

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11015

研究課題名(和文) 尿路上皮癌・増殖シグナルを遮断するマイクロRNAの探索に基づく革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the innovative treatment based on the search of microRNA blocking growth signals in urothelial carcinoma

研究代表者

吉野 裕史 (YOSHINO, Hirofumi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：90642611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：miRNA-199a-3p/-5p、miRNA-199b-3p/-5p、並びにmiRNA-223が膀胱癌組織で有意に発現が抑制されていることを解明し、これらのmiRNAを核酸導入すると癌細胞の増殖・遊走・浸潤能が抑制された。標的遺伝子探索ではmiRNA-199がITGA3を、miRNA-223がWDR62を直接制御することが明らかにし、論文化に至った。

また、ジェムシタピンとシスプラチンのそれぞれの耐性株の樹立に成功し、それらを用いてmiRNAのプロファイルを作成した。シスプラチン耐性株で発現低下を認めるmiRNA-486-5pを核酸導入すると、耐性株において増殖能が抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1「治療標的探索型miRNA」を起点として、尿路上皮癌の再発や治療抵抗性に関わる機能性RNA分子ネットワークの探索を行い、いくつかの治療標的型miRNAを同定し論文化することができた。これらの成果により、miRNAを用いた尿路上皮癌の治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that expression levels of miRNA-199a-3p/-5p, miRNA-199b-3p/-5p, and miRNA-223 were significantly down regulated in bladder cancer tissues, and that transduction of these miRNA suppressed cell proliferation, migration, and invasion. We also elucidated that miRNA-199 and miRNA-223 individually controlled ITGA3 and WDR62 directly. We finally succeeded to publish these data in journals.

In addition, we succeeded in the establishment of cancer cells which resistant to gemcitabine or cisplatin, and made profiles of miRNA with performed next-generation sequencing analyses. We found that miRNA-486-5p was down regulated in cisplatin-resistant cancer cells according to the profiles, and that miRNA-486-5p transduction suppressed cell proliferation in these cells.

研究分野：urological cancer

キーワード：マイクロRNA 尿路上皮癌 miRNA-199 miRNA-223

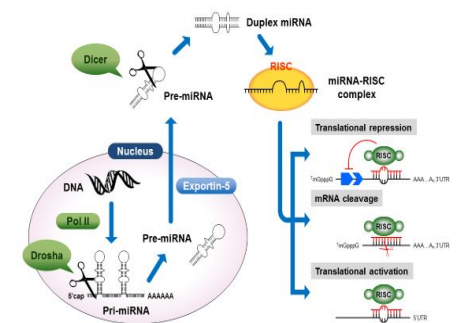
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 尿路上皮癌治療の現状

本邦における尿路上皮癌の罹患数は 24,619 人 (2008 年) また死亡数は 7,299 人 (2012 年) である。表在性尿路上皮癌が死亡の原因であることはまれであるが、膀胱筋層への深い浸潤を有する患者の 5 年生存率は約 50% と低い。また、外科手術が適応されない場合は、放射線療法単独または化学療法を併用して 5 年生存率を 20% から 40% となる。再発・転移症例に対して抗癌剤治療は GC 療法 (Gemcitabine+Cisplatin) が 1st line として行われるが、有効な 2nd line 抗癌剤治療は現在も確立されていない。他の泌尿器癌 (前立腺癌や腎癌) に比べて明らかに治療手段が少なく、治療成績の向上のために新規治療法の開発は急務である。

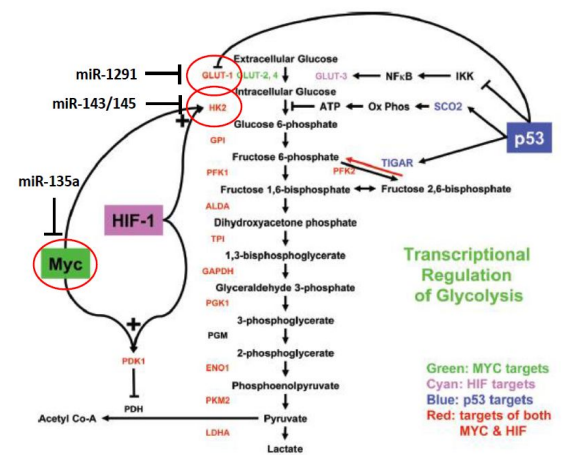
近年、癌特異的な活性化シグナル経路を明らかにして、その責任分子を治療の標的とした、分子標的薬が開発され、一定の効果を上げている、しかしながら尿路上皮癌においては、その恩恵を受けていない。米国 NCI が主導した CALGB-90101 に於いては、尿路上皮癌で過剰発現が見られる HER2/neu 分子に対するモノクローナル抗体である trastuzumab と paclitaxel, carboplatin, gemcitabine を用いた第 II 相試験 (n=109) が行われた。免疫組織学的染色で HER2 陽性者 (52%) に対しては奏効率が 70% (CR 11%, PR 59%) OS の中央値 14.1 か月と比較的良好な成績であった。この事は、尿路上皮癌の個々の症例において活性化しているシグナル伝達経路を明らかにして治療の標的にすれば、有効かつ適切な治療法の開発に繋がることを示唆している。



