

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790391

研究課題名 膀胱発がんにおける microRNA の発現およびその役割に関する研究

研究課題名 Alteration of microRNA expression and its role in bladder carcinogenesis

研究代表者

魏 民 (WEI MIN)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70336783

研究成果の概要：本研究の目的は膀胱発がんにおける microRNA 発現およびその役割を明らかにすることであり、膀胱発がんにおいて miR-125a および miR-125b が tumor-suppressor miRNA として働き、その発現量の低下は、ラット膀胱発がん過程の早期から関与することが明らかとなった。さらに、miR-125b の発現変動関連因子として 21 種類の蛋白を同定することに成功した。本研究で得られた成果は、膀胱がんの発がん機序の解明、さらには予防・治療にも寄与すると期待される。

研究成果の概要：The findings of the present study demonstrate that miR-125a and miR-125b are tumor-suppressor miRNAs and were down-regulated in the early stage of bladder carcinogenesis. We also identified 12 potential target genes of miR-125b by proteome analysis of pre-miR-125b-introduced human bladder cells. These findings enhance our understanding of the function of miRNA, and provide potential chemoprevention and therapeutic targets for bladder cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、microRNA、膀胱がん

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は、細胞内に存在する 22 塩基前後の長さの 1 本鎖 non-coding RNA であり、その機能は翻訳レベルでタンパク質の発現を制御していることが様々な研究から明らかになってきた。すなわち、miRNA が mRNA の 3' 側非翻訳領域に不完全な相補性があるとその翻訳を抑制し、その他の領域に完

全な相補性があると mRNA の分解を引き起す。最近の報告では、タンパク質をコードしている全遺伝子の少なくとも 30% を制御していると推測されている。

近年、様々ながん（乳がん、大腸がん、肺がん、膵がん、前立腺がん、胃がんなど）において miRNA の発現異常が報告され、がんの発生に関与していることがわかってきてい

る。また、一つの miRNA はがんの発生に関わる複数の遺伝子の発現に影響を与え、標的遺伝子の機能発現を干渉制御することでがんの病態に関与することが示唆された。しかし、膀胱がんにおける miRNA の発現およびその役割に関する知見はほとんどない。その原因として、臨床において miRNA 発現解析に欠かせないヒトの正常膀胱粘膜の採取が困難なことがあげられる。現在のところ、利用可能なヒト初代正常膀胱上皮細胞はなく、また既存の不死化したヒト正常膀胱上皮細胞は遺伝子操作が加えられているためコントロールとしては不適切であり、*in vitro* 実験での miRNA 発現解析は困難である。一方、化学発がん物質を用いたラット膀胱がん性試験では、無処置ラットから正常膀胱粘膜を採取できること、膀胱がんは組織学的にはヒトの膀胱がんの 90% を占める移行上皮がんであること、および膀胱早期増殖性病変からがんまでの各段階における miRNA の発現解析ができることから、ラット膀胱がんモデルは miRNA 発現解析に有用な手段であると考えられる。

2. 研究の目的

ラット膀胱がん性試験で得られた膀胱がんと正常膀胱粘膜を用いて、膀胱がんにおける miRNA 発現異常を明らかにするとともに、ラットおよびヒト膀胱がん細胞を用いて miRNA の機能解析および標的遺伝子の同定を行い、膀胱がんにおける miRNA の発現およびその役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BBN 誘発ラット膀胱がんにおける miRNA 発現解析

6 週齢雄 F344 ラットを 2 群に分け、実験群には *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を 0.05% の濃度で飲水投与し、対照群には水道水を 48 週間投与した。Ncode miRNA Microarray (Ver. 2, Invitrogen, 261 miRNA probes 搭載) を用いて、BBN 誘発膀胱がんと正常膀胱粘膜における miRNA の発現プロファイリング解析を行い、ラット膀胱がんで異常発現を示す miRNA の同定を行った。

(2) Dimethylarsinic acid (DMA) で誘発したラット膀胱がんにおける miRNA 発現解析

0.02% DMA の 2 年間飲水投与で誘発した雌雄ラット膀胱がんについて、Taqman microRNA assay 法を用いて、BBN 誘発膀胱がんで低発現を示した 6 種類の miRNA の発現を検討した。

