP の発現量を増加させた。さらに、Hoechst 33342 staining 法では核の断片化が確認され、hsa-miR-145 による apoptosis の誘導が示唆された。
3. 253JB-V と T24 において control と比較して hsa-miR-145、siR-PTBP1、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の処置で apoptosis 細胞数が有意に上昇している事が Annexin assay 法で確認され、特に hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の combination 処置で apoptosis が著明であった。
4. 臨床検体から採取した正常膀胱粘膜と比較して膀胱癌において PTBP1 および PKM2 の発現量が増加していた。
5. 253JB-V と T24 において、control と比較して hsa-miR-145 処置は濃度依存性に PTBP1 及び PKM2 の発現量を減少させた。さらに PKM2/PKM1 ratio の低下も同時に確認された。siR-PTBP1 及び siR-c-MYC 処置でも同様の所見が得られた。ゆえに、hsa-miR-145 は c-MYC/PTBP1/PKM axis の調節を行っていることが示唆された。
6. 253JB-V と T24 において control と比較して hsa-miR-145、siR-PTBP1 処置で有意な細胞増殖抑制が確認された。さらに、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の combination 処置により、hsa-miR-145、siR-PTBP1 の各 single 処置と比較して更なる有意な細胞増殖抑制効果が確認された。また、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 処置において c-Myc、PTBP1、PKM2、AKT のタンパク発現量の著明な低下と AKT のリン酸化の抑制が認められた。加えて PTBP1 及び c-Myc の mRNA の発現量の低下も確認された。ATP assay 法及び Lactate assay 法により、control と比較して hsa-miR-145、siR-PTBP1、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 処置のいずれにおいても ATP と Lactate の産生亢進が示された。
7. 253JB-V と T24 において、hsa-miR-145 処置で cleaved PARP の発現量の上昇、siR-PTBP1 処置で LC3BI から II への移行、hsa-miR-145 + siR-PTBP1 処置で cleaved PARP の発現量の上昇及び LC3BI から II への移行が認められた。Hoechst 33342 staining 法では、特に hsa-miR-145 + siR-PTBP1 処置において apoptosis 細胞数の増加が確認された。電子顕微鏡で apoptosis の特徴である核の断片化が hsa-miR-145 及

び hsa-miR-145 + siR-PTBP1 処置で、autophagy の特徴である autophagosomes が siR-PTBP1 及び hsa-miR-145 + siR-PTBP1 処置で確認された。

8. 253JB-V のヌードマウス皮下移植モデルでは、control 群と比較して hsa-miR-145 群、siR-PTBP1 群に腫瘍増殖抑制が確認された。hsa-miR-145 + siR-PTBP1 の combination 処置群では、各 single 処置群に比して腫瘍体積の縮小程度がより強い傾向にあった。hsa-miR-145 群で c-Myc、PTBP1、PKM2、AKT、ERK の発現量の低下、AKT、ERK のリン酸化の抑制が確認された。しかし siR-PTBP1 群では c-Myc の発現量の亢進が確認された。その一方で hsa-miR-145 + siR-PTBP1 群では hsa-miR-145 群と比較して更なる c-Myc、PTBP1、PKM2、AKT、ERK の発現量の低下、AKT、ERK のリン酸化の抑制が確認された。

《結 論》

本研究で膀胱癌の臨床検体および膀胱癌細胞株である 253JB-V および T24 において miR-145 の発現量は著明に低下していた。miR-145 の補充又は PTBP1 をノックダウンする事により、膀胱癌細胞株に細胞死が誘導され、そのメカニズムとして PTBP1/PKM axis の脱調節による Warburg 効果の破綻誘導が示唆された。さらに miR-145 の補充と PTBP1 のノックダウンを併用することにより、膀胱癌細胞株により強い細胞死誘導とともに、c-MYC/PTBP1/PKM axis の機能のより強い抑制が確認された。これらの知見により、RNAi 技術を用いた miR-145 補充と PTBP1 ノックダウンの併用は、膀胱癌に対するより効果的な新規治療になり得る可能性が示された。

論文審査結果の要旨

膀胱癌は組織学的に非筋層浸潤性膀胱癌 (NMIBC) と筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) の大きく 2 種類に分けられる。膀胱癌の臨床上の問題点として、NMIBC については膀胱内再発率の高さと再発時の MIBC への進行、MIBC と転移性膀胱癌に関しては標準薬物治療への抵抗性の獲得や長期生存率の低さなどがあげられる。それらの問題克服を目指した新規治療戦略の候補として RNAi 技術の応用が注目されており、膀胱癌と microRNA との関連性についての報告も増えつつある。そこで申請者は、癌特異的エネルギー代謝現象である Warburg 効果への microRNA による修飾作用とそのメカニズムを検討し、microRNA を用いた Warburg 効果の破綻を介する腫瘍抑制という新たな治療戦略の可能性を検討した。

まず申請者は、臨床検体及びヒト膀胱癌細胞株において miR-145 の発現量が著明に低下していることを確認した。次に、miR-145 の補充により、膀胱癌細胞株に細胞増殖を抑制するとともに apoptosis を誘導することが示された。さらに Warburg 効果を調節しているタンパクの一つである PTBP1 をノックダウンする事により、細胞増殖が有意に抑制されることを見出した。そのメカニズムとして、miR-145 の補充あるいは PTBP1 のノックダウンはいずれも、PTBP1/PKM2 axis を調節することにより増殖抑制効果を発揮する可能性を示唆した。さらに miR145 の補充と PTBP1 の抑制の併用は、in vitro のみならず in vivo においても c-MYC/PTBP1/PKMs axis の機能を強く抑制し、より効果的な腫瘍抑制が得られる可能性を示した。

申請者は本研究で、膀胱癌細胞に対する核酸治療の一つとして miR-145 の補充および PTBP1 の抑制を併用する治療戦略の可能性を追求し、その理論的根拠として癌特異的代謝現象である Warburg 効果を破綻させる機能解析を詳細に行っており、大変意義深いものと思われる。RNAi 技術を用いた核酸治療の臨床応用には課題が多いが、本研究の結果は今後の膀胱癌に対する治療戦略に重要な知見を提供するものと考えられる。

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)

Internal journal of molecular sciences

18(1): 179, 2017 doi: 10.3390/ijms18010179 <オンライン掲載>