

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09210

研究課題名(和文) miR195-5pを用いた膀胱癌に対する革新的膀胱内注入療法の開発

研究課題名(英文) Development of an innovative intravesical injection therapy for bladder cancer using miR195-5p

研究代表者

佐々木 秀郎 (Sasaki, Hideo)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：30386990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌において発現が低下しているmiR195-5pについて、本研究ではその腫瘍マーカーとしての有用性の検証を目的として研究を行った。膀胱癌患者の尿中エクソソーム内において腫瘍の有無およびグレードと尿中miR195-5p発現量が関連していることが証明された。さらに、検討した全ての膀胱癌細胞株においてmiR195-5p発現の低下が見られた。また、miRNAを指標とした膀胱癌のリキッドバイオプシーについて検討を行い、血清中から7つのmiRNAを見出した。これらを用いて診断のための判別式を構築したところ、非常に高い精度で膀胱癌とそれ以外を鑑別することが可能で、有用なバイオマーカーとなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来検討されてきた尿中の膀胱腫瘍マーカーは感度、特異度や尿中安定性に問題があるが、miR195-5pはそれらの問題をクリアできる可能性を持つ。また、膀胱腔内注入により膀胱内でのmiR195-5pが制御可能となれば、副作用の少ない筋層非浸潤性膀胱癌の新規治療法の開発につながる可能性がある。筋層非浸潤性膀胱癌の再発を予防できれば膀胱癌の悪性度の進行を抑止でき、膀胱全摘除術を余儀なくされる症例を減らすことにつながり、膀胱癌患者のQOLを著しく改善することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have found that urinary microRNA-195-5p (miR195-5p) level is significantly lower in bladder cancer patients. In the present study, we demonstrated that the levels of urinary exosome miR195-5p expression were associated with the presence of tumor as well as tumor grade. Furthermore, there was a decrease in miR195-5p expression in all the bladder cancer cell lines examined compared with a human urothelial cell line and a normal urothelial tissue. We also investigated liquid biopsy of bladder cancer using miRNAs as diagnostic indices, and found seven miRNAs in serum. We constructed a discriminant formula for diagnosis using these miRNAs, which was possible to distinguish bladder cancer from other types of cancer with very high accuracy. These seven miRNAs were found to be potentially useful biomarkers for bladder cancer diagnosis.

研究分野：泌尿器科系腫瘍

キーワード：膀胱癌 miR195-5p miRNA リキッドバイオプシー

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は泌尿器科腫瘍の中でも発生頻度が高く、2年再発率が極めて高い(50~60%)ことから、再発を確実に診断・予防することが最も重要な治療戦略となる。尿細胞診は低侵襲で簡便な検査法であるが、感度が低い(<40%)という欠点があるため、侵襲性が高い膀胱鏡検査を頻回に施行することになる。これまでに多数報告されている尿中の腫瘍マーカー(NMP22, BTA, CK8-18等)も有用性が低い。また膀胱癌の多くを占める筋層非浸潤性膀胱癌に対しては、治療および再発予防目的で BCG 膀胱内注入療法が行われるが、40%の症例は BCG 療法が奏功せず、膀胱全摘除術を余儀なくされている。したがって、膀胱癌の早期診断と予後の改善のためには、新たな腫瘍マーカーによる非侵襲的で簡便な診断法と、BCG 療法が奏功しない症例に対する新規治療法の開発が必須であると考えられる。

研究代表者はこれまで、科学研究費の交付を受け、膀胱癌細胞株を用いた miRNA マイクロアレイにて網羅的発現解析を行ない、膀胱癌で発現が亢進または低下している miRNA の検索を行った。そのひとつである miR195-5p は膀胱癌患者の尿中で発現が低下しており、細胞診が陰性の膀胱癌患者の尿においても正常患者の尿と比較して有意な発現低下がみられた。また尿中で発現が低下していた症例では腫瘍摘除術後に発現が回復することが明らかになった。そこで、膀胱癌細胞株における miR195-5p 発現量を定量したところ、使用した 5 種類の全細胞株で発現量の低下が示され(正常尿路上皮と比較、図 1 データ未発表)、癌抑制性の働きを示唆するとともに、尿中の動態を支持する結果となった。これらの結果より miR195-5p が診断マーカーならびに膀胱内注入療法のターゲットとして有用であるとの確証を得た。