(3) ラット膀胱早期増殖性病変における miRNA 発現解析

6 週齢雄 F344 ラット BBN と DMA を含めた 8 種類のラット膀胱発がん物質 (あるいは 3 種類の非膀胱発がん物質をそれぞれ 4 週間投与

した。各発がん物質の投与濃度はそれぞれの発がん用量であった。膀胱発がん物質の 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、phenethyl isothiocyanate (PEITC)、benzyl isothiocyanate (BITC)、sodium *ortho*-phenylphenate (NaOPP)、Butylated hydroxyanisole (BHA) および uracil (混餌投与) の投与濃度はそれぞれ 0.025%、2%、0.1%、0.1%、0.1% および 3% であった。肝発がん物質 diethylnitrosamine (DEN、飲水投与)、腎発がん物質 *N*-ethyl-*N*-hydroxy ethylnitrosamine (EHEN、飲水投与) および大腸発がん物質 1,2-dimethylhydrazine (DMH、腹腔内投与、1 回/週) の投与濃度はそれぞれ 0.1%、0.05% および 40mg/kg. B. W であった。実験開始後 4 週に Taqman microRNA assay 法を用いて膀胱粘膜における miR-125a および miR-125b の発現量を検討した。

(4) ヒト膀胱がんおよび尿沈渣における miR-125a および miR-125b の発現量の検討

ヒト膀胱がん全摘例 5 例のがん組織および正常膀胱粘膜、および膀胱がんおよび非膀胱がん患者の尿沈渣検体 10 例から miRNA を抽出し、miR-125a および miR-125b の発現量を検討した。

(5) miR-125b の標的遺伝子の同定

Pre-miR-125b が入手できなかったため、ヒト膀胱がん細胞に Pre-miR-125b を導入することによりその標的遺伝子の同定を行うことにした。7 種類の膀胱がん細胞株 (RT4, HT-1376, TCC-SUP, SW-780, 5637, UMUC-3 および T24) における miR-125b の発現量を検討した。プロテオーム解析法を用いた miR-125b の標的遺伝子の同定では、Pre-miR-125b で導入したヒト膀胱がん細胞 RT4 と Negative control 細胞からタンパク抽出し、Q-Star Elite LC-MS/MS system を用いて、処理によるタンパク質の変動を検索することにより、miR-125b の miRNA の標的遺伝子を同定した。

(6) 倫理面への配慮

動物実験に関しては、動物実験委員会の承認を取り、動物実験施設の飼育規定を遵守し、飼育する。ヒト膀胱がんおよび尿検体の使用に関しては、各患者から承諾を取り、かつ倫理委員会の承諾を受けて研究を行う。

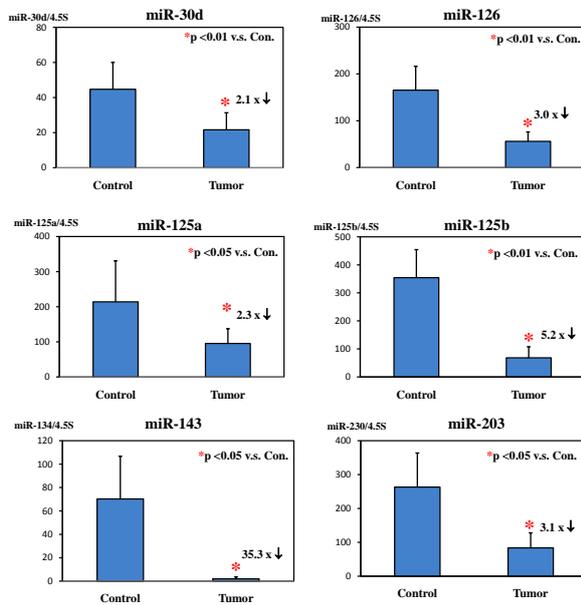
4. 研究成果

(1) BBN 誘発ラット膀胱がんにおける miRNA 発現解析

miRNA アレイを用いて BBN 誘発ラット膀胱がん (12 例) と正常膀胱粘膜 (4 例) における miRNA 発現プロファイリングを行った結果、すべての膀胱がんで共通して発現量が 2 倍以上低下した miRNA が 6 種類認められた。一方、

