

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390427

研究課題名(和文) マイクロRNA発現制御による尿路上皮癌の新規治療の開発

研究課題名(英文) Developing new treatment modalities of urothelial carcinoma through regulating microRNA expression

研究代表者

中川 昌之 (NAKAGAWA MASAYUKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90164144

研究成果の概要(和文)：我々は臨床尿路上皮癌において667種類microRNAスクリーニングを行い、構築したプロファイルに基づいて、癌抑制的microRNA(miR-1, miR-218, miR-133a, miR-145, miR-517a)の同定とそれらの標的遺伝子(FSCN1, LASP1, TAGLN2, GSTP1)の機能解析を行った。また発現が上昇していたmiR-96, miR-183の尿中マーカーとしての有用性を検討した。

研究成果の概要(英文)：We screened 667 microRNAs in urothelial carcinoma specimens and identified the profile of down-regulated miRNAs, such as miR-1, miR-133a, and miR-145, which have tumor suppressive function. These miRNAs directly repressed the expression levels of novel oncogenic genes, such as FSCN1, LASP1, and GSTP1. On the other hand, miR-96 and miR-183, which were the top two up-regulated miRNAs in the profile, were subjected to tests for evaluating their ability as urine markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：泌尿器腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：マイクロRNA、尿路上皮癌、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌をはじめとする尿路上皮癌は再発が多く、再発を繰り返すことで浸潤・転移をきたすことが特徴である。我々は以前、

尿路上皮癌の浸潤には癌抑制遺伝子 p53 や RB の制御遺伝子である p16^{INK4a} や p14^{ARF} の過剰メチル化が深く関与していることを明らかにした。癌抑制遺伝子の過剰メチル化が

おこると腫瘍の浸潤性が高まり有意に予後不良となる。さらに DNA マイクロアレイ法により浸潤性癌と表在性癌の遺伝子プロファイルを検討したところ、浸潤癌では細胞周期関連遺伝子である SKP2 と CKS1 の発現が有意に上昇し、これらのユビキチン化作用により分解が促進される p27 の発現が低下することが観察された。さらにこれらの遺伝子を small interfering RNA (siRNA) で発現抑制すると有意に膀胱癌の増殖が抑制されることを観察した。

microRNA (miRNA) は 21 塩基前後からなる短い RNA で、標的遺伝子のメッセンジャーRNA の 3'-UTR をブロックして蛋白合成を妨げる働きをする。研究開始当初、miRNA は細胞増殖、細胞死、神経細胞、脂肪細胞、血液細胞の分化増殖に重要な役割をしていることが明らかにされつつあった。癌の領域では癌抑制遺伝子の転写や発現における miRNA の役割が非常に大きく、癌の発生や進展に関わっていることが報告されつつあった。しかしながら尿路上皮癌における miRNA の研究は皆無であった。研究開始当時、我々は代表的な 156 種類の miRNA の中から尿路上皮癌で発現変動する miRNA を探索し、27 種類の miRNA が癌部で有意に発現変動していることを見出していた。さらに、miRNA が post-transcriptional な遺伝子発現レベルを抑制するのみでなく、過剰メチル化を来した癌抑制遺伝子 (p21) のプロモーター領域に直接結合して逆に転写促進作用を有する可能性を明らかにしていた。このように miRNA は、尿路上皮癌において既知あるいは未知の遺伝子を直接的および間接的に制御して尿路上皮癌の進展に深く関与していると考えられ、研究を進める動機となった。

2. 研究の目的

本研究の目的はmiRNA分子ネットワークを介した尿路上皮癌における新しい発癌機序の解明であった。667種類のmiRNAのスクリーニングによる「尿路上皮癌miRNAプロファイル」を作成して、尿路上皮癌で有意に発現が低下しているmiRNAを臨床検体で検証した。さらにそれらのmiRNAのgain-of-function studyを行い、尿路上皮癌細胞の cell viabilityにどのような影響を与えるか調べた。さらにアルゴリズム解析による標的遺伝子検索を行い、有望な遺伝子については *in vitro* で loss-of-function study を行いその機序を研究した。尿路上皮癌で有意に発現が上昇していた遺伝子については、癌診断マーカーや再発予測マーカーになる可能性を、臨床組織検体や尿検体にて検討した。

