様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 6 月 20 日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：26293354

研究課題名（和文）膀胱癌に対するナノミセルを介した癌抑制型マイクロRNAによる新規核酸治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel nucleic acid treatment through nano-micelles delivering tumor suppressive microRNA in bladder cancer

研究代表者
榎田　英樹（ENOKIDA, Hideki）

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：80347103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　12,300,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シークエンサーによる膀胱癌において発現変動するマイクロRNAの網羅的な解析から、複数の癌抑制制的マイクロRNA（miR-23b/24/27b、miR-144-5p/3p、miR-26a/b-5, miR-199 familyなど）を同定して、それらが標的とする癌関連遺伝子の探索を行った。次にIn-vivoにおいて癌抑制型マイクロRNAであるmiR-218を用いてナノミセル型キャリアを作成し、ゼノグラフトマウスに尾静脈注射を行った結果、がん組織内に蛍光色素でタグ付けしたナノミセル型キャリアが取り込まれたことが確認され、癌抑制型マイクロRNAのin-vivoでの導入に成功した。

研究成果の概要（英文）：Based on the microRNAs expression profile by next generation sequencing in bladder cancer, we identified several tumor suppressive microRNAs including miR-23b/24/27b, miR-144-5p/3p, miR-26a/b-5, and miR-199 family and found their target tumor-associated genes. Next, we established nano-micelles carrier containing tumor suppressive miR-218 and administrated it intravenously to xenograft model mice. Finally, we confirmed that the red-pigmented carrier was successfully delivered to cancer tissues.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：マイクロRNA　膀胱癌　ナノミセル

１．研究開始当初の背景

本邦における膀胱癌の罹患数は 24,619 人（2008 年)、また死亡数は 7,299 人 (2012 年）である。進行性膀胱癌の予後は不良であり、再発・転移症例に対して抗癌剤治療は GC 療法（Gemcitabine+Cisplatin）がファーストラインとして行われるが、有効なセカンドライン抗癌剤治療は現在も確立されていない。他の泌尿器癌（前立腺癌や腎癌）に比べて明らかに治療手段が少なく、治療成績の向上のために新規治療法の開発は急務である。

現在、ヒトでは 2,416 マイクロ RNA が登録されている（miRBase release 20)。この RNA 分子は、最終的に１本鎖の RNA 分子として機能し、タンパクコード RNA の翻訳阻害によりその発現制御をしている。21 世紀の癌研究では、癌で活性化している各シグナル伝達関連遺伝子や上皮間葉転換（EMT: epithelial-mesenchymal transition）関連遺伝子の解析だけでは不十分であり、これらを制御しているマイクロ RNA 解析に基づく癌関連分子ネットワークの再構築が展開されている。しかしながら、マイクロ RNA の治療応用はトピックスではあるが未だ開発の途中であり、最も克服すべき課題はマイクロ RNA を確実に組織に運び、かつ安全性の高いドラッグデリバリーシステム（DDS)を開発することである。

２．研究の目的

この研究の目的は、「癌抑制型マイクロ RNA」の腫瘍抑制効果を in vivo において証明し、マイクロ RNA を用いた新規核酸治療法の確立を加速させる事である。近年、機能性 RNA の一つであるマイクロ RNA の発現異常が様々な癌において見つかり、癌の促進や抑制に深く関わっている事が明らかとなった。我々は次世代シークエンサーによる「膀胱癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。さらに、膀胱癌において発現が低下しているマイクロ RNA に注目して、癌の増殖・転移を抑制する「癌抑制型マイクロ RNA」を報告してきた。本申請では、多機能ドラッグデリバリーシステムとして注目されているナノミセルに「癌抑制型マイクロ RNA」を内包し、膀胱癌転移モデルマウスを用いて、in vivo における解析を行う。本研究の成果により、マイクロ RNA を用いた新規核酸治療法の開発を具現化させることが期待できる。

３．研究の方法

本研究は、次世代シークエンサーによる「膀胱癌マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づいて、癌で発現が抑制されているマイクロ RNA に着目する。既に有効な腫瘍増殖・転移抑制効果が判明しているマイクロ RNA に関しては、ナノミセル型薬物搬送システムへの導入を先行する。最終的には核酸治療薬の候補として有望な癌抑制型マイクロ RNA を同定し、その生体内における抗腫瘍機序についての解明を目標とする。以下に研究ステップについて示す。