#### (2) 尿路上皮癌におけるマイクロ RNA 研究の現状

マイクロ RNA とよばれる 19-23 塩基の小さな RNA 分子がヒトの発生・分化などの過程に重要な影響を及ぼすことが報告され注目されている。この RNA 分子は、最終的に 1 本鎖の RNA 分子として機能し、機能性 RNA (タンパクコード・非タンパクコード遺伝子) の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御をしている。1 つのマイクロ RNA は、極めて多くの機能性 RNA の発現を制御するため、細胞内ではマイクロ RNA-機能性 RNA の極めて複雑な分子ネットワークが形成されている。ヒトゲノム中の 60% のタンパクコード遺伝子は、マイクロ RNA による発現制御を受けている。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している。癌研究において、世界規模でマイクロ RNA の研究が進んでおり、癌細胞で発現異常を認めるマイクロ RNA を指標にして、その機能解析が相次いで報告されている。申請者はこれまでに、尿路上皮癌や腎癌臨床検体を用いて「マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成し (業績 21,28) このプロファイルを基に「癌抑制型マイクロ RNA」の探索に成功している (業績 1-8,10-28) 更に、ゲノム科学的なアプローチを考案して、癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子ネットワークの探索を行ってきた。例えば、miR-200s は、癌の転移や上皮間葉転換に関与する遺伝子を制御する役割を担っている事が明らかにした (業績 14) また、miR-135a, miR-143/145, miR-1291 はグルコース代謝に関与する遺伝子群を制御している事を明らかにした (業績 11,12) これまでの実績から、申請者は、起点となるマイクロ RNA を見出せば、マイクロ RNA が制御する分子経路を明らかにできるノウハウを得た。

細胞内ではマイクロ RNA-機能性 RNA の極めて複雑な分子ネットワークが形成されている。ヒトゲノム中の 60% のタンパクコード遺伝子は、マイクロ RNA による発現制御を受けている。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している。癌研究において、世界規模でマイクロ RNA の研究が進んでおり、癌細胞で発現異常を認めるマイクロ RNA を指標にして、その機能解析が相次いで報告されている。申請者はこれまでに、尿路上皮癌や腎癌臨床検体を用いて「マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成し (業績 21,28) このプロファイルを基に「癌抑制型マイクロ RNA」の探索に成功している (業績 1-8,10-28) 更に、ゲノム科学的なアプローチを考案して、癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子ネットワークの探索を行ってきた。例えば、miR-200s は、癌の転移や上皮間葉転換に関与する遺伝子を制御する役割を担っている事が明らかにした (業績 14) また、miR-135a, miR-143/145, miR-1291 はグルコース代謝に関与する遺伝子群を制御している事を明らかにした (業績 11,12) これまでの実績から、申請者は、起点となるマイクロ RNA を見出せば、マイクロ RNA が制御する分子経路を明らかにできるノウハウを得た。



更に、申請者らは進行尿路上皮癌を含む臨床検体から次世代シーケンサーを用いた「全ゲノム尿路上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成し、これまで明らかとなっていない「癌促進型マイクロ RNA」「癌抑制型マイクロ RNA」の探索に成功している（業績 7）。

このような実績を踏まえ、「全ゲノム尿路上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイル」において発現変動するマイクロ RNA を、癌細胞株に核酸導入し、癌の細胞増殖シグナルである AKT/ERK のリン酸化を抑制する、あるいは活性化する「治療標的探索型マイクロ RNA」の探索を行う本申請を考案した。