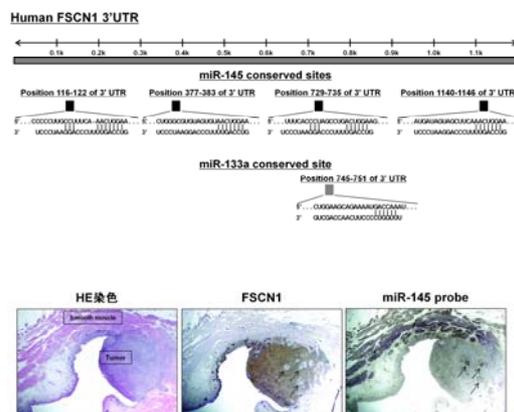
3. 研究の方法

- (1) 臨床尿路上皮癌検体における 667 種類 miRNA のスクリーニングテストと発現プロファイル作成および多数の臨床検体における発現確認 (miRNA アレイ)。
- (2) アルゴリズムによる miRNA 標的遺伝子の予測と臨床尿路上皮癌検体における発現確認 (Web-based software, Real-time RT-PCR, 免疫組織学的染色)
- (3) miRNA および標的遺伝子の機能解析 (miRNA transfection, XTT, Wound healing assay, Cell invasion assay, Apoptosis array, Flow cytometry, Luciferase assay)
- (4) 尿中 miRNA 測定 (Real-time RT-PCR)
- (5) 統計解析

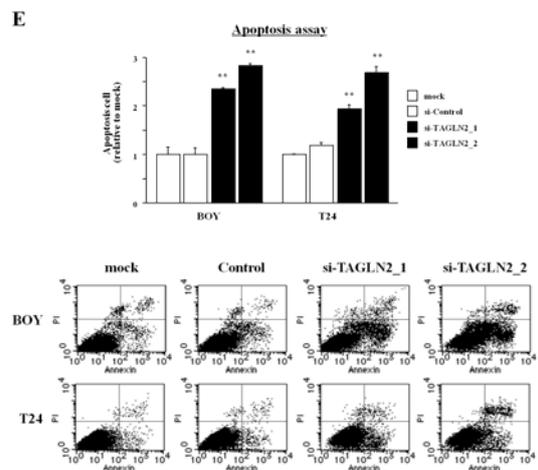
4. 研究成果

(1) 癌抑制的 miRNA の研究

667 種類 miRNA のスクリーニングテストの結果、尿路上皮癌で特異的に発現が低下していた miR-1, miR-218, miR-133a, miR-145, miR-517a などに注目した。これらは多数の臨床検体における発現確認においても尿路上皮癌で有意にその発現は低下していた。まず我々はアルゴリズム解析にてサイトケラチンの一つである KRT7 が miR-145 や miR-133a の標的遺伝子であることを見出し、臨床尿路上皮癌検体におけるそれら発現は逆相関することを証明した (Ichimi)。また miR-145 や miR-133a を尿路上皮癌細胞株にトランスフェクションすると増殖・遊走・浸潤能が有意に抑制されることが判明した。miR-145 トランスフェクタントの遺伝子発現プロファイルでは、アクチン結合タンパクの一つである FSCN1 の発現が有意に低下しており、Web-based software により示唆された FSCN1 の 3 末側非翻訳領域に miR-145 と miR-133a が直接結合して、FSCN1 の発現を抑制することを Luciferase assay により証明した。FSCN1 は癌遺伝子的作用を持つことが示唆され、その発現は腫瘍のステージと相関することが免疫組織学的染色で示唆された。組織検体における逆相関は in situ hybridization にて証明された (Chiyomaru)。