すべての膀胱がん共通して発現量が増加したものが認められなかった。Taqman microRNA assay 法を用いた確認試験では、正常膀胱粘膜と比較して膀胱がん上述の6種類のmiRNA (miR-30d, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-143 および miR-203) の発現量が有意に低下したことが確認された (図1)。

図1 BBN誘発膀胱がんにおけるmiRNA発現



(2) Dimethylarsinic acid (DMA)で誘発したラット膀胱がんにおけるmiRNA発現解析

DMA誘発ラット膀胱におけるBBN誘発膀胱がん発現の低下が認められた6種類のmiRNAの発現を検討した結果(表1)、正常膀胱粘膜と比較してmiR-125a及びmiR-125bの発現量が雌雄ラット膀胱がんともに有意な低下したが、miR-30d, miR-126, miR-143およびmiR-203がBBN誘発膀胱がんとは異なって逆

表1 DMA誘発膀胱がんにおけるmiRNA発現

	Fold changes (v.s. non-treatment mucosa)	
	DMA-male-Tumor	DMA-female-Tumor
miR-30d	3.0 *	4.4*
miR-125a	0.6*	0.5*
miR-125b	0.2*	0.5 *
miR-126	5.9 *	17.1 *
miR-143	1.5 *	2.4*
miR-203	11.8 *	31.9*

* Significantly different from non-treatment mucosa.

に有意に増加した。このことから異なる発がん物質で誘発された膀胱がんにおけるmiRNAの発現パターンが異なることが考えられた。また、miR-125a及びmiR-125bは2種類の膀胱がんにおいて共通して発現量の有意な低

下が認められたことから、これらが膀胱がんの発生に関与することが示唆された。

(3) ラット膀胱早期増殖性病変におけるmiRNA発現解析

ラットにBBN及びDMAを含めた8種類の膀胱発がん物質、あるいは3種類の非膀胱発がん物質をそれぞれ4週間投与した膀胱粘膜におけるmiRNA発現量を検索した結果(表2)、miR-125a及びmiR-125b両方ともすべての膀胱発がん物質において共通して発現量の有意な低下が認められた。一方、すべての非膀胱発がん物質では発現量の変動はみられなかった。これらの結果より、miR-125a及びmiR-125bは膀胱発がんにおいてtumor-suppressor miRNAとして働き、早期から膀胱がんの発生に関与することが示唆された。また、miR-30d, miR-126, miR-143およびmiR-203の発現量がDMA膀胱がん有意に増加したが、4週間投与した粘膜では有意に減少した。このことから、miRNAが膀胱発がん過程においてその発現レベルが変動する可能性があることが示唆された。

表2 ラット膀胱早期増殖性病変におけるmiR-125aおよびmiR-125bの発現

Test chemical	Fold changes (v.s. non-treatment mucosa)					
	miR-30d	miR-125a	miR-125b	miR-126	miR-143	miR-203
Bladder carcinogen						
BBN	0.5 *	0.5 *	0.3*	0.4*	0.2 *	1.2
2-AAF	0.6 *	0.6 *	0.6*	0.7	0.5*	1.3
PEITC	0.6	0.4*	0.6*	0.7	0.4*	0.6
BITC	0.6	0.4*	0.7*	0.9	0.2*	1.0
NaOPP	0.5*	0.3*	0.5*	0.5*	0.2*	1.4
BHA	0.4*	0.4 *	0.5 *	0.5*	0.2*	1.2
Uracil	0.4*	0.2*	0.4*	0.3*	0.0*	1.8 *
DMA	0.6*	0.6 *	0.7*	0.5*	0.4 *	0.7
Non-bladder carcinogen						
DEN	1.1	1.1	1.2	1.3	1.2	1.2
EHEN	1.1	1.1	1.0	1.2	1.1	1.5
DMH	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.2

* Significantly different from non-treatment mucosa.

