

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04332

研究課題名(和文) ゲノム編集技術による癌促進型マイクロRNAの機能解析と革新的膀胱癌治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analyses of oncogenic microRNA by genome editing and development of innovative genome-based drug discovery for 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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーによるmiRNA発現解析により、microRNA-199 familyの発現高値は予後良好因子であり、インテグリンシグナル伝達を制御し癌抑制的に働くことが示唆された。またmiR-223によって膀胱癌細胞株の増殖・遊走・浸潤能が抑制され、アポトーシスが誘導された。さらにHRASの拮抗薬Salirasibは、HRAS突然変異の有無にかかわらず、膀胱癌細胞において細胞増殖、遊走および浸潤能を阻害した。またセリン合成経路に関わるPHGDHの発現高値群は有意な予後不良因子であることが判明した。この遺伝子は膀胱癌の一次化学療法であるGC療法に対する薬剤耐性にも関わっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果でマイクロRNAを基点とした膀胱癌の増殖/転移に関わるいくつかの重要な分子経路が明らかになった。その経路を遮断する治療薬候補も同定出来て画期的であった。さらに他の治療薬の開発に繋がるため、次の段階への大きな礎となりうる。本研究の成功は、現在、有効な治療法の少ない進行性膀胱癌患者に対して大きな福音をもたらすと思われる。

研究成果の概要(英文)：Based on the microRNA expression analyses by next generation sequencing, Patients with high expression of miR-199 family showed poorer prognosis compared to the counterpart. The miRNAs function as tumor suppressive miRNAs via suppressing Integrin signals. On the other hand, miR-223 transfection to bladder cancer cell lines showed inhibitions of cell proliferation, migration, and invasion as well as inducing cell apoptosis. Furthermore, Sarilasib, an antagonist to HRAS showed inhibitions of cell proliferation, migration, and invasion with or without HRAS mutations. We also found that the patients with high expression of PHGDH gene involved in Serine synthesis pathway had poorer prognosis, and it was associated with Gemcitabine and cisplatin chemo-resistance in patients with bladder cancer.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：マイクロRNA 膀胱癌 癌遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における膀胱癌の罹患数は 20,574 人 (2012 年)、また死亡数は 7,760 人 (2014 年) である。進行性膀胱癌の予後は不良であり、再発・転移症例に対する抗癌剤治療や放射線治療は一時的に奏功しても必ず再発し死への転帰を辿る。特に抗癌剤治療は 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。このように他の泌尿器癌 (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。近年、機能性 RNA 分子の中で、マイクロ RNA とよばれる 19-23 塩基の小さな RNA 分子がヒトの発生・分化などの過程に多大な影響を及ぼすことが報告され、注目を集めてきた。現在までにヒトでは 2,588 のマイクロ RNA が登録されている (miRBase release 21)。

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 の翻訳阻害や直接分解によりその発現制御をしている。1 つのマイクロ RNA は複数のタンパクコード遺伝子の発現を制御するため、細胞内ではマイクロ RNA 対タンパクコード遺伝子間の極めて複雑な分子ネットワークが形成され、全タンパクコード遺伝子の約 60% はマイクロ RNA による発現制御を受けるとされる。膀胱癌を含むマイクロ RNA の研究は癌抑制型マイクロ RNA に関して発展しているが、癌促進型マイクロ RNA については腫瘍マーカーとしての検討は多いが、機能解析やターゲット遺伝子に関する研究は著しく遅れている。

2. 研究の目的

この研究の目的は、これまでに殆ど研究が進んでいなかった癌促進型マイクロ RNA の機能解析と標的遺伝子探索を CRISPR/Cas9 と呼ばれる第 3 世代のゲノム編集技術を用いて行うことである。本研究では、次世代シーケンサーによる膀胱癌で発現が亢進しているマイクロ RNA 発現プロファイルから、増殖/転移に関わる癌促進型マイクロ RNA を探索して、それらが制御する分子ネットワークの描写を試みる。以上の検討により、膀胱癌における癌促進型マイクロ RNA が制御する増殖/転移機構の解明を行い、その経路を遮断する既存治療薬の効果を検討する。このような過程を経て現在、治療の選択肢が非常に少ない進行性膀胱癌に対して、新たな治療戦略の探索に繋がる知見を得ることを目的とする。

膀胱癌の増殖/転移に関わる分子経路が明らかになればその経路を遮断する治療薬の開発に繋がるため、次の段階への大きな礎となりうる。また CRISPR-Cas9 自体が将来発展してゲノム編集による核酸治療の可能性が謳われており、臨床応用に向けての基礎データを獲得すること繋がる。

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が亢進しているマイクロ RNA に着目し、膀胱癌の増殖/転移に関わる癌促進型マイクロ RNA を探索する事からはじめる。培養膀胱癌細胞で発現が亢進しているマイクロ RNA に対して CRISPR-Cas9 によるノックアウトを行い、細胞機能解析 (増殖・遊走・浸潤能テスト) を行い「癌促進型マイクロ RNA」の同定を行う。