短鎖ノンコーディング RNA の 1 種である miRNA は、発生・増殖・細胞死・癌化など生物の高次機能の調節に重要な役割を担っていることが確認され、新しい腫瘍マーカーとしての開発や、治療への応用の模索が始まっている。さらに miRNA は pH や温度の変化にも強く、また頻回の凍結融解作業でも安定な物質であることから、臨床検体における腫瘍マーカーとして使用する際に非常に有利な特性といえる。また miRNA をターゲットとした治療薬もすでに臨床応用が開始されているため、本法も新規治療法に結びつく可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は①尿中 miR195-5p は診断マーカーとして使用できるか、②miR195-5p が膀胱がんの発生・増殖・進展にどのように関わっているのか、③miR195-5p の発現を膀胱内で人為的に制御することにより腫瘍の再発・進展を抑制できるか、の 3 点を明らかにすることである。

従来検討されてきた尿中の膀胱腫瘍マーカーは、感度・特異度・尿中における安定性に問題があるが、miR195-5p はそれらの問題をクリアできる可能性を持つ。また、膀胱癌の多くは表在性であることから、全身投与ではなく膀胱内注入という局所治療が可能である。すでに RNAi を用いた膀胱内注入治療は試みられており、膀胱腔内注入により膀胱内での miR195-5p が制御可能となれば、副作用の少ない筋層非浸潤性膀胱癌の新規治療法の開発につながる可能性がある。筋層非浸潤性膀胱癌の再発を予防できれば膀胱癌の悪性度の進行を抑止でき、膀胱全摘除術を余儀なくされる症例を減らすことにつながり、膀胱癌患者の QOL を著しく改善することが期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 尿中 miR195-5p の腫瘍マーカーとしての有用性の検証

正常(良性疾患患者) 54 検体、膀胱癌患者 68 検体ならびに同患者の腫瘍切除術後 32 検体の尿を収集した。対象者の尿検体から total RNA を抽出し、Taqman miRNA assay により定量 PCR を行い cycle threshold (Ct) 値から  $\Delta$ CT 値(候補 miRNACt 値 - 内在性コントロール Ct 値)を求めて検体間の相対的発現レベルを比較した。内在性コントロールには健常・腫瘍両群の尿で同レベルに発現している miR21-5p を用いた。

### (2) 膀胱癌細胞株における miRNA195-5p の発現解析

膀胱癌細胞株として RT-4、T-24、UMUC-3、TCCSUP、J82 を、正常細胞・組織として正常尿路上皮細胞株(SVHUC-1)および腎移植ドナー尿管(7例)の尿路上皮組織を用いた。それらの細胞・組織から Total RNA を抽出し、Taqman miRNA assay により定量 PCR を行い、得られた Ct 値から SVHUC-1 の  $\Delta$ Ct 値を 1 としたときの各細胞・組織の相対発現量(miR195-5p  $\Delta$ Ct 値/SVHUC  $\Delta$ Ct 値)を求めて比較した。

### (3) 尿中エクソソーム内 miR195-5p の有用性の検証

尿中 miR195-5p の不安定性の克服を目的として、尿中のエクソソーム分画に着目し同様の検

討を行った。正常（良性疾患患者）78 検体、膀胱癌患者 116 検体ならびに同患者の腫瘍切除術後の 48 検体の尿検体を収集した。対象者の尿検体から Total Exosome Isolation Kit 用いてエクソソームを抽出し、(1)と同様に定量 PCR を行い検体間の相対的発現レベルを比較した。

#### (4) 膀胱癌患者血清中のマイクロ RNA を指標としたリキッドバイオプシーの確立

392 人の膀胱癌患者、100 人の健常者、480 人の膀胱癌以外の 12 個の癌腫の患者の血清を用いた。それぞれを 2 つのコホート(学習群、検証群)に分けて解析の対象とした。miRNA の発現は 2565 の miRNA を検出可能な 3D-Gene Human miRNA OligoChip を用い、内因性コントロールとして miR-149-3p、miR-2861、miR-4463 の平均値で補正し、標的とする miRNA の発現量を求めた。本解析は主としてケース・コントロール研究デザインを用いており、ケース群を膀胱癌、コントロール群を膀胱癌以外とした。学習群にてそれぞれの集団内で 50%以上のサンプルでシグナル値が安定している 386 個の miRNA を選択し、ケース群とコントロール群で Student's t-test にて有意差(p<0.01)のある miRNA を検出し、フィッシャーの判別分析を用いて膀胱癌とそれ以外を判別するのに有用な式を構築した。検証群において求めた判別式の有用性を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 尿中 miR195-5p の腫瘍マーカーとしての有用性検証