(4) ヒト膀胱がんおよび尿沈渣におけるmiR-125aおよびmiR-125bの発現量の検討

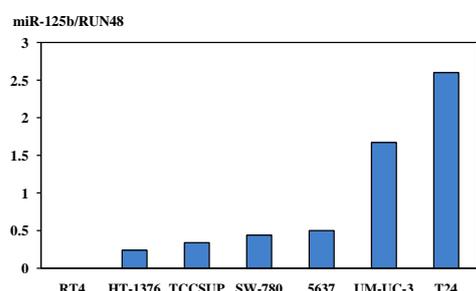
ヒト膀胱がんでは非がん部に比較してmiR-125aおよびmiR-125bの発現量が低下したことから、これらの2種類のmiRNAの発現がヒト膀胱がんの発生にも関与することが明らかとなった。膀胱がん患者および非膀胱がん患者の尿沈渣におけるmiR-125aおよびmiR-125bの発現量を検討した結果、両者の量と膀胱がんの有無との間に有意な相関はみられなかった。今後、膀胱がんの早期発見マーカーとしての有用性を明らかにするためには、尿中におけるそれらの発現量を検討する必要があると考えられる。

(5) miR-125bの標的遺伝子の同定

7種類のヒト膀胱がん細胞株(RT4, HT-1376,

TCC-SUP, SW-780, 5637, UMC-3 および T24) における miR-125b の発現量を比較検討した結果、RT4 における miR-125b の発現量もともと低かったことが明らかとなった (図 2)。

図 2 ヒト膀胱がん細胞株における miR-125b の発現



この結果より、miR-125b の標的遺伝子の同定試験では、RT4 膀胱がん細胞に Pre-miR-125b を導入し、導入細胞および Negative control 細胞 (NC 細胞) からタンパク抽出し、Q-Star Elite LC-MS/MS system を用いて導入によるタンパク質の変動を検索した。その結果、NC 細胞に比較して Pre-miR-125b を導入した細胞で発現が有意に減少および有意増加したタンパク質 21 種類が認められた。また、これらのタンパク質について Ingenuity pathway analysis を行ったところ、miR-125b の導入により Actin cytoskeleton, RohA, VEGF, PLC および PAK シグナルパスウェイが変動したことが判明した。さらに、miRNA が遺伝子の発現を負に調節することから、これらタンパクのうち発現の有意な低下が認められたものが miR-125b の標的である可能性が高いと考えられた (表 3)。

表 3 Pre-miR-125b 導入 RT4 細胞で発現が有意に減少したタンパク質

Name	Ratio (v.s. Con)	P value
Coactosin-like protein	0.003	0.003
Keratin, type I cytoskeletal 14	0.01	0
Small proline-rich protein 3	0.01	0
Protein S100-A4	0.01	0
Tubulin-specific chaperone A	0.01	0.04
40S ribosomal protein S4, Y isoform 2	0.01	0.022
Importin-4	0.02	0.049
LIM domain and actin-binding protein 1	0.03	0.004
Annexin A1	0.05	0
AHNAK	0.10	0
Prothymosin alpha	0.11	0.002
Protein S100-A11	0.11	0.007
Lamin-A/C	0.12	0.002
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	0.13	0
Ezrin	0.13	0.014
Elongation factor 1-delta	0.16	0.038
14-3-3 protein sigma	0.19	0.05
Beta-actin-like protein 2	0.25	0.004
Keratin, type II cytoskeletal 8	0.26	0
Keratin, type I cytoskeletal 18	0.31	0.037
Keratin, type II cytoskeletal 7	0.50	0.036

