

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07021

研究課題名（和文）膀胱癌特異的なマイクロRNAおよび遺伝子発現機序に基づいた病理組織学的診断の確立

研究課題名（英文）Establishment of histopathological diagnosis based on expression mechanism of bladder carcinoma-specific molecules and microRNAs

研究代表者

藤井 智美 (Fujii, Tomomi)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50623477

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：膀胱癌は初期段階では自覚症状に乏しく、肉眼的血尿や排尿障害が出現する頃には進行癌のことが多い。従って膀胱癌においては進行癌に対する予後予測を含めた診断および治療の分子生物学的開発が求められる。NACC1はmiR-331-3pの標的分子で、miR-331-3pがNACC1の発現を抑制し、膀胱癌細胞の増殖を調節する。本研究課題において、1) NACC1の機能を細胞増殖における役割について分子レベルでの膀胱癌におけるNACC1の位置付けを明らかにし、2) 尿路上皮癌組織を用いてバイオマーカーとしてのNACC1の発現が膀胱癌の形態学的特徴にどのような影響をもたらすのかを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌における分子診断や分子標的療法への応用としてmiRNAを含めた種々の分子が検討されてきているが、実用化されている分子は未だに存在していない。また、膀胱癌では分子標的療法の開発が難しい理由として、癌細胞の分化や化性による細胞の変化が著しいことが挙げられる。そこで、膀胱癌細胞の分化に寄与するmiRNAを見出し、幹細胞マーカーの発現も含めて膀胱癌の性質について明らかにしつつあることは膀胱癌の新しい悪性度や予後予測判定に有効な分子マーカーとしての可能性を有していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the early stage of bladder carcinoma, there are few subjective symptoms, and by the time gross hematuria and dysuria appear, the cancer is often advanced. NACC1 is a target molecule of miR-331-3p, and miR-331-3p suppresses the expression of NACC1 and regulates the proliferation of bladder cancer cells. In this research project, we 1) clarified the function of NACC1 in bladder cancer at the molecular level regarding its role in cell proliferation, and 2) examined how the expression of NACC1 as a biomarker affects the morphological characteristics of bladder carcinoma using urothelial carcinoma tissues.

研究分野：泌尿器病理学

キーワード：膀胱癌 マイクロRNA 分子マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は尿中の癌細胞を捉えることが診断の糸口となるが、初期段階では自覚症状に乏しく、肉眼的血尿や排尿障害が出現する頃には進行癌となっていることが多い。一方で、膀胱癌の診断は特異的な腫瘍マーカーがなく、尿細胞診および病変の生検や切除によって得られた病理組織より得られる形態学的診断のみに頼っていることが現状である。治療法としては経尿道的腫瘍切除や膀胱全摘といった外科的治療や BCG 膀胱注入療法、集学的な全身化学療法が行われているが、膀胱癌の性質上、多発ないし再発が多く、第二、第三の治療を踏まえた診断マーカーの開発が急務である。microRNA(miRNA)は19-25塩基よりなる non-coding short RNA で、最近では miRNA の発現異常が癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現ネットワークを攪乱し、発癌や進展、転移に深く関与することが明らかとなっており、miRNA による種々の遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構が注目されている。一方で、膀胱癌において miRNA やその標的分子の動態をとらえることで、診断に応用でき、癌細胞の増殖や進展を抑制することが治療戦略や予後改善に応用できる可能性を有するものの、癌の形態に及ぼす影響や関連性については未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

膀胱癌細胞の増殖、分化に着目し、NACC1 をはじめ膀胱癌の増殖、分化に重要な役割を果たす miRNA の標的分子も含めて見出すとともに、miR-331-3p が膀胱癌細胞において幹細胞マーカーをはじめとする様々な分子の発現にどう関わるかを明らかにした上で、癌幹細胞の形態学的特徴や存在部位、存在様式、間質の特徴を明確にし、病理診断時に留意すべき細胞学的・組織学的所見との関連性を見出し、これまでに確立された組織亜型に加えるべき新しい診断指針を確立することが新しいマーカーの発見の糸口となると考え、具体的には 1) NACC1 の機能を細胞増殖における役割について分子レベルで解明し、膀胱癌における NACC1 の位置付けを明らかにする、2) 膀胱癌症例を用いてバイオマーカーとしての miR-331-3p、NACC1 の発現が膀胱癌の形態学的特徴にどのような影響をもたらすのか、病理組織学的に明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) NACC1 および miR-331-3p の膀胱癌細胞における細胞増殖能、分化能の評価、(2) 膀胱癌症例の病理組織標本における NACC1 および幹細胞マーカーの遺伝子異常の検索と免疫組織化学染色による蛋白発現の検討、(3) 膀胱癌の形態学的特性と幹細胞関連マーカーの発現との関連性の検証する、ということを踏まえて研究を進めた。具体的には、以下の手順で研究を実施した。

