

論文内容要旨

Microtubule-associated protein tau (MAPT) is a promising independent prognostic marker and tumor suppressive protein in clear cell renal cell carcinoma

(淡明細胞型腎細胞癌において、微小管関連タンパク質タウ (MAPT) は、有望な独立した予後マーカーおよび腫瘍抑制タンパク質である)

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, Volume 38, Pages 605.e9-605.e17, 2020

主指導教員：工藤 美樹 教授

(医系科学研究科 産科婦人科学)

副指導教員：木内 良明 教授

(医系科学研究科 視覚病態学)

副指導教員：亭島 淳 准教授

(医系科学研究科 腎泌尿器科学)

韓 向銳

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

Abstract

Introduction:

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common subtype of RCC, accounting for approximately 70% of all RCCs. Surgical tumor resection is the standard therapy for ccRCC because ccRCC exhibits resistance to radiotherapy and chemotherapy. Around 30% of patients suffer a recurrence or metastasis after surgery. Although several targeted agents and immune checkpoint inhibitors have been applied to patients with metastatic ccRCC, the overall survival of patients in the terminal stage of the disease is unsatisfactory. Therefore, to clarify the molecular mechanisms underlying ccRCC progression will greatly improve outcomes for patients with ccRCC. Microtubule-associated protein tau (MAPT) overexpression has been linked to poor prognosis in several cancers. MAPT-AS1 is a long non-coding RNA existing at the anti-sense strand of the MAPT promoter region. The clinical significance of MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC is unknown. This study aimed to assess the expression and function of MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC.

Methods:

The expression of MAPT was determined using immunohistochemistry in ccRCC. The effects of MAPT knockdown on cell growth and invasion were evaluated and the interaction between MAPT and MAPT-AS1 were analyzed. The expression of MAPT-AS1 was determined using qRT-PCR in ccRCC tissues. We investigated the effect of MAPT-AS1 knockdown on cell growth and invasion. We further analyzed the role of p53 on the regulation of MAPT and MAPT-AS1.

Results:

We performed immunohistochemistry to analyze the expression of MAPT in 135 ccRCC tissue samples. Weak or no staining of MAPT was observed in the non-neoplastic kidney, whereas stronger and more extensive staining was observed in ccRCC tissue. Staining of MAPT was mainly detected in the cell membrane and cytoplasm of ccRCC tissue. In total, 83 (61%) of the 135 ccRCC cases were positive for MAPT. The positive case of MAPT was associated with low nuclear grade and low T and M0 status. A Kaplan-Meier analysis revealed that MAPT positive cases were associated with favorable overall survival ($p < 0.001$) which was consistent with the results from TCGA database. Furthermore, we performed univariate and multivariate Cox proportional hazard analyses to evaluate the potential use of MAPT expression as a prognostic factor. In these multivariate models, high MAPT expression was independently associated with favorable overall survival (hazard ratio 0.51; $p = 0.043$). To determine the functional significance of MAPT in ccRCC, we used siRNA targeting MAPT. Western blotting showed that the expression of MAPT was higher in 786-O than in Caki-1 cells. We confirmed the efficiency of MAPT knockdowns by western blotting and qRT-PCR in 786-O cells. Knockdown of MAPT enhanced cell growth and invasion in 786-O cells. Some reports demonstrated that the expression of a sense gene is regulated by forming RNA duplex between an antisense gene and a sense gene. Therefore, we examined the interaction between MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC. We analyzed the expression of MAPT and MAPT-AS1 in 41 ccRCC tissues by qRT-PCR. There was a significantly positive correlation between MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC ($p < 0.001$, $R = 0.69$), which was consistent with the findings from the TCGA-KIRC database ($p < 0.001$, $R = 0.81$). To verify this interaction, we analyzed the effect of MAPT-AS1 knockdown on the expression of MAPT. Western blotting showed that knockdown of MAPT-AS1 suppressed the expression of MAPT in 786-O cells. What is more, qRT-PCR showed that knockdown of MAPT suppressed the expression of MAPT-AS1 in 786-O cells. These results suggest that there was a reciprocal regulation between MAPT and MAPT-AS1. To investigate whether MAPT-AS1 and MAPT may form RNA duplex, we performed qRT-PCR assays using RNA polymerase inhibitor: α -amanitin. qRT-PCR revealed that knockdown of MAPT-AS1 decreased the stability of MAPT mRNA, indicating that MAPT-AS1 and MAPT might form RNA duplex. To determine the clinical significance of MAPT-AS1 in ccRCC, we studied the expression of MAPT-AS1 in 41 ccRCC tissues and their corresponding normal kidney tissues by qRT-PCR. The expression of MAPT-AS1 was higher in ccRCC tissue than in their corresponding normal

kidney tissues ($p < 0.001$). MAPT-AS1 expression was increased in T2 stage and M0 status compared to in T3 stage and M1 status. Kaplan-Meier analysis showed that the high expression of MAPT-AS1 was associated with favorable overall survival after nephrectomy in TCGA database. To determine the functional significance of MAPT-AS1 in ccRCC, we used siRNA targeting MAPT-AS1. Knockdown of MAPT-AS1 promoted cell growth and invasion activity. To analyze the regulation of MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC, we focused on p53. We generated p53 knockout cells using a CRISPR-P53 vector. Western blotting showed that p53 expression was not detected in 786-O cells transfected with a CRISPR-P53 vector. Western blotting demonstrated that p53 knockout suppressed the expression of MAPT. qRT-PCR revealed that p53 knockout decreased the expression of MAPT-AS1. These results indicate that p53 may regulate the expression of MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC.