正常群：54 例、腫瘍群：68 例について尿中 miR195-5p の発現量を解析した。その結果、少数例の予備検討において腫瘍群で低下していた miR195-5p の尿中発現量は正常群と同等であった。このうち 32 例の患者の術前／術後における尿中 miR195-5p の発現量は $-3.19 \pm 1.41 / -2.06 \pm 1.48$  であり、術後で有意(p<0.0001)に高くなることから(図1)、腫瘍の有無と尿中発現量が関連していることが証明された。

### (2) 膀胱癌細胞株における miRNA195-5p の発現解析

正常尿路上皮細胞株 SVHUC-1 の miR195-5p 相対発現量 (1.0) は尿管の正常尿路上皮 (0.94) と同レベルであった。膀胱癌細胞株における miR195-5p の発現レベルは、検討した全ての細胞株 (RT-4 : 0.13、T24 : 0.36、UMUC-3 : 0.31、TCC-SUP : 0.13、J82 : 0.40) において低下していた(図2)。

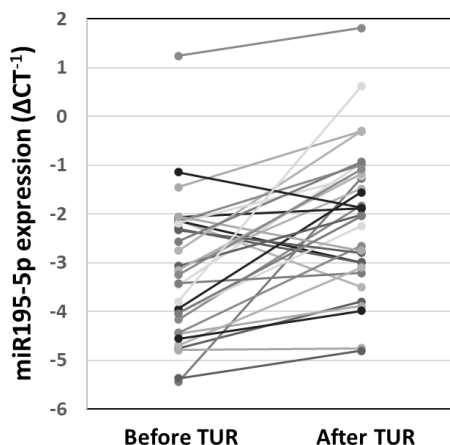


図1 手術前後の尿中miR195-5p発現量

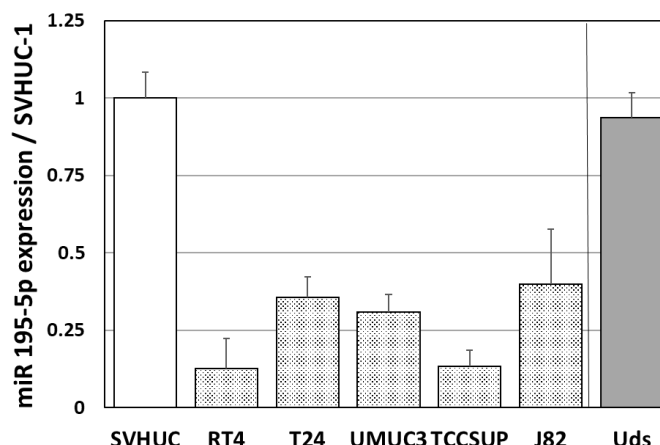


図2 膀胱癌細胞株におけるmiR195-5pの発現

### (3) 尿中エクソソーム内 miR195-5p の有用性の検証

尿中エクソソーム内における miR195-5p の発現量 (平均±SD) は正常群／腫瘍群において $-9.56 \pm 1.43 / -9.26 \pm 1.86$  と差がなかった。miR195-5p 発現量の膀胱癌 Grade 別では Low/High で $-8.88 \pm 1.63 / -9.58 \pm 2.01$  であり、high grade で有意に (p=0.0286) 低かった(図3)。また、47 例の患者の術前／術後における尿中 miR195-5p の発現量は $-9.47 \pm 1.85 / -8.27 \pm 1.51$  であり、術後で有意に (p<0.0001) 高値となった(図4)。これらの結果から、腫瘍の有無およびグレードと尿中エクソソーム内 miR195-5p 発現量が関連していることが明らかになった。