さらに、FSCN1 とともに細胞膜の突起状構造を構成する LASP1 の 3 末側非翻訳領域は miR-145 と miR-133a の結合サイトを有するばかりでなく miR-1 と miR-218 に対しても結合サイトがあることが Luciferase assay により証明された。miR-1 と miR-218 を尿路上皮癌細胞株にトランスフェクションすると細胞増殖能が有意に抑制された (Chiyomaru)。興味深いことにはこのような癌抑制的 miRNA の中で miR-1 と miR-133a はゲノム上の 2 か所 (18q11.2 と 20q13.33) でクラスターを形成し連動して発現しているものと思われた。さらに miR-1/miR-133a cluster が標的とする遺伝子を検索したところ、アクチン結合タンパクの一つである TAGLN2 はこのクラスターにより直接制御されることが明らかになった。miR-1/miR-133a のトランスフェクションではアポトーシスが誘導されることが判明したが、TAGLN2 のノックダウンでも同様にアポトーシスが誘導されることが分かった。腫瘍細胞はこの経路を抑制することによりアポトーシスを抑制して腫瘍の増殖能を維持している可能性が示唆された。TAGLN2 の発現は腫瘍のグレードや転移の有無と相関することが免疫組織学的染色で示唆された。(Yoshino)



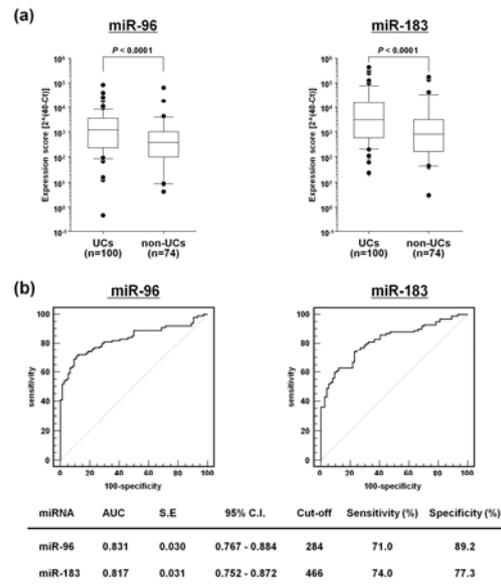
さらに解毒系酵素の GSTP1 はアポトーシスを抑制するという報告があったが、GSTP1 は miR-133a の標的遺伝子であることが分かった (Uchida)。

(2) miRNA の発現機序の研究

次の興味はこれら miRNA 自身の発現はどのように制御されているかということであった。miR-1/miR-133a cluster がコードされている領域 (18q11.2) は尿路上皮癌の CGH アレイ解析でも signal loss が観察される領域であった (Matsuda)。また、癌抑制的 miR-517a は脱メチル化剤処理後にその発現が上昇することから、尿路上皮癌では遺伝子メチル化による発現抑制を受けている可能性が示唆された (Yoshitomi)。このように癌抑制的 miRNA の発現抑制機序の一端が明らかになった。

(3) 腫瘍マーカーとしての miRNA

「尿路上皮癌 miRNA プロファイル」のリストの上位にある microRNA の腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。対象は尿路上皮癌患者 (n=100)、健常者 (n=49) および尿路感染患者 (n=25) の尿から total RNA を抽出して stem-loop PCR にて miR-96 および miR-183 の発現を測定した。尿路上皮癌患者における miR-96、miR-183 の発現は健常者や尿路感染患者の尿に比べて有意に高く、ステージやグレードと関連していた。miR-96 の検出は感度 71.0% 特異度 89.2% (AUC 0.831) で癌患者と非癌患者の区別が可能であった。また尿細胞診で陰性であった 44 症例中 27 例で miR-96 が検出され、尿細胞診と合わせると 78.2% の診断感度であった。さらに術前・術後の比較では miR-96、miR-183 の発現は術後に有意に低下していた。尿中の microRNA 測定は尿路上皮癌の非侵襲的な診断法として有用である可能性が示唆された。



(総括)

以上の一連の研究により、尿路上皮癌における miRNA ネットワークによるエピジェネティックな分子制御機構の一端が明らかになった。今後、in vivo の実験を展開して尿路上皮癌の新しい治療開発への礎としたい。また、尿中 miRNA の診断は前向き試験を展開して新しい腫瘍マーカーの開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Uchida Y, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。MiR-133a induces apoptosis through direct regulation of GSTP1 in bladder cancer cell lines. Urol Oncol. 2011 [Epub ahead of print]

2. Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, Yamasaki T, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。miR-218 on the genomic loss region of chromosome 4p15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer. *Int J Oncol*. 2011;39: 13-21.
 3. Yoshitomi T, Kawakami K, Enokida H, Chiyomaru T, Kagara I, Tatarano S, Yoshino H, Arimura H, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。Restoration of miR-517a expression induces cell apoptosis in bladder cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2011;25:1661-1668.
 4. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K, Nohata N, Seki N, Nakagawa M. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. 査読有。 *Br J Cancer*. 2011;104:808-818.
 5. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci*. 2011;102:522-529.
 6. Matsuda R, Enokida H, Chiyomaru T, Kikkawa N, Sugimoto T, Kawakami K, Tatarano S, Yoshino H, Toki K, Uchida Y, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。LY6K is a novel molecular target in bladder cancer on basis of integrate genome-wide profiling. *Br J Cancer*. 2011;104:376-386.
 7. Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, Fujimura L, Kikkawa N, Seki N, Nakagawa M. 査読有。miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2010;102:883-891.
 8. Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, Kunimoto R, Chiyomaru T, Kawamoto K, Kawahara K, Toki K, Kawakami K, Nishiyama K, Tsujimoto G, Nakagawa M, Seki N. 査読有。Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer*. 2009;125: 345-52.
 9. Enokida H, Nakagawa M. 査読無。Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008;13:298-307.
- [学会発表] (計 34 件)
- 以下 1~3、American Urological Association (AUA) annual meeting May 15, 2011. Washington DC
1. Enokida H, Seki N, Nakagawa M. MicroRNAs (miR-96 and miR-183) detection serves as urine markers in patients with urothelial carcinoma.
 2. Chiyomaru T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Functional role of LASP1 in bladder cancer cell viability and its regulation by microRNAs.
 3. Tatarano S, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. miR-218 on the genomic loss region of chromosome 4P15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer.

以下 4, 5, American Urological Association (AUA) annual meeting May 16, 2011. Washington DC

4. Yoshitomi T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Restoration of miR-517a expression induces cell apoptosis in bladder cancer cell lines.
5. Yoshino H, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. The tumor suppressive miRNA cluster of miR-1 and miR-133a targets oncogenic TAGLN2 gene in bladder cancer.
6. Uchida Y, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. MiR-133a functions as a tumor suppressor and directly regulates GSTP1 expression in bladder cancer. American Urological Association (AUA) annual meeting . May 31, 2010. San Francisco
7. Chiyomaru T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. miR-145 and miR-133a function as tumor suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. European Association of Urology (EAU) annual meeting April 19, 2010. Barcelona
8. Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Identification of differentially expressed mature microRNAs in bladder cancer. 23rd Annual European Association of Urology Congress (EAU) March 28, 2008. Milan

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: microRNA 発現プロファイリングに基づく尿路上皮癌の検出方法

発明者: 関 直彦、榎田 英樹、中川 昌之
権利者: 国立大学法人千葉大学、国立大学法人鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-159384

出願年月日: 平成 22 年 7 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: microRNA 発現プロファイリングに基づく尿路上皮癌の検出方法

発明者: 関 直彦、榎田 英樹、中川 昌之
権利者: 国立大学法人千葉大学、国立大学法人鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-276191

出願年月日: 平成 19 年 10 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 昌之 (NAKAGAWA MASAYUKI)
鹿児島大学・歯学総合研究科・教授
研究者番号: 90164144

(2) 研究分担者

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)
鹿児島大学・歯学総合研究科・講師
研究者番号: 80347103

関 直彦 (SEKI NAOHICO)
千葉大学・機能ゲノム学・准教授

研究者番号: 50345013

(H21→H22: 連携研究者)

(3) 研究協力者

千代丸 剛
鹿児島大学・歯学総合研究科・大学院生
鏑野 秀一
鹿児島大学・歯学総合研究科・大学院生
吉野 裕史
鹿児島大学・歯学総合研究科・大学院生