Conclusion:

Our study revealed that high expression of MAPT and MAPT-AS1 was associated with favorable prognosis in ccRCC. We also found a positive correlation between MAPT and MAPT-AS1. Knockdown of MAPT and MAPT-AS1 enhanced cell growth and invasion in 786-O cells. p53 may regulate the expression of MAPT and MAPT-AS1 in ccRCC. MAPT and MAPT-AS1 may play tumor-suppressive roles and serve as promising potential biomarkers of prognosis after nephrectomy in ccRCC.

目的

淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)は、腎細胞癌(RCC)の約 70~80%を占め、手術療法が標準的に施行されるが、約 30%の症例において手術療法後に再発・転移を認める。近年、進行性 RCC に対して、多くの分子標的治療薬、免疫療法が導入されてきたが、その治療成績は未だ満足のいくものではない。ccRCC に対する最適な治療戦略を確立するために、その進行、転移のメカニズムの解明は重要な課題である。MAPT(microtubule-associated protein tau)は微小管結合タンパク質の一種として発見され、微小管の重合や安定化を調節している。また MAPT-AS1 は MAPT のプロモーター領域に存在する long non coding RNA であるが ccRCC における、発現、機能解析について、これまでに報告はない。本研究では ccRCC における MAPT および MAPT-AS1 の発現および機能解析を行った。

方法

ccRCC に対する外科的摘除標本を用いて MAPT の免疫染色を行い、臨床病理学的因子および予後について解析した。MAPT の siRNA および RCC 細胞株を用いて細胞増殖能、細胞浸潤能の機能解析を行った。qRT-PCR を用いて、腎癌組織および非癌組織における MAPT-AS1 の発現解析を行い、MAPT と MAPT-AS1 の相互関係について検討した。In silico 解析で MAPT、MAPT-AS1 の発現および相互関係について妥当性を解析した。MAPT-AS1 の siRNA および RCC 細胞株を用いて細胞増殖能、細胞浸潤能の機能解析を行った。p53 ノックアウト細胞株を作成し、p53 と MAPT、MAPT-AS1 の関連について解析した。

結果

腎摘除標本 135 例で MAPT の免疫染色を施行したところ、MAPT は細胞膜および細胞質に染色された。MAPT は非癌部に比べ癌部で高発現しており、83 例(61%)で陽性であった。陽性症例と臨床病理学的因子との関連を解析したところ、陽性症例では弱い核異型度、低い T stage、転移を有しない症例と有意な相関関係を認めた。Kaplan-meier 法による生存分析では、MAPT 陽性群は有意に予後良好であった($p < 0.001$)。多変量解析で、MAPT の高発現は独立した予後良好因子であった($p = 0.043$)。MAPT が高発現している RCC 細胞株 786-O において、siRNA を用いて MAPT をノックダウンすると細胞増殖能、浸潤能が亢進した。ccRCC における MAPT と MAPT-AS1 の相互的な関連を明らかにするために、摘除組織において MAPT と MAPT-AS1 の発現を解析すると有意な相関関係がみられ($p < 0.001$, $R = 0.69$)、public database(TCGA KIRC)でも同様の結果が得られた。786-O において MAPT をノックダウンすると、MAPT-AS1 の発現が、MAPT-AS1 をノックダウンすると MAPT の発現が、それぞれ抑制された。さらに α -amanitin を用いて、RNA duplex の形成について検討したところ、MAPT と MAPT-AS1 は RNA duplex を形成して相互に関与していることが示された。腎癌組織および非癌組織における MAPT-AS1 の発現を解析したところ、非癌組織に比べ癌組織で高発現していた。臨床病理学的因子との関連について解析すると、低い T stage および転移を有しない症例で MAPT-AS1 の高発現を認めた。TCGA KIRC を用いた予後解析では、MAPT-AS1 高値群は有意に予後良好($p < 0.001$)であった。MAPT-AS1 が高発現している 786-O において siRNA を用いて MAPT-AS1 をノックダウンする

と、細胞増殖能、浸潤能が亢進した。先行研究において MAPT と p53 との関連が報告されている。そこで、CRISPR-Cas9 を用いて p53 ノックアウト RCC 細胞株を樹立したところ、MAPT、MAPT-AS1 共に発現の低下がみられ、MAPT、MAPT-AS1 の発現制御に p53 が関わっていることが示唆された。

結論

ccRCC において MAPT、MAPT-AS1 は高発現しており、癌の進行と共に発現は低下した。また RCC 細胞株において MAPT、MAPT-AS1 をノックダウンすると細胞増殖能、浸潤能が亢進し、これらが腫瘍抑制的に機能していることが示唆された。さらに MAPT、MAPT-AS1 の発現には相関関係があり、その制御に p53 が関与していること、RNA duplex を形成し相互作用を有すると思われることから、ccRCC において重要な分子機構に関与している可能性が示唆される。本研究の結果から MAPT、MAPT-AS1 は新たな予後予測マーカーとしての有用性が期待できると考える。