

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09404

研究課題名(和文) セルソーティングを応用した尿中マイクロRNA検出による新規尿路上皮癌診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a new diagnostic method for urothelial carcinoma by detecting urinary microRNA using cell sorting system

研究代表者

榎田 英樹 (ENOKIDA, Hideki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80347103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAのスクリーニングを行い、miR-200aやmiR-191が有用なマーカーであることが判明し、**がん**と**非がん**をAUC 0.864の精度で鑑別できた。附随研究では癌抑制的miR-99a-5pの発現導入は膀胱癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を抑制しGemcitabine (GEM)の耐性株におけるGEM感受性を改善した。さらにmiR-99a-5pの標的遺伝子であるSMARCD1のノックダウンも癌細胞の増殖能を抑制した。さらに、miR-99a-5pの誘導とSMARCD1の抑制が、p21の誘導を通じて細胞老化に寄与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、尿路上皮癌に対する腫瘍マーカー開発はアンメットニーズであるが、今回の知見により、将来的な「尿路上皮癌の診断キット」の開発への基礎データを取得することができたと考える。また臨床的に問題である尿路上皮癌の抗癌剤耐性の克服に向けて、miR-99a-5pを基点とする新たな耐性機序克服に関する知見の獲得ができ、今後の尿路上皮癌治療の発展に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Screening for miRNAs revealed that miR-200a and miR-191 were useful markers, and they were able to differentiate between cancers and non-cancers with an accuracy of 0.864 AUC. In an ancillary study, the expression and induction of the tumor-suppressive miR-99a-5p inhibited the proliferative, migratory and invasive capacity of bladder cancer cells and improved GEM sensitivity in Gemcitabine (GEM)-resistant strains. In addition, knockdown of SMARCD1, the target gene of miR-99a-5p, also suppressed the proliferative ability of cancer cells. Furthermore, it was shown that the induction of miR-99a-5p and the suppression of SMARCD1 contributed to cellular senescence through the induction of p21.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：尿路上皮癌 腫瘍マーカー マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

現在、臨床的に最も有用な尿路上皮癌(膀胱癌および腎盂尿管癌)の腫瘍マーカーは尿細胞診検査である。ところが尿細胞診は検査法として特異度は高いが(90 - 95%)感度が低く(30 - 40%)陰性であっても癌を否定できない欠点がある。近年、BTA、NMP-22、Urovisionなどの新しい分子マーカーが開発されたが感度・特異度ともに中途半端でありブレイクスルーとなっていない。腎盂尿管癌では尿細胞診検査が陰性であった場合、診断のために侵襲の大きな尿管鏡検査が必要である。また膀胱癌に対する内視鏡手術(TUR-BT)後の再発の診断には頻回に膀胱鏡検査が実施されており、患者への侵襲やコスト面の問題は大きい。このような現状から非侵襲的で感度・特異度ともに優れた腫瘍マーカーの早急な開発が望まれている。

近年、種々の遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構の一つとして、蛋白をコードしない一本鎖機能性RNAであるマイクロRNA(miRNA)が注目されてきた。miRNAは21塩基前後の短いRNAで、ターゲットであるメッセンジャーRNAの翻訳領域もしくは3末側非翻訳領域をブロックして、発生や分化、細胞増殖、アポトーシス等の様々な調節機構としての役割を担っている。尿路上皮癌患者の腫瘍組織においてもmiRNAの発現パターンが変化し、発癌や癌細胞自体の増殖・浸潤能に寄与するとする多くの報告がある。さらにこれらのmiRNAを尿路上皮癌患者の血中・尿中で検出することで、腫瘍マーカーとしての有用性がレトロスペクティブに検討されてきた(Enokida, *Investig Clin Urol* 2016)。しかしながら、これまで前向きにその有用性を示した検討は殆どない。これは我々の経験からも癌で発現が上昇しているmiRNAは炎症性疾患で発現が上昇するmiRNAと共通するものが多く、通常の検出系では擬陽性が高くなるために診断マーカーとなり得ないことを示唆している。そこでセルソーティングにより癌患者の尿に浮遊する微量の癌細胞を選別抽出して、マーカーとなるmiRNAを検出することを思い立つに至った。

### 2. 研究の目的

この研究の目的は膀胱癌や上部尿路上皮癌において臨床で有用な診断マーカーを開発することである。申請者らは過去のマイクロRNA(miRNA)研究から尿路上皮癌組織で発現が亢進しているmiRNAを尿中で検出することによる診断マーカーの開発を行ってきたが、これまでの前向き試験で有用な結果が得られなかったのは尿中の赤血球や白血球の混入が原因であることを突き止めた。予備的な実験によりこの問題はセルソーティング技術により、尿沈渣から剥離した癌細胞のみをセルソーターで選別してmiRNAを測定することで解決することが判明した。本申請はレトロスペクティブな検討のみでなく、前向き試験として「肉眼的血尿を主訴とする患者」の診断検査としてのmiRNA測定の有用性を検討して、将来的な「尿路上皮癌の診断キット」の開発への基礎データを取得する提案を行いたいと考えた。

### 3. 研究の方法

既知検体用いたプレスクリーニングによる候補miRNAの絞り込みと臨床病理学的事項との関連性の解析:スクリーニングに用いるmiRNAのリストは膀胱癌および上部尿路

上皮癌の miRNA マイクロアレイのデータをそれぞれ保有している。それぞれに共通するものを中心に約 50 種類の miRNA をスクリーニングを行った。まず、既知の保存尿検体（尿路上皮癌患者：80 検体、尿路結石：50 検体、尿路感染症：45 検体、健常者：30 検体）についてセルソーティング処理を行い、RNA を抽出して stem-loop PCR 法により候補 miRNA の発現量を測定して、癌と非癌サンプルにおける発現差が大きいものから最終候補の miRNA を 5 つ程度に絞り込む。癌と非癌サンプルを区別するため Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線分析にて、各 miRNA 測定における至適カットオフ値を決定する。また各 miRNA の発現と臨床病理学的事項（年齢・腫瘍浸潤度・腫瘍グレード・CIS の有無など）との相関も検証する。

