

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20145

研究課題名(和文)膀胱癌・新規癌抑制型マイクロRNAが制御する機能性RNA分子ネットワークの探索

研究課題名(英文) Investigation of the molecular network regulated by novel tumor suppressive microRNAs in bladder cancer

研究代表者

松下 良介 (MATSUSHITA, Ryosuke)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80735366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーによる膀胱癌において発現変動するmiRNAのリストから、miR-223、miR-199 family、miR-145-5p/3p、miR-139-5p/3p、miR-26a/b-5が癌遺伝子の作用を有するWDR62、CCNE1/2、UHRF1、PLOD2、ITGA3遺伝子を標的とし、癌抑制的miRNAとして機能することを見出した。膀胱癌では細胞周期、遺伝子メチル化、腫瘍間質のコラーゲンのリモデリング、インテグリンシグナルなどの癌シグナル経路がmiRNAによる制御を受けていることを明らかにし、これらの経路の阻害剤を用いた新規治療の基礎的データを得た。

研究成果の概要(英文)：Based on the microRNAs expression profile by next generation sequencing in bladder cancer (BC), we identified several downregulated microRNAs including miR-223, miR-199 family, miR-145-5p/3p, miR-139-5p/3p, miR-26a/b-5 and found their target tumor-associated genes in BC. Finally, we found that these microRNAs may have tumor-suppressive function via direct targeting of oncogenic genes including WDR62, CCNE1/2, UHRF1, PLOD2, and ITGA3. Thus, it was revealed that several important cancer signaling pathways like cell cycle, gene's methylation, remodeling collagens in tumor matrix, and integrin signal might be regulated by microRNA network. According to these microRNA-axis study, we obtained basic data for new therapeutic strategy by using drugs that inhibit these signaling pathways.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：マイクロRNA 膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

進行性膀胱癌の予後は不良であり、再発・転移症例に対する抗癌剤治療や放射線治療では十分な治療成績が得られていない。また、セカンドラインの治療法も確立されていない。また近年、機能性 RNA の 1 種であるマイクロ RNA の発現異常が癌の発生・進展・転移に重要な役割を担っている事が明らかとなってきた。

2. 研究の目的

我々は次世代シーケンサーを用いた「全ゲノム膀胱癌マイクロ RNA 発現解析」を施行し、これまで存在が明らかとなっていない複数の「癌抑制型マイクロ RNA」の探索に成功している。また、膀胱癌・癌抑制型マイクロ RNA が制御する機能性 RNA ネットワークを探索し、膀胱癌で活性化している分子経路を見出した。新規膀胱癌・癌抑制型マイクロ RNA を起点とした膀胱癌の進展や転移に関わる分子ネットワークを探索し、その活性化経路の遮断する事により、膀胱癌の増殖や転移を抑制する事が可能であるか、検討する事を研究の目的とする。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いた解析から、細胞内での発現が明らかとなった機能未知のマイクロ RNA (これまで passenger strand として記載されている) について、膀胱癌細胞株に核酸導入し機能解析を施行する。膀胱癌マイクロ RNA 発現プロファイルから、microRNA-145/145*、microRNA-139/139*、microRNA-99a/99a*、microRNA-100/100*など、これまで passenger strand (マイクロ RNA の生合成の最終段階で分解され、機能しないと考えられている strand RNA) と考えられてきたマイクロ RNA が正常膀胱上皮細胞で発現し、細胞内で機能を有している事が示唆されている。そこで、これらマイクロ RNA につい

て順次、膀胱癌細胞株に核酸導入し、細胞増殖・浸潤・遊走・アポトーシス誘導などを指標にして機能解析を施行する。膀胱癌における癌抑制機能が証明されたマイクロ RNA については、機能性 RNA 分子ネットワークの探索候補マイクロ RNA とする。