### (1) NACC1 および miR-331-3p の膀胱癌細胞における細胞増殖能、分化能の評価

膀胱癌細胞株 (T24, KU7, UMUC6) を用いて、miR-331-3p の過剰発現による NACC1 の抑制により細胞増殖が抑制される機序について細胞周期、アポトーシス、オートファジー、細胞老化などを網羅的に解析した。細胞増殖は MTS assay, 細胞周期、AnnexinV 測定、LC3 測定はフローサイトメトリーを用いて解析を行い、細胞老化については、Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay を行なった。

### (2) 膀胱癌症例の病理組織標本における NACC1 および幹細胞マーカーの遺伝子異常の検索と免疫組織化学染色による蛋白発現の検討

病理組織標本における NACC1 の発現メカニズムについて遺伝子およびタンパク発現の両方を解析し、検討した。遺伝子については遺伝子変異の解析を NACC1 の全エクソンについて次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異を解析し、タンパク発現は免疫組織化学染色を行なった。

### (3) 膀胱癌の形態学的特性と幹細胞関連マーカーの発現との関連性の検証

膀胱癌細胞において形態学的特性や増殖能を制御する推定関連分子として幹細胞マーカーの発現と遺伝子変異について、免疫組織化学染色、次世代シーケンサー解析による遺伝子変異の解析を行った。

## 4. 研究成果

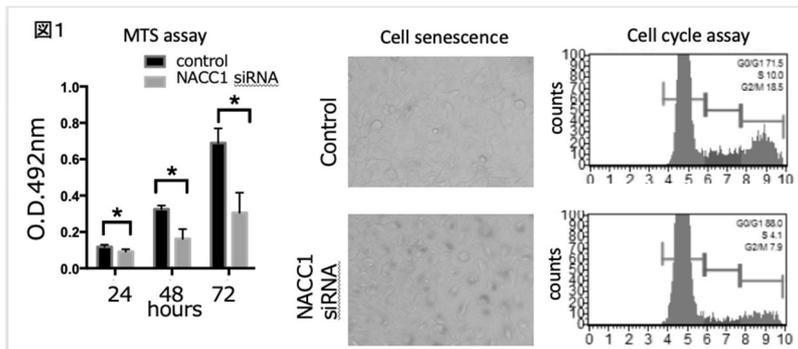
(1) 膀胱癌細胞株 (T24, KU7, UMUC6) に NACC1 siRNA を導入し、MTS assay にて 24-72 時間における細胞増殖能を検討したところ、いずれの細胞においても NACC1 の発現抑制により細胞増殖が抑制された。また、miR-331-3p の過剰発現によっても同様に細胞増殖能は抑制された。そのメカニズムを明らかにするため、細胞老化、細胞周期、アポトーシス、オートファジーについて検討したところ、細胞老化の亢進、G2/M arrest が観察され、アポトーシ

スおよびオートファジーは関連がなかった(図1)。このことから NACC 1 は細胞老化と細胞周期を制御することで、細胞増殖を制御していることが明らかとなった。

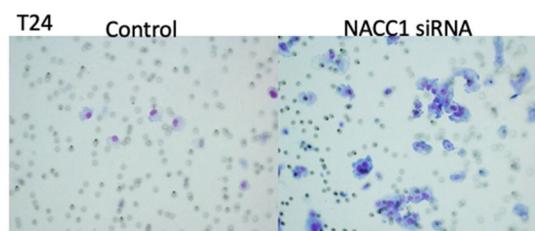
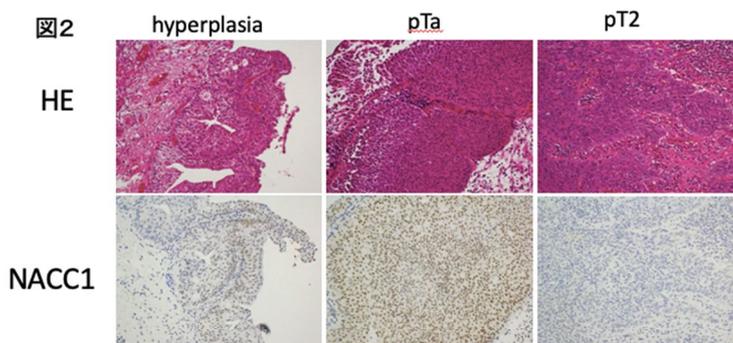
(2)膀胱癌組織 42 例について免疫組織化学染色により NACC1 の発現を検討した。その結果、非浸潤癌に比べ、浸潤癌特に筋層浸潤を伴った癌では NACC 1 の発現が低かった。NACC 1 の浸潤能、遊走能への影響を細胞株で調べたところ、NACC 1 の発現抑制により浸潤能、遊走能は亢進した(図2)。