これらの結果は尿全体を用いた検討結果を支持するものであった。さらにグレードと相関することや、定量的 PCR における感度が良いことから分かるように、安定的に存在するエクソソーム内の miRNA を指標とすることは、臨床検体において非常に有利であることが示された。

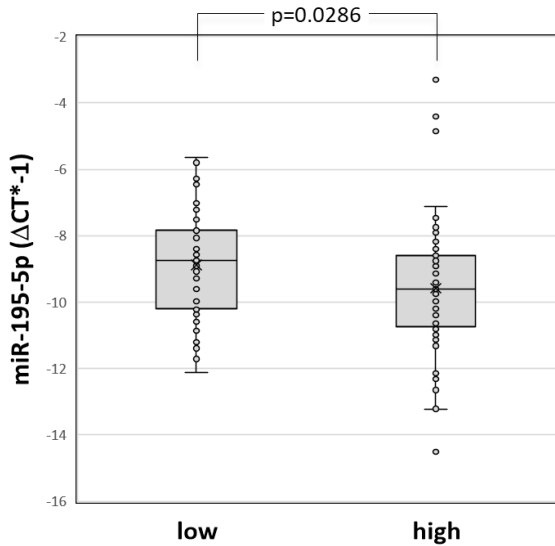


図3 膀胱癌のグレードと尿中エクソソーム内 miR195-5p発現量

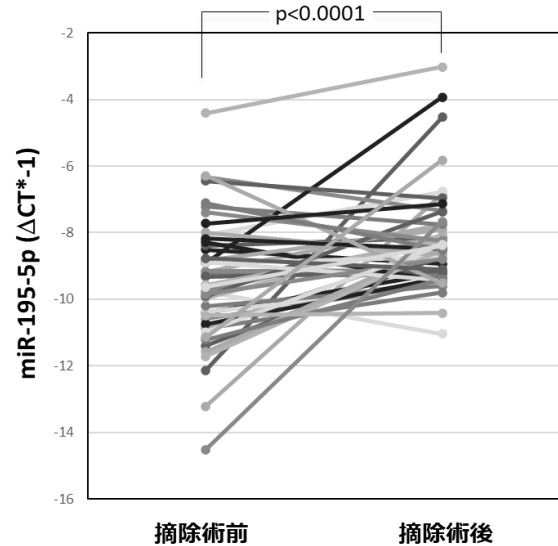


図4 膀胱癌摘除術前後の尿中エクソソーム内 miR195-5p発現量

(4) 膀胱癌患者血清中のマイクロ RNA を指標としたリキッドバイオプシーの確立

膀胱癌患者 392 例、健常者 100 名、膀胱癌以外の癌患者 480 名の血清から抽出したマイクロ RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、その結果から膀胱癌・非膀胱癌鑑別に有用なマイクロ RNA の最終候補として miR-6087, -6724-5p, -3960, -1343-5p, 1185-3p, 6831-5p, 4695-5p の 7 つが同定された。フィッシャーの判別分析を用いて膀胱癌・非膀胱癌鑑別の精度が最も高くなる計算式を以下のごとく確立した： $\text{diagnostic index} = (-2.21832) * \text{miR-6087} + (2.17809) * \text{miR-6724-5p} + (-1.04605) * \text{miR-3960} + (-1.57609) * \text{miR-1343-5p} + (0.202966) * \text{miR-1185-3p} + (0.23839) * \text{miR-6831-5p} + (-0.411172) * \text{miR-4695-5p} + 34.7121$ 。この 7 miRNA パネルを用いた計算式の感度は 91%、特異度は 98%、AUC は 0.98 と非常に高い精度で膀胱癌とそれ以外を鑑別することが可能で (図 5、6)、膀胱癌の検出に有用なバイオマーカーとなることが明らかになった。