(1)「膀胱癌マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づいて、発現が抑制されているマイクロ RNA について、癌細胞にリポフェクタミンによる核酸導入を行い、細胞増殖・浸潤・遊走の抑制効果を in vitro 実験で検討する。癌抑制型マイクロ RNA が制御する分子ネットワークの探索を、in silico 解析（コンピューターによるデータ解析）や核酸導入細胞の遺伝子発現解析などを駆使して行う。

(2) 有望な癌抑制型マイクロ RNA に対して、ナノミセル型キャリアを作成して、まず培養細胞における核酸導入効率を検討し細胞増殖・浸潤・遊走の抑制効果を in vitro 実験で検討する。

(3) 上記実験で抗腫瘍効果が明らかに認められるマイクロ RNA について、GFP-BOY ゼノグ

ラフトモデルマウスの尾静脈から投与して in vivo における腫瘍増殖・転移抑制効果を検討する。原発巣・転移巣ゼノグラフトを回収して、マイクロアレイ解析により各シグナル伝達関連遺伝子や EMT 関連遺伝子の発現変化を調べ、生体内における腫瘍増殖・転移抑制効果の機序を解明する。

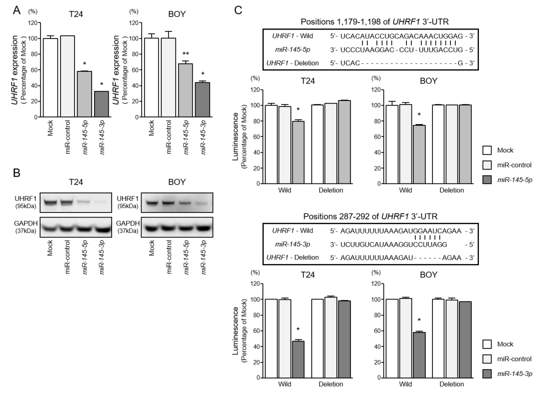
４．研究成果

次世代シークエンサーを駆使して、シークエンスレベルにおける解析を行い、膀胱癌で発現変動するマイクロ RNA の網羅的な解析を行った。この中から、発現が抑制されているマイクロ RNA の上位 50 にフォーカスした。現在使用可能な既存薬の標的となっているシグナル伝達機構と、膀胱癌細胞における機能性 RNA 分子ネットワークの相互関係を研究・理解して、膀胱癌の新規個別化治療戦略を構築し、ナノミセルによるドラッグデリバリーシステムに応用するマイクロ RNA の候補を見つけることが目標である。

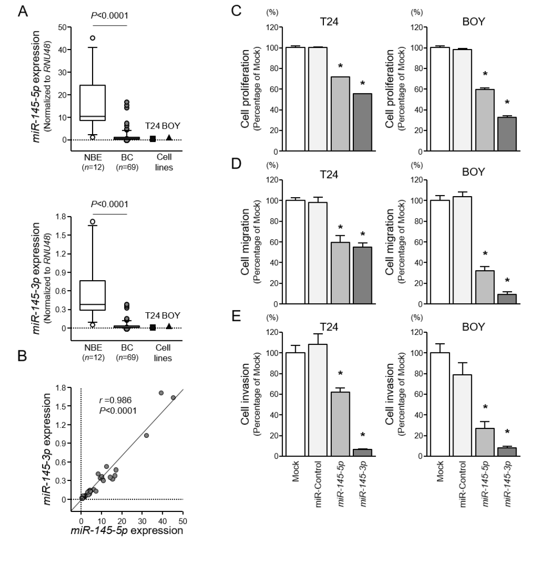
次世代シークエンサーによる miRNA 発現解析では、933 個の既知 miRNA と 17 個の新規 miRNA の発現を解析し得た。933 個の既知 miRNA のうち、膀胱癌で有意に発現が低下していた 60 個の miRNA の中から、クラスター miRNA に着目し、その機能解析と標的遺伝子群の探索を行った。ヒト染色体 9q22.32 領域に存在するクラスター miRNA (miR-23b/24/27b) について、膀胱癌における役割について検討した。膀胱癌臨床検体と正常腎組織において real time PCR を行い、miR-23b/24/27b の発現を測定した。miR-23b/24/27b と miR-control の発現導入膀胱癌細胞株（BOY・T24）を作成して、XTT・wound healing・cell invasion assay を行った。miR-23b/24/27b の発現は癌組織で有意に低下しており、両者の発現は正の相関を認めた。miR-23b/24/27b 発現導入膀胱癌細胞株で遊走能、浸潤能の抑制効果を認めた。また、in-silico 解析で導かれた c-MET, EGFR, FOXM1 の発現は miR-23b/27b 発現導入により著名に抑制された。miR-23b/24/27b クラスターは、膀胱癌細胞において c-MET, EGFR を標的とし癌抑制型 miRNA として機能している事が示唆された。

さらに、miR-144-5p は CCNE1/2 の発現を抑制することにより、膀胱癌細胞における細胞分裂周期を調節していることが明らかになった。従来、他の癌種でも癌抑制型マイクロ RNA として知られていた miR-145-5p のパッセンジャー鎖である miR-145-3p はこれまでその機能が不明であったが、ともに共通の標的遺伝子である UHRF1 の発現を直接抑制することが明らかになった（下図）。UHRF1 はメチル化やヒストン脱アセチル化を介して、癌細胞における癌抑制遺伝子の不活化に寄与していると考えられている（下図）。

ルシフェラーゼアッセイによる結合サイトの証明

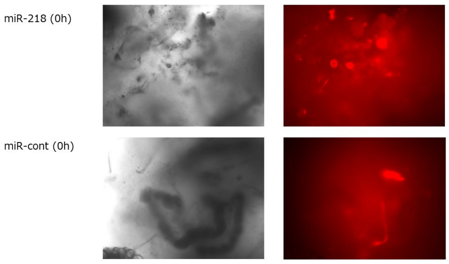


miR-145-5p発現導入による細胞機能解析



同様に miR-139-5p はパッセンジャー鎖である miR-139-3p と共同して腫瘍間質における matrix metalloprotease 11 の発現を調節していることを明らかにした。また miRNA-26a-5p と miR-26b-5p は共通のターゲットである PLOD2 を介して、腫瘍間質のコラーゲン繊維のリモデリングに関与していることも明らかにした。最近の研究では microRNA-199 family の発現高値は膀胱癌患者の予後良好の予測因子であり、インテグリンシグナル伝達を制御して、癌抑制的に働くことが示唆された。

以上の結果を踏まえ、次の段階として in vivo におけるナノミセル型薬物搬送システムを介した癌抑制型マイクロ RNA 投与実験を展開した。In-vivo において癌抑制型マイクロ RNA である miR-218 を用いてナノミセル型キャリアを作成し、BOY-GFP のゼノグラフトマウスに尾静脈注射を行った。実験は当初困難を極めたが、条件を最適化した結果、ゼノグラフト内に蛍光色素でタグ付けしたナノミセル型キャリアが取り込まれたことが確認された（次図）。ゼノグラフトを回収して RNA を抽出して、miR-218 の発現を確認するとコントロールと比べて有意に組織内における発現値の上昇を認めた。



しかしながら、標的遺伝子の一つである CAV2 の発現は miR-218 ナノミセル型キャリア投与群に於いてはコントロール群と比べて有意な抑制が認められなかった。この原因としては、miR-218 の RISC タンパクへの取り込み効率の低下や、単一のマイクロ RNA では標的遺伝子のノックダウン効果が弱いことなどが原因として考えられる。現在、異なる種類のナノミセル型キャリアの使用や複数のマイクロ RNA による in-vivo 実験を検討中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計７件）

① Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Sugita S, Matsushita R, Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer. British Journal of Cancer. 査読有, 116, 2017, 1077-1087. DOI:10.1038/bjc.2017.43

② Yonemori M, Seki N, Yoshino H, Matsushita R, Miyamoto K, Nakagawa M, Enokida H. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer. Cancer Science. 査読有, 107,2016,1233-1242. DOI: 10.1111/cas.13002

③ Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M, Yoshino H, Nakagawa M, Enokida H. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. British Journal of Cancer. 査読有, 115, 2016, 354-363. DOI:10.1038/bjc.2016.179.

④ Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, Goto Y, Miyamoto K, Yonemori M, Inoguchi S, Nakagawa M, Seki N. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p):Inhibition of bladder

cancer cell aggressiveness. Oncotarget. 査読有, 7, 2016, 28460-28487. DOI:10.18632/oncotarget.8668

⑤ Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Goto Y, Nishikawa R, Mataki H, Tatarano S, Itesako T, Nakagawa M, Enokida H. Tumour-suppressive microRNA-144-5p directly targets CCNE1/2 as potential prognostic markers in bladder cancer. British Journal of Cancer. 査読有, 113, 2015, 282-289. DOI:10.1038/bjc.2015.195

⑥ Chiyomaru T, Seki N, Inoguchi S, Ishihara T, Mataki H, Matsushita R, Goto Y, Nishikawa R, Tatarano S, Itesako T, Nakagawa M, Enokida H. Dual regulation of receptor tyrosine kinase genes EGFR and c-Met by the tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster in bladder cancer. International Journal of Oncology. 査読有, 46, 2015, 487-496. DOI:10.3892/ijo.2014.2752

⑦ Inoguchi S, Seki N, Chiyomaru T, Ishihara T, Matsushita R, Mataki H, Itesako T, Tatarano S, Yoshino H, Goto Y, Nishikawa R, Nakagawa M, Enokida H. Tumour-suppressive microRNA-24-1 inhibits cancer cell proliferation through targeting FOXM1 in bladder cancer. FEBS Letters. 査読有, 588, 2014, 3170-3179. DOI:10.1016/j.febslet.2014.06.058

〔学会発表〕（計６件）

① Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, Yonemori M, Yoshino H, Sakaguchi T, Sugita S, Enokida H, Nakagawa M. Tumor-suppressive microRNA-26a-5p/-26b-5p inhibit cancer cell migration and invasion through targeting PLOD2 that is a potential prognostic maker in bladder cancer. AUA2017 annual meeting, May 16, 2017. Boston (USA).

②Yonemori M, Seki N, Matsushita R, Miyamoto K, Yoshino H, Goto Y, Kato M, Kurozumi A, Nakagawa M, Enokida H Dual tumor-suppressors miR-139-5p/-3p derived from pre-miR-139 via targeting matrix metalloprotease 11 (MMP11) in bladder cancer. AUA2016 annual meeting, May 10, 2016. San Diego (USA).

③ Matsushita R, Seki N, Yoshino H, Miyamoto K, Yonemori M, Kurozumi A, Goto Y, Enokida H, Nakagawa M. Dual tumor-suppressors (miR-145-5p/miR-145-3p) inducing cancer cell apoptosis via direct targeting UHRF1 in bladder cancer. AUA2016 annual meeting, May 9, 2016. San Diego (USA).

④ Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Itesako T, Tatarano S, Yoshino H, Goto Y, Nishikawa R, Enokida H, Nakagawa M. MicroRNA-144-5p functions as tumour suppressor through targeting cyclin E1 and cyclin E2 that are potential prognostic markers in bladder cancer. AUA2015 annual meeting, May 17, 2015. New Orleans, LA (USA)

⑤ Inoguchi S, Chiyomaru T, Ishihara T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Tumor-suppressive microRNA-24 inhibits bladder cancer via targeting transcription factor FOXM1. AUA2014 annual meeting, May 18, 2014. Orlando, FL (USA)

⑥ Itesako T, Enokida H, Yoshino H, Chiyomaru T, Seki N, Nakagawa M. The microRNA expression signature of bladder cancer by deep sequencing: the functional significance of miR-195/497 cluster. AUA2014 annual meeting, May 18, 2014. Orlando, FL (USA)

６．研究組織

(1)研究代表者

榎田　英樹（ENOKIDA, Hideki）
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：80347103

(2)研究分担者

中川　昌之（NAKAGAWA, Masayuki）
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：90164144

関　直彦（SEKI, Naohiko）
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50345013

千代丸　剛（CHIYOMARU, Takeshi）
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：60593796
平成 27 年 3 月 31 日まで参画

(3)連携研究者

片岡　一則（KATAOKA, Kazunori）
東京大学・疾患生命工学センター・教授
研究者番号：00130245

宮田　完二郎（MIYATA, Kanjiro）
東京大学・疾患生命工学センター・准教授
研究者番号：50436523

(4)研究協力者

井口　智生（INOGUCHI, Satoru）
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

石原　知明（ISHIHARA, Tomoaki）
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生