(3)膀胱癌の形態学的特性が遺伝子変異と関連するかどうかを検討するため、NACC 1 の全エクソン解析を行ったところ、浸潤癌、非浸潤癌いずれにおいても遺伝子変異が検出された。これらのパターンはタンパクの発現とは関連性がなく、NACC 1 の発現は遺伝子変異とは別の制御が働いていることが予想された。

さらに浸潤能や分化能に関わる分子を検討するため、がん抑制遺伝子 TP53 および幹細胞マーカーについて検討をしたところ、遺伝子変異については、浸潤癌、非浸潤癌いずれにおいても認められたものの、同一症例における浸潤癌領域と非浸潤癌領域では浸潤癌領域に付加的遺伝子異常がいくつか見出される症例もあった。また、TP53 の遺伝子変異については浸潤癌で複数の遺伝子変異を有していた。この結果から、浸潤能の獲得には遺伝子変異が関与している可能性も示唆された。



(図1)膀胱癌細胞株 T24 における MTS アッセイ、Cell senescence, 細胞周期解析



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

|                                                                                                                                                                                                                                        |                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Miyake M, Hori S, Ohnishi S, Toritsuka M, Fujii T, Shimizu T, Owari T, Morizawa Y, Gotoh D, Itami Y, Nakai Y, Anai S, Torimoto K, Tanaka N, Fujimoto K.                                                                      | 4. 巻<br>110(10)         |
| 2. 論文標題<br>Supplementary granulocyte macrophage colony-stimulating factor to chemotherapy and programmed death-ligand 1 blockade decreases local recurrence after surgery in bladder cancer.                                           | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Sci.                                                                                                                                                                                                                  | 6. 最初と最後の頁<br>3315-3327 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.14158.                                                                                                                                                                                         | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)                                                                                                                                                                                                  | 国際共著<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Tomomi Fujii, Keiji Shimada, Tokiko Nakai, Chiho Ohbayashi                                                                                                                                                                   | 4. 巻<br>7               |
| 2. 論文標題<br>MicroRNAs in Smoking-Related Carcinogenesis: Biomarkers, Functions, and Therapy                                                                                                                                             | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Clin. Med.                                                                                                                                                                                                                | 6. 最初と最後の頁<br>98        |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/jcm7050098                                                                                                                                                                                         | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)                                                                                                                                                                                                  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Kohei Morita, Tomomi Fujii, Hiroe Itami, Tomoko Uchiyama, Tokiko Nakai, Kinta Hatakeyama, Aya Sugimoto, Makito Miyake, Yasushi Nakai, Nobumichi Tanaka, Keiji Shimada, Masaharu Yamazaki, Kiyohide Fujimoto, Chiho Ohbayashi | 4. 巻<br>10              |
| 2. 論文標題<br>NACC1, as a Target of MicroRNA-331-3p, Regulates Cell Proliferation in Urothelial Carcinoma Cells                                                                                                                           | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>cancers                                                                                                                                                                                                                      | 6. 最初と最後の頁<br>347       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cancers10100347                                                                                                                                                                                    | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)                                                                                                                                                                                                  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Fujii T, Uchiyama T, Matsuoka M, Myojin T, Sugimoto S, Nitta Y, Okabe F, Sugimoto A, Sekita-Hatakeyama Y, Morita K, Itami H, Hatakeyama K, Ohbayashi C.                                                                      | 4. 巻<br>70(9)           |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of DNA and RNA quality from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue for next-generation sequencing - Retrospective study in Japanese single institution.                                                | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Pathol Int.                                                                                                                                                                                                                  | 6. 最初と最後の頁<br>602-611   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/pin.12969.                                                                                                                                                                                         | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)                                                                                                                                                                                                  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                                |
|------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤井智美、内山智子、森田剛平、伊丹弘恵、中井登紀子、畠山金太、大林千穂 |
| 2. 発表標題<br>FFPE検体を用いたDNA、RNA抽出および核酸品質評価の検討     |
| 3. 学会等名<br>第108回日本病理学会総会                       |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|                                                                |
|----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤井智美、森田剛平、島田啓司、畠山金太、三宅牧人、藤本清秀、大林千穂                  |
| 2. 発表標題<br>ヒト尿路上皮癌に発現するNACC1は microRNA-331-3pの標的分子として細胞増殖を制御する |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会                                       |
| 4. 発表年<br>2018年                                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|-------------------------------------------------|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 大林 千穂<br><br>(Obayashi Chiho)<br><br>(90223940) | 奈良県立医科大学・医学部・教授<br><br><br>(24601)    |    |
| 研究分担者 | 島田 啓司<br><br>(Shimada Keiji)<br><br>(90336850)  | 奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師<br><br><br>(24601) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|