

論文内容要旨

論文題目

GSK-3 β を標的にした miR-199a の再発現は腎細胞癌の増殖と生存を抑制する

責任講座：腎泌尿器外科学 講座

氏名：槻木 真明

【内容要旨】(1,200字以内)

【目的】GSK3 β (Glycogen synthase kinase-3 β)は、腎癌細胞において核内に高発現し、NF- κ Bを通じて、XIAPやBcl-2といった抗アポトーシス因子の発現を上昇させ、癌の生存や増殖を促進する。逆にGSK3 β を阻害するとその発生や増殖が抑制されることも示されている。また、近年約22塩基長のnon-coding RNAであるmicroRNAがmRNAを分解もしくは翻訳阻害することによってタンパク質の発現を制御していることが明らかになってきている。およそ6割のmRNAがその制御下にあると考えられており、発癌や癌進展にも大きく関わっている。データベース上ではmiR-199aはその塩基配列からGSK3 β のmRNAを抑制し、その発現を抑制することが予想され、新たな治療のターゲットとなる可能性がある。そこで我々はmiR-199aの再発現が、腎細胞癌においてGSK3 β を抑制し、癌の生存や増殖を抑制するか研究した。

【方法】臨床検体として54対の正常腎組織と腎細胞癌組織と、2対の正常腎組織と血管筋脂肪腫組織を用い、miR-199aの発現と進行度や再発率との関連、および免疫染色によりGSK3 β との関連を調べた。また7つの腎細胞癌株におけるmiR-199aの発現を調べた。さらに3つの腎癌細胞株(Caki1, ACHN, A498)にpre-miR-199aを導入し、72時間後のGSK3 β やXIAP、Bcl-2の発現をウェスタン法で調べ、細胞の生存についてはMTSアッセイ、増殖についてはBrDUアッセイで測定した。また腎癌におけるmiR-199a発現低下の原因を調べるために、2つの腎癌細胞株(ACHN, Caki1)において、miR-199aがコードされているchromosome 1およびchromosome 19のCpG配列のDNAメチル化解析をパイサルファイト処理により施行した。さらに同じ細胞株においてmiR-199aがGSK3 β のmRNAを抑制するメカニズムが、分解か翻訳阻害かを調べるため、pre-miR-199aを導入した上でGSK3 β のmRNAの発現をウェスタン法で調べた。

【結果】臨床検体では癌症例の54例中32例(59%)でmiR-199aが発現低下しており、発現とT Stageに逆相関が認められた(pT1 vs pT2-4, p=0.04)。再発率ではmiR-199aが高発現群の方が低発現群よりも再発率が高い傾向にあったが、有意差はなかった(p=0.08)。免疫染色での比較では、発現に反比例してGSK3 β が染色されない傾向にあった(P=0.02)。血管筋脂肪腫では、2例ともmiR-199aが高発現していた。また、7つの腎細胞癌株すべてでmiR-199aの発現が低下していた。3つの腎癌細胞株に対するmiR-199aの再発現では、すべてにおいてcontrolに対してGSK3 β の発現低下およびXIAP、Bcl-2の発現低下が確認され、アポトーシスの指標であるPARPのcleavageも確認された。MTSアッセイ、BrDUアッセイにおいては、生存細胞数の減少および細胞増殖の減少を認めた。DNAメチル化解析ではACHNとCaki1においては、chromosome 1およびchromosome 19のCpG配列のほとんどがメチル化されていることが認められた。さらに細胞株にpre-miR-199aを導入してもGSK3 β のmRNAの発現は変わらず、miR-199aはGSK3 β のmRNAの翻訳を阻害することが示唆された。

【結論】miR-199aの再発現は、腎細胞癌においてmRNAの翻訳を阻害することによりGSK3 β を抑制し、新たな治療のターゲットとなる可能性がある。

平成 24年 1月 12日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 槻木 真明

論文題目： **Re-expression of miR-199a suppresses renal cancer cell proliferation and survival by targeting GSK-3 β** (GSK-3 β を標的にした miR-199a の再発現は腎細胞癌の増殖と生存を抑制する)

審査委員：主審査委員 北中 千史

副審査委員 富田 善彦

副審査委員 根本 建二



審査終了日：平成 24年 1月11日

【 論文審査結果要旨 】

腎細胞がん治療の中心は外科的切除であるが、約3分の1の症例は診断時すでに転移巣を有しており、約半数の症例で術後経過中に転移再発を認める。然るに、腎細胞がんは一般的に従来の放射線や殺細胞的な化学療法に対して高度抵抗性であることから、現状では転移に対する治療の選択肢は極めて限定的にならざるを得ない。従って、腎細胞がんの治療成績向上には、新たなアプローチによる新規治療法の開発が必須である。

このようななか、申請者らのグループは近年、腎細胞がんの新たな治療標的候補としてGSK-3 β を見いだした。GSK-3 β は腎細胞がんの核内に高発現しており、Bcl-2やXIAPといった抗アポトーシス分子の発現誘導を介して腎細胞がん細胞にアポトーシス抵抗性を賦与している。このことは、GSK-3 β 阻害薬自体が腎細胞がんに対する有力な分子標的治療薬となりうることを意味するが、この度申請者らは、より選択的・効果的な新規治療法開発の可能性を念頭に、腎細胞がん細胞におけるGSK-3 β の発現や機能に影響を与える分子の探索を行った。そしてその結果見いだされたのがmiR-199aである。

mRNAの分解や翻訳阻害により遺伝子機能を抑制することで知られるマイクロRNAを介したGSK-3 β 発現制御の可能性について考えた申請者らは、GSK-3 β を標的とする可能性のあるマイクロRNAをデータベース探索し、miR-199aを候補として見いだした。そこでまずmiR-199a発現とその核内GSK-3 β との関係を54例の腎細胞がん症例を用いて検討したところ、約6割の症例で発現低下が認められ、核内GSK-3 β の発現との間には有意な逆相関が認められた。この結果はmiR-199aがGSK-3 β の発現を抑制しており、失われたmiR-199aの再発現がGSK-3 β 発現抑制を介して治療的意義をもつ可能性を支持するものである。そこでこのような可能性につき種々の腎細胞がん細胞株を用いて*in vitro*での検討を行った結果、miR-199aを発現せず核内GSK-3 β を高発現するこれら細胞株に対して外来性のmiR-199aを強制的に発現させると、GSK-3 β の発現抑制とともにBcl-2, XIAPの発現が抑制され、アポトーシス誘導により細胞増殖が抑制されることが確認された。

以上の結果はmiR-199aがGSK-3 β を介する腎細胞がん細胞の増殖(生存)制御に関与しうることを初めて明らかにしたものである。治療標的としての選択性、有効性、安全性等に関する評価は今後の研究成果を待つ必要があるが、腎細胞がん治療における新たな分子標的候補同定という観点において、明らかに有用な知見を与えるものである。従って本審査委員会は本研究が学位(医学)の授与に値するものと判定する。

(1, 200字以内)