肉眼的血尿患者を対象とした候補 miRNA による前向きな診断検査の実施と TURBT 術後の再発予測マーカーとしての候補 miRNA の有用性の検討：既に鹿児島県内の関連施設で収集を進めている「肉眼的血尿を主訴に泌尿科外来を受診した患者」の尿について、5 つの候補 miRNA 測定による前向きな診断検査を実施する。現在、既に約 200 例の患者同意を得た検体収集を終えており、さらに 100 例ほどの症例追加が見込まれている。診断のバイアスを避けるために全ての前向きな診断検査が終了してから、各症例の疾患診断名を各施設に照会する。また各 miRNA の発現と臨床病理学的事項（年齢・腫瘍浸潤度・腫瘍グレード・CIS の有無など）との相関も検証する。更に膀胱癌と診断され TURBT を実施された症例に関しては、術後 2 日以降でかつ退院前の尿検体を追加で収集してもらい、同様の診断検査を実施して術後 miRNA の発現量が再発の予測因子となりうるか検討する。

5 つの候補 miRNA については、その癌促進的作用について探求を行う。具体的には候補 miRNA の培養細胞へのトランスフェクションによって細胞の増殖・浸潤・遊走機能が亢進するか検討する。また permanent な候補 miRNA の発現導入細胞を樹立して in vivo における腫瘍増殖亢進を確認した後に、オミックス解析を行って候補 miRNA がドライブする癌シグナル経路を解析する。活性化しているシグナル経路に対する阻害薬実験を行い、将来的な癌治療に繋がる可能性について研究を行う。

.....

#### 4 . 研究成果

初年度は有用なマーカーとなり得る miRNA のスクリーニングを行った。既に保有している尿検体（尿路上皮癌患者：80 検体、尿路結石：50 検体、尿路感染症：45 検体、健常者：30 検体）を用いて候補 miRNA の絞り込みを行った。候補 miRNA の選別には過去に樹立した膀胱癌および上部尿路上皮癌患者の病理組織から得られた miRNA プロファイルから作成できた。上部尿路上皮癌のプロファイルでは miR-200a や miR-191 が有用なマーカーであることが判明し、がんと非がんを AUC 0.864 の精度で鑑別することが可能であった。現在、症例数を増やして追加解析を行っている。附随研究として、このリストの中から miR-99a-5p が癌抑制的作用を有する miRNA と考えられ、膀胱癌細胞株における miR-99a-5p の発現導入は癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能を抑制した。また膀胱癌の一次化学療法抗癌剤である Gemcitabine (GEM) の耐性株を作成したが、miR-99a-5p の発現導入により GEM 感受性が改善することが示された。さらに miR-99a-5p の標的遺伝子として、RNA シーケンス解析から SMARCD1 に着目した。ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、miR-99a-5p が SMARCD1 を直接制御することが示された。si-RNA を用

いた機能喪失試験では増殖能、遊走能、浸潤能が抑制され、GEM 感受性が回復した。SMARCD1 のノックダウンは *in vivo* においても増殖能を抑制した。さらに、ガラクトシダーゼ染色により、miR-99a-5p の誘導と SMARCD1 の抑制が、p21 の誘導を通じて細胞老化に寄与していることが示された。さらに膀胱癌の一次化学療法である Gemcitabine と Cisplatin に対する耐性株においては、RAS の発現が上昇していることを突き止め、pan-RAS 阻害薬の投与により耐性克服が可能であることを見出した。これらの知見により、将来的な「尿路上皮癌の診断キット」の開発への基礎データを取得することができたと考える。また臨床的に問題である尿路上皮癌の抗癌剤耐性の克服に向けて新たな知見の獲得ができ、今後の研究の発展に寄与できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tamai M, Tatarano S, Okamura S, Fukumoto W, Kawakami I, Osako Y, Sakaguchi T, Sugita S, Yonemori M, Yamada Y, Nakagawa M, Enokida H, Yoshino H.	4. 巻 16
2. 論文標題 microRNA-99a-5p induces cellular senescence in gemcitabine-resistant bladder cancer by targeting SMARCD1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Oncol.	6. 最初と最後の頁 1329-1346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.13192.	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 -

1. 著者名 Yoshino H, Yokoyama S, Tamai M, Okamura S, Iizasa S, Sakaguchi T, Osako Y, Inoguchi S, Matsushita R, Yamada Y, Nakagawa M, Tatarano S, Tanimoto A, Enokida H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization and treatment of gemcitabine- and cisplatin-resistant bladder cancer cells with a pan-RAS inhibitor.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 1056-1066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13616.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 玉井元規, 吉野裕史, 坂口大, 榎田英樹.
2. 発表標題 microRNA-99a-5pは、膀胱癌におけるゲムシタピン耐性を克服するための重要な分子である.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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 分 担 者	吉野 裕史  (YOSHINO Hirofumi)  (90642611)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師    (17701)	

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
研究分担者	鐘野 秀一  (TATARANO Shuichi)  (30624655)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授    (17701)	
研究分担者	坂口 大  (SAKAGUCHI Takashi)  (70779008)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教    (17701)	

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