癌促進型マイクロ RNA をノックアウトした細胞における遺伝子発現解析やターゲット遺伝子探索を行い、癌促進型マイクロ RNA が関わる分子ネットワークを明らかにし、過去の論文報告と比較検討する。有望な「癌促進型マイクロ RNA」については、我々が開発した「膀胱癌転移モデルマウス」においてノックアウト膀胱癌細胞株によるゼノグラフトモデルや、尾静脈注射による「膀胱癌転移モデルマウス」で in vivo での抗腫瘍効果を確認する。「癌促進型マイクロ RNA」

を基点とした分子ネットワーク解析から、膀胱癌の増殖・浸潤で活性化している分子経路を遮断する方法を模索し、分子経路遮断薬の効果を in vitro/in vivo で検証する。

4. 研究成果

膀胱癌では次世代シーケンサーによる miRNA 発現解析を行い、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 の中でリストの上位のものから解析を行ってきた。その結果、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。miR-199 family は膀胱癌検体で有意に発現が抑制されていた。これらの miRNA を核酸導入すると癌細胞の遊走・浸潤能が有意に抑制された。標的遺伝子探索では、重要な ECM レセプターで癌細胞の遊走・浸潤に関わる ITGA3 を直接制御することが判明した。TCGA による RNA 発現解析では ITGA3 は膀胱癌検体において発現が上昇していた。miR-199 family は膀胱癌において ITGA3 を直接制御し、癌抑制型 miRNA として機能することが示唆された。

また膀胱癌臨床検体において、miR-223 の発現が正常組織より膀胱癌組織で有意に低下していた。機能解析では、miR-223 によって膀胱癌細胞株の増殖・遊走・浸潤能が抑制され、アポトーシスが誘導された。in silico 解析にて miR-223 の putative target gene として WDR62 を選出し、

luciferase reporter assay によって miR-223 によって直接的に制御されていることを確認した。si-WDR62 を用いた機能解析では、WDR62 の knockdown が膀胱癌細胞株の増殖・遊走・浸潤能が抑制され、アポトーシスが誘導された。TCGA データベースを用いた解析では、miR-223 の低発現と Lymphovascular invasion や Distant metastasis との関係や、WDR62 の高発現と Pathological subtype、Tumor grade、Distant metastasis、Stage との関係が示唆された。

さらに the cancer genome atlas (TCGA) の膀胱癌コホートでは、HRAS の発現が癌検体では正常検体と比べて有意に高く、HRAS の突然変異を有する膀胱癌検体では突然変異のない膀胱癌検体と比べてその発現が有意に高かった。

Salirasib および si-HRAS の形質導入は、HRAS 突然変異の有無にかかわらず、膀胱癌細胞において細胞増殖、遊走および浸潤能を阻害した。プロテオーム解析では、salirasib 処理した群において、

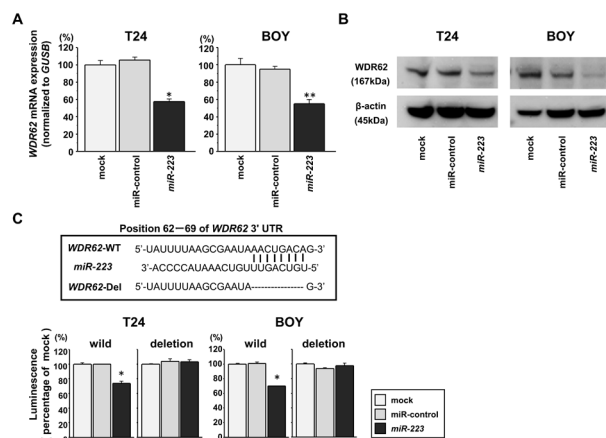
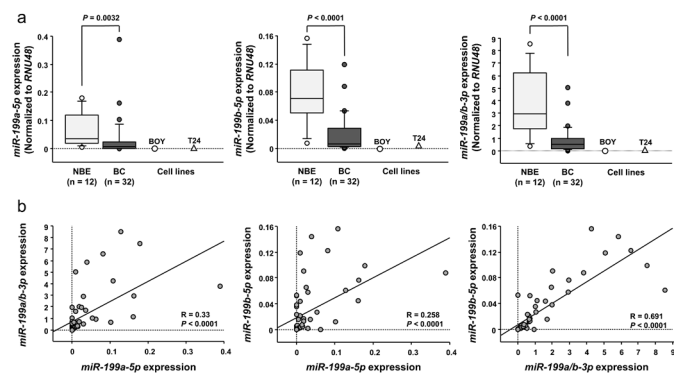