## 2．研究の目的

本研究では、尿路上皮癌の再発や治療抵抗性尿路上皮癌の分子メカニズムをマイクロ RNA を基点として明らかにし、更に、その活性化経路を遮断する事により治療抵抗性尿路上皮癌の増殖や転移を抑制する戦略を考案する提案である。既に申請者は、細胞増殖シグナルである AKT/ERK のリン酸化を抑制する、あるいは活性化する「治療標的探索型マイクロ RNA」を見出しており、研究準備は十分に整っている。以下の研究項目について順次明らかにする予定である。

- (1) 「尿路上皮癌マイクロ RNA 発現プロファイル」を基にして、癌細胞株にマイクロ RNA を核酸導入し AKT/ERK のリン酸化を抑制する、あるいは活性化する「治療標的探索型マイクロ RNA」の探索を継続し、その候補を増やす。
- (2) 「治療標的探索型マイクロ RNA」が制御する機能性 RNA ネットワークの探索から、治療抵抗性尿路上皮癌で活性化している分子経路を見出す。
- (3) 治療抵抗性尿路上皮癌で活性化している分子経路を遮断する戦略を考案し、in vitro における検証を行う。
- (4) 申請者らが樹立した、高転移尿路上皮癌細胞株 BOY を用いた転移モデルマウスの解析から、(3)で見出した治療戦略の検証を、in vivo で行う。

## 3．研究の方法

治療抵抗性尿路上皮癌で活性化されている分子経路を明らかにして、その経路を遮断する方法を模索する事から、本疾患の新たな治療戦略開発へ繋げる研究である。研究は、以下のステップを踏んで行う予定である。

- (1) 尿路上皮癌で発現異常を示すマイクロ RNA を癌細胞株に核酸導入し、AKT/ERK のリン酸化を抑制する、あるいは活性化する「治療標的探索型マイクロ RNA」の探索を継続する。
- (2) 「治療標的探索型マイクロ RNA」が制御する機能性 RNA ネットワークの探索から、治療抵抗性尿路上皮癌で活性化している分子経路の探索についてゲノム科学的手法を用いて行う。
- (3) 治療抵抗性尿路上皮癌で活性化している分子経路を遮断する戦略を考案し、in vitro/in vivo における検証を行う。

## 4．研究成果

研究成果として、マイクロ RNA-199a-3p/-5p およびマイクロ RNA-199b-3p/-5p は膀胱癌組織で有意に発現が抑制されていることを解明した。これらのマイクロ RNA を核酸導入すると癌細胞の遊走・浸潤能が有意に抑制された。標的遺伝子探索では Integrin 3 (ITGA3) を直接制御することが明らかとなった。TCGA による RNA 発現解析では ITGA3 は膀胱癌組織において発現が上昇しており、またマイクロ RNA-199 family の低発現群は高発現群に比べ

有意に予後不良であった。また、その他のマイクロ RNA でも、マイクロ RNA-139-5p/3p やマイクロ RNA-26a-5p/26b-5p が転移に関わる遺伝子を制御することで治療標的型マイクロ RNA として機能することを解明した。

更に、マイクロ RNA-223 が膀胱癌組織で有意に発現が抑制されていることを解明した。このマイクロ RNA を核酸導入するとアポトーシスを介した増殖能抑制のみならず、癌細胞の遊走・浸潤能も有意に抑制された。標的遺伝子探索ではマイクロ RNA-223 が WDR62 を直接制御することが明らかとなった。TCGA による RNA 発現解析では WDR62 は膀胱癌組織において発現が上昇しており、また悪性度が高くなるにつれて WDR62 の発現が亢進することが分かった。マイクロ RNA-199 family の低発現群は高発現群に比べ有意に予後不良であった。

また、進行性尿路上皮癌に対する標準治療に使われている、ジェムシタピンとシスプラチンのそれぞれの耐性株を樹立することに成功し、次世代シーケンサーを行い、マイクロ RNA のプロファイルを作成した。シスプラチン耐性株で発現低下を認めるマイクロ RNA-486-5p を核酸導入すると、シスプラチン耐性株において増殖能が抑制された。現在、次世代シーケンサーにて 486-5p の標的遺伝子を探索中であり、今後はプロファイルの結果を元に候補遺伝子がマイクロ RNA-486-5p によって直接制御されるか検証する予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件、全て査読あり)