マイクロ RNA の特徴として、1 種類のマイクロ RNA は、極めて多くの機能性 RNA (タンパクコード遺伝子・非タンパクコード遺伝子) の制御を行っている。例えば、microRNA-144* は、データベース上では 4124 種のタンパクコード遺伝子を制御する可能性がある。申請者は、マイクロ RNA 導入細胞の網羅的な発現解析、データベースの活用、臨床検体の発現情報を組み合わせる事で、マイクロ RNA が制御するタンパクコード遺伝子の効率的な探索方法を考案した。また、候補となった遺伝子については、Luciferase reporter assay により、マイクロ RNA の直接の制御があるか、検証可能である。本研究で明らかになる「膀胱癌・新規癌抑制型マイクロ RNA」については、これまで同様に、マイクロ RNA が制御する機能性 RNA 分子ネットワークの探索を行う。

4. 研究成果

次世代シーケンサーによる miRNA 発現解析では、933 個の既知 miRNA と 17 個の新規 miRNA の発現を解析し得た。933 個の既知 miRNA のうち、従来、他の癌種でも癌抑制型マイクロ RNA として知られていた miR-145-5p のパッセンジャー鎖である miR-145-3p はこれまでその機能が不明であったが、ともに共通の標的遺伝子である UHRF1 の発現を直接抑制することが明らかになった。UHRF1 はメチル化やヒストン脱アセチル化を介して、癌細胞における癌抑制遺伝子の不活化に寄与していると考えられている。同様に miR-139-5p はパッセンジャー鎖である miR-139-3p と

共同して腫瘍間質における matrix metalloprotease 11 の発現を調節していることを明らかにした。また miRNA-26a-5p と miR-26b-5p は共通のターゲットである PLOD2 を介して、腫瘍間質のコラーゲン繊維のリモデリングに関与していることも明らかにした。最近の研究では micro RNA-199 family の発現高値は膀胱癌患者の予後良好の予測因子であり、インテグリンシグナル伝達を制御して、癌抑制的に働くことが示唆された。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(論文投稿中)。このように新規膀胱癌・癌抑制型マイクロ RNA を起点とした膀胱癌の進展や転移に関わる分子ネットワークを探索できた。将来、その活性化経路の遮断する事により、膀胱癌の増殖や転移を抑制する事の可能性について基礎的データを収集できた。

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4件)

1. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer.
Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Sugita S, Matsushita R,

Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Br J Cancer. 2017;116:1077-1087. (査読あり)

2. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer.
Yonemori M, Seki N, Yoshino H, Matsushita R, Miyamoto K, Nakagawa M, Enokida H. Cancer Sci. 2016;107:1233-42. (査読あり)
3. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer.
Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M, Yoshino H, Nakagawa M, Enokida H. Br J Cancer. 2016;115:354-63. (査読あり)
4. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): Inhibition of bladder cancer cell aggressiveness.
Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, Goto Y, Miyamoto K, Yonemori M, Inoguchi S, Nakagawa M, Seki N. Oncotarget. 2016;7:28460-87. (査読あり)

[学会発表](計3件)

1. Tumor-suppressive microRNA-26a-5p/-26b-5p inhibit cancer cell migration and invasion through targeting PLOD2 that is a potential prognostic marker in bladder cancer.
Kazutaka Miyamoto, Kagoshima,

Japan, Naohiko Seki, Chiba, Japan, Ryosuke Matsushita, Masaya Yonemori, Hirofumi Yoshino, Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa.
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston).

2. The dual-stranded microRNA-199 family members (miR-199a-3p/-5p and miR-199b-3p/-5p) are potential prognostic markers and have tumorsuppressive function via directly targeting integrin $\alpha 3$ (ITGA3) in bladder cancer
Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Hideki Enokida
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston).
3. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cell aggressiveness by regulating WDR62 in bladder cancer.
Satoshi Sugita*, Hirofumi Yoshino, Kazutaka Miyamoto, Masaya Yonemori, Takashi Sakaguchi, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Hideki Enokida.
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston).

[その他]

ホームページ等

www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~urology/index.php

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松下 良介 (MATSUSHITA Ryosuke)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：80735366

(2)研究協力者

榎田 英樹 (ENOKIDA Hideki)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：80347103

吉野 裕史 (YOSHINO Hirofumi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：90642611

米森 雅也 (YONEMORI Masaya)
鹿児島大学・附属病院・医員
研究者番号：00758013

宮元 一隆 (MIYAMOTO Kazutaka)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生