Figure 4

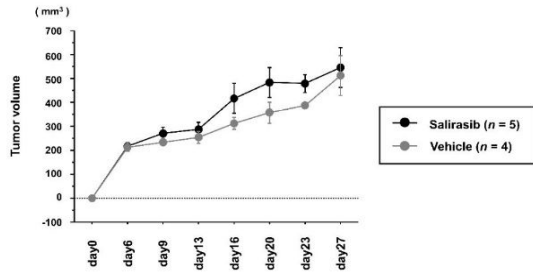
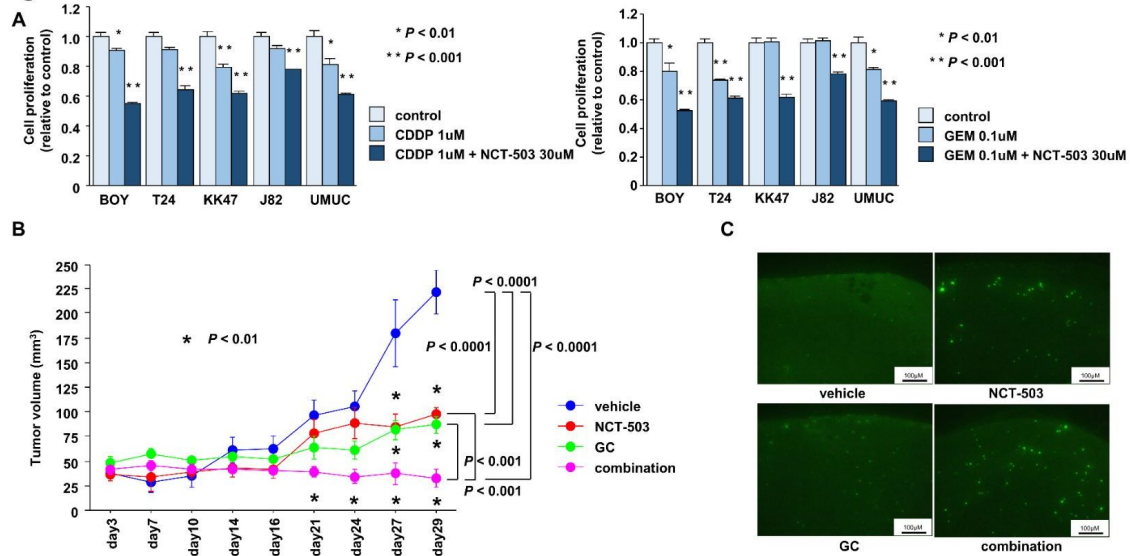


Figure 5

酸化的リン酸化反応などの代謝経路が有意に抑制されていた。また膀胱癌において、セリン合成経路の重要な遺伝子である PHGDH がピックアップされてきたが、この遺伝子の発現高値群は有意な予後不良因子であることを TCGA データベースによる解析で見出した。この遺伝子は膀胱癌の一次化学療法である

Gemcitabine + Cisplatin 療法に対する薬剤耐性にも関わっていることが明らかになり、in vitro 実験では PHGDH の拮抗薬による薬剤耐性克服が観察された。PHGDH の発現調節機序としては DNA コピー数の増加や hypomethylation が関与していることが示唆された。

Figure 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshino H, Enokida H, Osako Y, Nohata N, Yonemori M, Sugita S, Kuroshima K, Tsuruda M, Tatarano S, Nakagawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of PHGDH expression in bladder cancer: potential targeting therapy with gemcitabine/ cisplatin and the contribution of promoter DNA hypomethylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12697	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 -
1. 著者名 Sugita S, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Matsushita R, Sakaguchi T, Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H.	4. 巻 54
2. 論文標題 Tumor suppressive microRNA223 targets WDR62 directly in bladder cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 2222-2236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4762.	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 -
1. 著者名 Sugita S, Enokida H, Yoshino H, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Osako Y, Nakagawa M.	4. 巻 53
2. 論文標題 HRAS as a potential therapeutic target of salirasib RAS inhibitor in bladder cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 725-736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4435.	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 -
1. 著者名 Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Sugita S, Matsushita R, Itesako T, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H.	4. 巻 116
2. 論文標題 Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 1077-1087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/bjc.2017.43	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉田 智, 吉野裕史, 宮元一隆, 大迫洋一, 坂口 大, 米森雅也, 榎田英樹, 中川昌之.
2. 発表標題 膀胱癌におけるRAS阻害剤Sali rasibを介した治療標的としてのHRAS
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaguchi T
2. 発表標題 Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer.
3. 学会等名 2018 AUA annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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	中川 昌之 (NAKAGAWA Masayuki) (90164144)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	吉野 裕史 (YOSHINO Hirofumi) (90642611)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教 (17701)	
研究協力者	米森 雅也 (YONEMORI Masaya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂口 大 (SAKAGUCHI Takashi)		
研究協力者	大迫 洋一 (OSAKO Yoichi)		
研究協力者	鶴田 雅史 (TSURUDA Masafumi)		
研究協力者	黒島 和樹 (KUROSHIMA Kazuki)		