以上より、miR-125a 及び miR-125b は膀胱がんにおいて tumor-suppressor miRNA として働き、早期から膀胱がんの発生に関与することが示唆された。また、miR 125b の導入で発現量の有意な低下が認められたタンパク質は膀胱がんの予防および治療における直接あるいは間接的な標的分子になる可能性も考えられた。本研究で得られた知見は、膀胱がんの発生と進展のメカニズムの解明さらに予防・治療につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- Doi, K., Sakai, K., Tanaka, R., Toma, K., Yamaguchi, T., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Chemopreventive effects of 13alpha,14alpha-epoxy-3beta-methoxyserratane-21beta-ol (PJJ-34), a serratane-type triterpenoid, in a rat multi-organ carcinogenesis bioassay. 査読あり、Cancer Lett., 289, 161-169, 2010.
- Suzuki, S., Arnold, L. L., Pennington, K. L., Kakiuchi-Kiyota, S., Wei, M., Wanibuchi, H. and Cohen, S. M.: Effects of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, on the urine and urothelium of the rat. 査読あり、Toxicol Sci., 113, 349-357, 2010.
- Fukushima, S., Wei, M., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H.: Thresholds for genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. 査読あり、Cancer Risk Assessment, 8, 207-221, 2010.
- Tago, Y., Wei, M., Ishii, N., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H.: Evaluation of the subchronic toxicity of dietary administered Equisetum arvense in F344 rats. 査読あり、J Toxicol. Pathol., 23, 245-251, 2010.
- Doi, K., Wei, M., Kitano, M., Uematsu, N., Inoue, M. and Wanibuchi, H.: Enhancement of preneoplastic lesion yield by chios mastic Ggm in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay. 査読あり、Toxicol. Appl. Pharmacol., 234, 135-142, 2009.
- Kushida, M., Wanibuchi, H., Wei, M., Kakehashi, A., Ozaki, K., Sukata, T., Miyata, K., Ogata, K., Uwagawa, S. and Fukushima, S.: Ethanol dose not promote MeIQx-initiated rat colon

carcinogenesis based on evidence from analysis of a colon cancer surrogate marker. 査読あり、J Toxicol. Pathol., 22, 65-70, 2009.

- ⑦ Tanaka-Okamoto, M., Hori, K., Ishizaki, H., Hosoi, A., Itoh, Y., Wei, M., Wanibuchi, H., Mizoguchi, A., Nakamura, H. and Miyoshi, J.: Increased susceptibility to spontaneous lung cancer in mice lacking LIM-domain only 7. 査読あり、Cancer Sci, 100, 608-616, 2009.
- ⑧ Fukushima, S., Kakehashi, A., Wei, M. and Wanibuchi, H.: Existence of a threshold for the genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. 査読あり、Genes and Environment, 31, 33-36, 2009.
- ⑨ Kakehashi, A., Inoue, M., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. 査読あり、Toxicol. Appl. Pharmacol., 238, 71-79, 2009.
- ⑩ Romanenko, A., Kakehashi, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Vozianov, A. and Fukushima S.: Urinary bladder carcinogenesis induced by chronic exposure to persistent low-dose ionizing radiation after Chernobyl accident. 査読あり、Carcinogenesis, 30, 1821-1831, 2009.
- ⑪ Kakehashi, A., Kato, A., Inoue, M., Ishii, N., Okazaki, E., Wei, M., Tachibana, T. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. 査読あり、Toxicol. Appl. Pharmacol., 242, 47-55, 2009.
- ⑫ Wei, M., Hamoud, A. S., Yamaguchi, T., Kakehashi, A., Morimura, K., Doi, K., Kushida, M., Kitano, M., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Potassium bromate enhances N-Ethyl-N-Hydroxyethylnitrosamine-Induced kidney carcinogenesis only at high dose in wistar rats: Indication of the existence of an enhancement threshold. 査読あり、Toxicol Pathol., 37, 983-991, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 魏 民、石井真美、北野光昭、多胡善幸、

福島昭治、鰐淵英機: IQ の発がん性には実地的な閾値が存在する. 第 69 回日本癌学会学術総会, 9 月 22-24 日, 大阪, 2010.

- ② 魏 民、金川明裕、田尻正喜、山田貴宣、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機: ヒ素膀胱発がん原因物質の探索: 新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の同定およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討. 第 25 回発癌病理研究会, 8 月 24 日, 松島, 2010.
- ③ 魏 民、山野荘太郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機: ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いた浸潤性膀胱がんモデルの開発. 第 99 回日本病理学会総会, 4 月 27 日, 東京, 2010.
- ④ 魏 民、圓藤吟史、鰐淵英機: 膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響. 第 15 回ヒ素シンポジウム, 11 月 28-29 日, 大阪, 2009.
- ⑤ 魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、石井真美、北野光昭、鰐淵英機: MicroRNA-125b はラット膀胱発がんの早期マーカーとして有用である. 第 68 回日本癌学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009.
- ⑥ 魏 民、梯アンナ、福島昭治、鰐淵英機: 膀胱発がん物質の早期検出マーカーの検討. 第 98 回日本病理学会総会, 5 月 1-3 日, 京都, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

魏 民 (WEI MIN)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70336783

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし