

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26462416

研究課題名(和文)膀胱癌転移モデルマウスを用いた癌抑制型マイクロRNAの増殖/転移抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study for elucidating tumor suppressive microRNA that has anti proliferation and prevent metastasis by using metastasis model mouse in bladder cancer

研究代表者

井手迫 俊彦 (ITESAKO, Toshihiko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：10642613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケ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、複数の癌抑制的マイクロRNA(miR-144-5p/3p、miR-23b/24/27b)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。その結果、癌の重要なシグナル伝達経路をつかさどるc-METやEGFRなどの遺伝子や、細胞周期に関わるcyclinE1/E2などが同定された。マイクロRNAを基点とした解析により、これまで膀胱癌では知られていなかった癌のバイオロジーが明らかになった。今後、これらの結果を踏まえてin vivo実験を行う予定である。

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-144-5p/3p and miR-23b/24/27b and found their target tumor-associated genes such as c-MET, EGFR involved in important cancer signaling pathway or cyclin E1/E2 involved in cell cycle. MicroRNA-based studies revealed novel cancer biology. We are planning in vivo study following these results.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：マイクロRNA 膀胱癌

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。

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リ、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。我々は次世代シーケンサーによる「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。本研究課題では、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。

3. 研究の方法

本研究では、次世代シーケンサーによる膀胱癌発現プロファイルから発現抑制されているマイクロ RNA に着目し、膀胱癌の増殖/転移抑制型マイクロ RNA を探索する事からはじめる。増殖/転移抑制型マイクロ RNA が同定できれば、マイクロ RNA が制御する分子ネットワークについて、*in vitro/in vivo* の両面で解析を行う。更に、候補となったマイクロ RNA の転移抑制効果を、我々が開発した「膀胱癌転移モデルマウス」で検証する。以下に研究ステップについて示す。

(1)膀胱癌で発現が抑制されているマイクロ RNA について、癌細胞に核酸導入し、細胞増殖・浸潤・遊走能の抑制効果を検討する。

(2)細胞の浸潤や遊走を抑制する (増殖/転移抑制型マイクロ RNA) が制御する分子ネットワークの探索を、*in silico* 解析や核酸導入細胞の遺伝子発現解析などを駆使して行う。

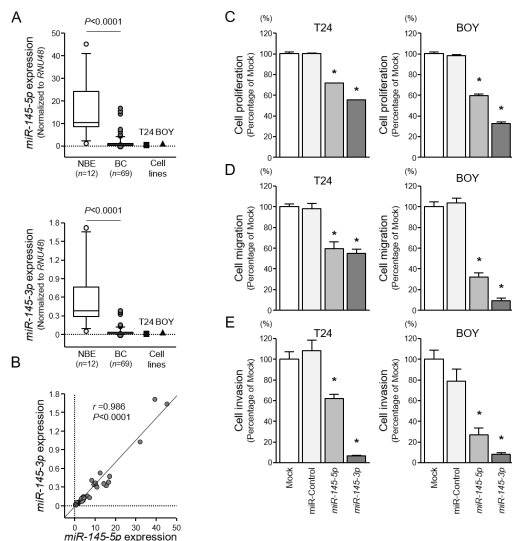
(3)膀胱癌転移モデルマウスを用いた機能解析から、候補となった増殖/転移抑制型マイクロ RNA の *in vivo* における増殖/転移抑制効果を判定する。

4. 研究成果

次世代シーケンサーによる 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。その結果、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

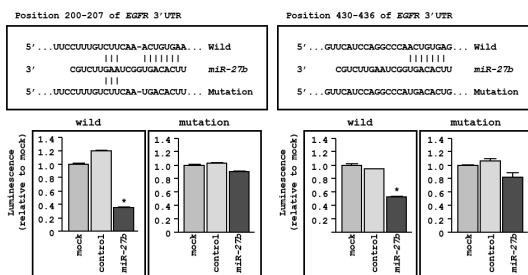
ったが、ともに共通の標的遺伝子である UHRF1 の発現を直接抑制することが明らかになった (次図)。UHRF1 はメチル化やヒストン脱アセチル化を介して、癌抑制遺伝子の不活化に寄与すると考えられている。

miR-145-5p発現導入による細胞機能解析

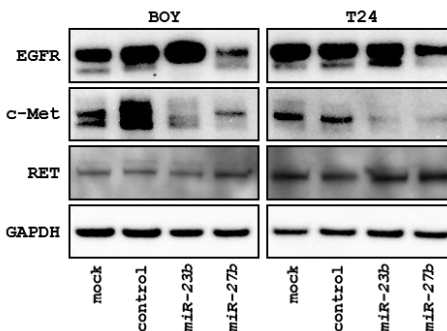


さらにヒト染色体 9q22.32 領域に存在するクラスター miRNA (miR-23b/24/27b) について、膀胱癌における役割について検討した。膀胱癌臨床検体と正常腎組織において real time PCR を行い、miR-23b/24/27b の発現を測定した。miR-23b/24/27b と miR-control の発現導入膀胱癌細胞株 (BOY・T24) を作成して、XTT・wound healing・cell invasion assay を行った。miR-23b/24/27b の発現は癌組織で有意に低下しており、両者の発現は正の相関を認めた。miR-23b/24/27b 発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 (次図)。

ルシフェラーゼアッセイによる結合サイトの証明



miR-23b, miR-27bによるc-Met/EGFRのノックダウン



5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 5 件)

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.

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

Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Goto Y, Nishikawa

R, Mataka 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

Chiyomaru T, Seki N, Inoguchi S, Ishihara T, Mataka 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

Inoguchi S, Seki N, Chiyomaru T, Ishihara T, Matsushita R, Mataka 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4件)

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).

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)

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)

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

井手迫 俊彦 (ITESAKO, Toshihiko)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号: 10642613

(2) 研究分担者

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

(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