1. Sugita S, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Matsushita R, Sakaguchi T, Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Tumor-suppressive microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer. *Int J Oncol*. 2019 Jun; 54(6):2222-2236.
2. Osako Y, Yoshino H, Sakaguchi T, Sugita S, Yonemori M, Nakagawa M, Enokida H. Potential tumor-suppressive role of microRNA-99a-3p in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells through the regulation of RRM2. *Int J Oncol*. 2019 May; 54(5):1759-1770.
3. Yoshino H\*, Yonezawa T\*, Yonemori M, Miyamoto K, Sakaguchi T, Sugita S, Osako Y, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. (\* equal contribute). Downregulation of microRNA-1274a induces cell apoptosis through regulation of BMPR1B in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2018; 39:173-181.
4. Sugita S\*, Enokida H\*, Yoshino H, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Osako Y, Nakagawa M. (\* equal contribute). HRAS as a potential therapeutic target of salirasib RAS inhibitor in bladder cancer. *Int J Oncol*. 2018 Aug; 53(2):725-736.
5. Sakaguchi T\*, Yoshino H\*, Sugita S, Miyamoto K, Yonemori M, Osako Y, Meguro-Horike M, Horike SI, Nakagawa M, Enokida H. (\* equal contribute). Bromodomain protein BRD4 inhibitor JQ1 regulates potential prognostic molecules in advanced renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018; 9: 23003-23017.
6. Yoshino H, Nohata N, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Sugita S, Kofuji S, Nakagawa M, Dahiya R, Enokida H. PHGDH as a key enzyme for serine biosynthesis in HIF2 targeting therapy for renal cell carcinoma. *Cancer Research*. 2017; 77:6321-6329.
7. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, Nakagawa M, Enokida H. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8:20881-20894.

8. Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Sugita S, Matsushita R, Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer. Br J Cancer. 2017; 116:1077-108.
9. Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M, Yoshino H, Nakagawa M, Enokida H. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. Br J Cancer. 2016; 115(3):354-363.
10. Yonemori M, Seki N, Yoshino H, Matsushita R, Miyamoto K, Nakagawa M, Enokida H. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer. Cancer Sci. 2016; 107:1233-1242.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Hirofumi Yoshino. Targeting PHGDH exerts anti-oncogenic effects in bladder cancer. 欧州泌尿器科学会. 2019.
2. Hirofumi Yoshino, Kazutaka Miyamoto, Masaya Yonemori, Satoru Sugita, Takashi Sakaguchi, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa. Targeting metabolism re-programming as a therapy for drug-resistant renal cell carcinoma. 欧州泌尿器科学会. 2018.
3. Satoshi Sugita. The tumor suppressor microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer. 米国泌尿器科学会. 2018.
4. Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Kofuji, Nijiro Nohata, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa. CRISPR/Cas9-mediated miR-20-3p depletion promoted tumorigenesis through revival of TWIST in renal cell carcinoma. 米国泌尿器科学会. 2017.
5. 坂口 大、吉野裕史、米森雅也、宮元一隆、杉田 智、松下良介、榎田英樹、中川昌之. 膀胱癌における Integrin 3 (ITGA3) 制御を介した microRNA-199 family の癌抑制的作用. 第 105 回日本泌尿器科学会総会. 2017.
6. 吉野裕史、米森雅也、宮元一隆、榎田英樹、中川昌之. CRISPR/Cas9 による microRNA 編集による腎癌の進展メカニズムの解明. 第 105 回日本泌尿器科学会総会. 2017.
7. Yonemori M, Seki N, Yoshino H, Matsushita R, Miyamoto K, Nakagawa M, Enokida H. Dual-strands of microRNA-139 (miR-139-5p and miR-139-3p) targeting matrix metalloprotease 11 (MMP11) in bladder cancer. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016.
8. Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M, Yoshino H, Nakagawa M, Enokida H. Tumor suppressive miRNA-26a/b inhibit cell migration and invasion through targeting a prognostic marker, Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2) in bladder cancer. 第 68 回西日本泌尿器科学会. 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：関 直彦  
ローマ字氏名：Seki Naohiko  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：大学院医学研究院  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：50345013

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松下 良介  
ローマ字氏名：Matsushita Ryouzuke

研究協力者氏名：宮元 一隆  
ローマ字氏名：Miyamoto Kazutaka

研究協力者氏名：米森 雅也  
ローマ字氏名：Yonemori Masaya

研究協力者氏名：榎田 英樹  
ローマ字氏名：Enokida Hideki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。