

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：20101
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K16701
研究課題名（和文）マイクロRNAとエピゲノム機構の相互作用による膀胱癌シスプラチン耐性化機序の解明

研究課題名（英文）Crosstalk between microRNA and epigenome for cisplatin resistance in bladder cancer.

研究代表者
進藤 哲哉（Tetsuya, Shindo）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80749292
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）：転移性膀胱癌に対する抗癌剤はシスプラチンを用いて治療を行うことが臨床上多いが、治療抵抗性を獲得し病勢が進行し、平均的な予後は1年程度とも報告されている。この抗癌剤抵抗性獲得にマイクロRNAという分子が関与していることが他の癌腫においても報告されており、耐性化機構の解明の一助となる可能性を秘めている。我々は膀胱癌においてシスプラチン耐性を獲得する機序としてマイクロRNA200bという分子が関与していることを解明し、さらに同遺伝子のエピゲノム変化、特にメチル化が関与していることを解明した。同分子は多数の抗癌剤耐性化遺伝子の発現を調整しており、膀胱癌抗癌剤耐性化を克服する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の高齢化に伴い、膀胱癌など尿路上皮癌の患者は泌尿器科癌症例の多くを占めており、その治療は重要な意味を持つに至っている。通常転移を伴う膀胱癌においてはシスプラチンという抗癌剤を中心として治療を行う。一般に70%程度の症例では一時的に奏功するが、癌細胞が抗癌剤に対する耐性を獲得し病勢が悪化することが多い。膀胱癌が抗癌剤に対する耐性を獲得する機序としてマイクロRNAの関与が報告されており、我々は抗癌剤耐性化した膀胱癌細胞株を用いてシスプラチン耐性化にかかわるマイクロRNAを同定した。さらに本マイクロRNAの調整にかかわるエピゲノム機構を検討し耐性化機序の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：In general, metastatic bladder cancer often treated by cisplatin based systemic chemotherapy. However, prognosis of the disease is reported around a year. In previous reports, microRNA reported that it related to chemoresistance in several cancer. To unveil the mechanism of cisplatin resistance in bladder cancer, we focused on microRNA 200b. According to our experiments, microRNA200b was extremely suppressed in cisplatin resistance bladder cancer cell line. Moreover, the microRNA was regulated by epigenome such as methylation. In the down stream of the microRNA several gene such as IGFBP3, ICAM1, TNFSF10 and histone coding gene were regulated. From our results, microRNA 200b may be the new strategy to overcome chemoresistance in metastatic bladder cancer.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 抗癌剤耐性 マイクロRNA エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

転移性膀胱癌に対する Gemcitabine と Cisplatin(以下 CDDP)併用療法が普及しているが、生存期間が 13.8 ヶ月と予後不良であり、セカンドライン以降の治療法としては免疫チェックポイント阻害剤である Pembrolizumab が挙げられる。CDDP ベースの術前補助化学療法は筋層浸潤癌に対しても適応され、全生存率の改善に寄与すると報告されるが、術前補助化学療法として施行された場合、生存における恩恵を得る症例は 5%程度であり、臨床所見からの治療効果予測は困難である。

近年、癌における miRNA の働きが注目されている。膀胱癌と miRNA の関連も多数の研究報告があり、治療標的および治療効果予測マーカーとしての応用可能性が期待される。これまで申請者らは、miRNA 遺伝子の DNA メチル化異常が尿中膀胱癌マーカーとして有用であることを明らかにし、さらに同マーカーによる早期の膀胱癌再発を予測できる可能性について検討を重ねてきた。また膀胱癌の化学療法抵抗性に、miRNA とエピゲノム異常の相互作用が関わっている可能性を見いだしつつある。現時点では膀胱癌治療における臨床的な選択肢として抗癌剤および免疫チェックポイント阻害剤などが使用可能であるが、CDDP を含むプラチナ系抗癌剤の使用後にのみ免疫チェックポイント阻害剤の使用が保険適応とされているため、一時治療としての CDDP 併用抗癌剤治療の重要性は変わらず、その抵抗性獲得を検討する臨床的、社会的意義は高いと考えられる。