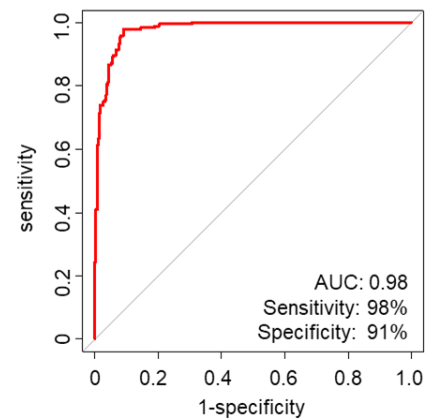


図5 7miRNAパネルを用いた判別式の診断精度

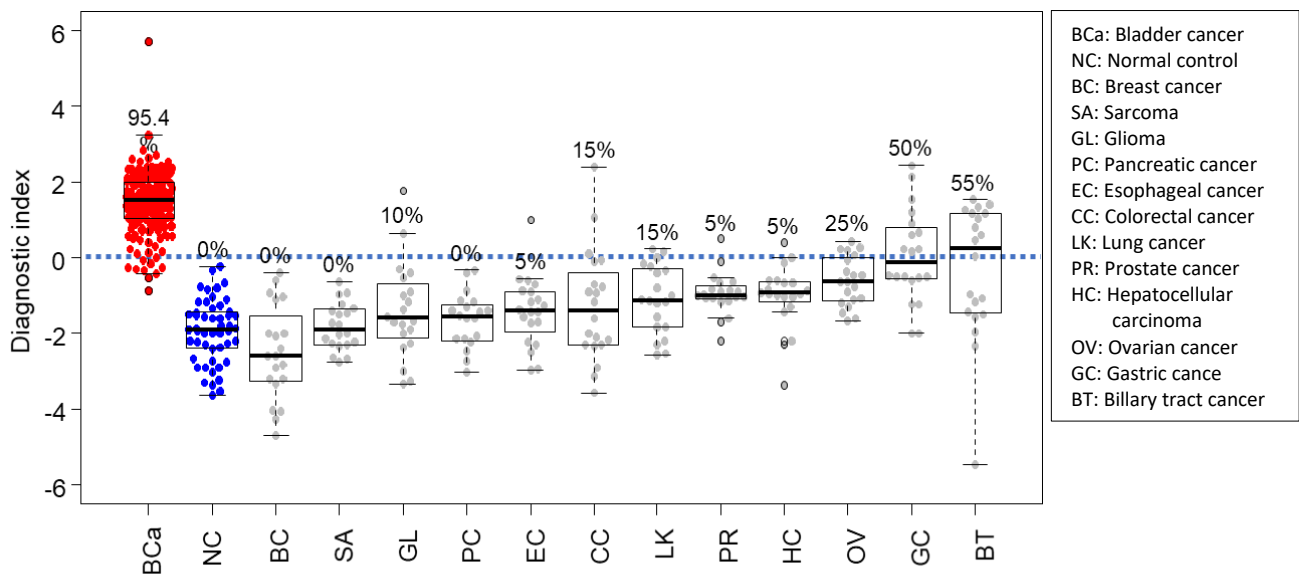


図6 7miRNAパネルを用いた判別式による各種癌患者および健常者の鑑別

- BCa: Bladder cancer
- NC: Normal control
- BC: Breast cancer
- SA: Sarcoma
- GL: Glioma
- PC: Pancreatic cancer
- EC: Esophageal cancer
- CC: Colorectal cancer
- LK: Lung cancer
- PR: Prostate cancer
- HC: Hepatocellular carcinoma
- OV: Ovarian cancer
- GC: Gastric cancer
- BT: Biliary tract cancer

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Usuba W, Urabe F, Yamamoto Y, Matsuzaki J, Sasaki H, Ichikawa M, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Kato K, Egawa S, Fujimoto H, Ochiya T	4. 巻 110
2. 論文標題 Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 408-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13856	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木秀郎、吉池美紀、関根美紀、薄場渉、相田紘一朗、工藤浩也、中澤龍斗、干川晶弘、吉岡祐亮、小坂展慶、竹下文隆、落谷孝広、カ石辰也
2. 発表標題 膀胱癌細胞株におけるmiR-195-5pの発現解析
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	落谷 孝広  (Ochiya Takahiro)  (60192530)	国立がん研究センター研究所・分子細胞治療分野・分野長    (82606)	
研究協力者	薄場 渉  (Usuba Wataru)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教    (32713)	
研究協力者	吉池 美紀  (Yoshiike Miki)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員    (32713)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野澤 資亜利  (Nozawa Shiari)	聖マリアンナ医科大学・医学部・非常勤講師  (32713)	
研究協力者	小坂 展慶  (Kosaka Nobuyoshi)	国立がん研究センター研究所・分子細胞治療分野・研究員  (82606)	

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