2. 研究の目的

本来 miRNA は標的遺伝子と多対多のネットワークを形成することが特徴とされているが、多くのがん研究では miRNA が特定の遺伝子を標的とすることで機能を発揮すると結論づけていることが多い。本研究では miRNA とエピゲノムの相互作用による抗癌剤耐性獲得に関して検討することとし、CDDP 耐性化と候補である miR-200 が膀胱癌エピゲノムに与える影響を検証することを目的とする。また miRNA の制御にかかわるエピゲノム機構を解析することで新たな治療戦略の構築すること、治療効果予測マーカーとして用いることを最終的な研究の目的としている。

抗癌剤における治療効果予測マーカーが確立すれば、術前補助化学療法として予後を改善しうる症例を同定できるのみではなく、不要な抗癌剤治療(奏功しない症例における抗癌剤治療)をさけることができ、より早期に外科治療を提供することも可能である。本治療選択法が可能となれば患者に対する恩恵のみではなく、医療経済上も恩恵がもたらされると期待する。

3. 研究の方法

膀胱癌耐性の獲得にかかわる miRNA の同定のためシスプラチン耐性化膀胱癌細胞株を用い、感受性株と比較することで候補 miRNA を同定した。miRNA200b を候補として、その制御にかかわるエピゲノム機構として DNA メチル化の関与を検討するため RT-PCR、パイサルファイト・パイロシークエンス法、パイサルファイト・シークエンス法を用いて検討。エピゲノム機構の制御を検討する目的で抗癌剤耐性膀胱癌細胞株に対して DNA メチル化酵素阻害剤を用い、miR200b の発現を RT - PCR にて検討。さらに ChIP-PCR を用いることで、感受性株および耐性株におけるヒストンアセチル化の状況を比較する。さらに抗癌剤耐性株に対する DNA メチル化阻害剤の増殖抑制効果を確認し、CDDP と併用を行うことによる相乗的な効果も細胞増殖試験を用いて検討する。microRNA が膀胱癌細胞株に与える影響を検証するために microRNA を導入し、microarray を行う。

臨床的な予後を検討する目的で TCGA データベースを用いた検討を行う。TCGA データベースを用いた検討では、候補 microRNA と DNA メチル化の相関や、microRNA 発現、DNA メチル化レベルによる膀胱癌症例の全生存率の違いを Log-rank 検定で検討し、さらに DNA メチル化と microRNA 発現の相関をピアソン相関係数を用いて検討する。

4. 研究成果

miRNA200b は DNA メチル化により制御され、さらにヒストンアセチル化によっても制御されることが確認された。同エピゲノム機構による制御機構を介して、膀胱癌細胞株における抗癌剤耐性化遺伝子である ICAM1、IGFBP3、BBC3、TNFSF10、CDKN1C 遺伝子の発現上昇がみられ、さらに多数のヒストン遺伝子(HIST1H1D, HIST1H2AM, HIST1H4F, HIST1H4K など)の発現低下が生じることを見出し、同 miRNA は膀胱癌における CDDP 抵抗性細胞株におけるヒストン修飾にも影響を及ぼす可能性が考えられた。DNA メチル化に関しては脱メチル化剤である 5-アザシチジン投与により CDDP と相乗的に抗癌剤耐性化膀胱癌細胞株の増殖抑制効果も確認され、エピゲノムを介した抗癌剤耐性化機構が明らかとなった。アザシチジンは他癌腫における治療薬として臨床的に用いられており、膀胱癌における併用治療の可能性を示唆する結果と考えられた。TCGA データベースを用いた検討では miRNA200b の発現および同遺伝子上流の CpG 領域におけるメチル化が膀胱癌症例における予後の層別化因子であることが明らかとなり、臨床的な意義が示唆された。miRNA200b 発現が抑制されている症例群と比較して同遺伝子の発現が亢進している群では有意に予後良好であった ($P = 0.002$, Log-rank 検定)。さらに同遺伝子における CpG 領域 (cg0847826) の DNA メチル化が高い群では低い群と比較して有

意に予後が不良であることも確認された ($P = 0.002$, Log-rank 検定)。さらに microRNA200b の CpG 領域 (cg0847826) における DNA メチル化と microRNA200b 発現量の相関を検定したところ強い負の相関が認められ (ピアソン相関係数 $R = -0.702$, $P < 0.001$) DNA メチル化による制御機構が強くかわることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tetsuya Shindo, Takeshi Niimura, Hiroshi Kitajima, Kai Masahiro, Takashi Tokino, Naoya Masumori, Hiromu Suzuki
2. 発表標題 Epigenetic regulation of miR-200b is associated with cisplatin resistance in bladder cancer
3. 学会等名 第11回日米癌合同会議（国際学会）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----