

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16779

研究課題名(和文) マイクロRNA発現解析に基づいた間質性膀胱炎の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathogenesis of interstitial cystitis based on microRNA expression signature

研究代表者

布施 美樹 (Fuse, Miki)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：90568627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、間質性膀胱炎の病態解明に向けて臨床検体におけるマイクロRNA発現プロファイルの作成を試みた。間質性膀胱炎特異的に発現異常を認める336個のマイクロRNA(203個は発現低下、163個は発現亢進)を同定した。特に発現低下が顕著であったマイクロRNA320ファミリー(miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-320e)に着目し、その標的遺伝子の探索を行った。その結果、3つの転写因子(E2F-1, E2F-2, TUB)がmiR-320の制御を受けており、間質性膀胱炎臨床検体で高発現している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎は、原因不明の難治性膀胱炎であり、頻尿や痛みといった症状により患者のQOLを著しく低下させるが、いまだ客観的な診断法や有効な治療法がない難治性疾患である。本研究では、間質性膀胱炎の病態解明に向けて臨床検体におけるマイクロRNA発現プロファイルの作成し、間質性膀胱炎に関わる分子ネットワークの探索を行った。その結果、3つの転写因子(E2F-1, E2F-2, TUB)が間質性膀胱炎臨床検体において高発現している事を明らかにした。マイクロRNAを起点とした解析により、本疾患の分子病理学的理解が進む事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We created the microRNA (miRNA) expression signature by using interstitial cystitis (IC) clinical specimens. Analysis of our signature revealed that a total of 366 miRNAs (203 downregulated and 163 upregulated) were aberrantly expressed in IC tissues. In particular, miR-320 family miRNAs (miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d and miR-320e) had downregulated expression in IC tissues. Genome-wide gene expression analyses and in silico database analyses showed that three transcription factors, E2F-1, E2F-2 and TUB, are regulated by miR-320 family miRNAs. Immunostaining of IC tissues confirmed that these transcription factors are overexpressed in IC tissues.

研究分野：排尿機能

キーワード：間質性膀胱炎 マイクロRNA miR-320 転写因子 E2F-1 E2F-2 TUB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性膀胱炎は、原因不明の難治性膀胱炎であり、頻尿や痛みといった症状により患者の QOL を著しく低下させる。現在でも、客観的な診断法や有効な治療法がないのが現状である。間質性膀胱炎の主な症状は、頻尿、尿意亢進(強い尿意)、尿意切迫感(急に出現する差し迫る尿意)、膀胱不快感、膀胱痛などである。膀胱の不快感や痛みは、膀胱に尿がたまったときに悪化する傾向があり、尿が十分にためられない事に起因する。根治に至る治療法は無く、対処療法として、膀胱に水を入れて拡張する膀胱水圧拡張術が広く用いられている。またハンナ病変を認める場合は、膀胱鏡下にこれを焼灼する手術も行われる事がある。これら治療により、患者の症状は、いったんは落ち着くが、多くの患者では、再び症状が悪化する。間質性膀胱炎の分子病理学的な解析に基づき、新規診断法と新規治療法の開発は急務である。

(2) 近年、ヒトゲノム中には蛋白をコードしない RNA 分子が多数転写され、実際に機能している事が明らかとなった。これら機能性 RNA 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・分化などの過程に重要な影響を及ぼす事が報告され注目されている。この RNA 分子は、最終的に 1 本鎖の RNA 分子として機能し、機能性 RNA (タンパクコード・非タンパクコード遺伝子) 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、極めて多くの機能性 RNA の発現を制御するため、細胞内ではマイクロ RNA-機能性 RNA の極めて複雑な分子ネットワークが形成されている。ヒトゲノム中の 60% のタンパクコード遺伝子は、マイクロ RNA による発現制御を受けている。そのため、マイクロ RNA の発現異常は、ヒト癌を含む様々な疾患に関与している。今回我々は、間質性膀胱炎の病態解明に向けて臨床検体におけるマイクロ RNA 発現プロファイルの作成を試みた。

2. 研究の目的

(1) 麻酔下膀胱水圧拡張時に間質性膀胱炎患者から得られた生検検体を用いて、RNA シーケンシングにより「間質性膀胱炎・マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成する。

(2) マイクロ RNA を起点とした解析から、マイクロ RNA が制御している間質性膀胱炎分子ネットワークの探索を行い、本疾患に関与する分子を探索する。

(3) 患者血清中に存在するエクソソーム解析から、マイクロ RNA を指標とした新規診断法の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 麻酔下膀胱水圧拡張時に、間質性膀胱炎患者から得られた生検検体を用いて、RNA を抽出後、small RNA cDNA ライブラリーを作製する、次世代シーケンサーを用いて、各ライブラリーについて、1000 万リード以上のシーケンスを行う。得られたリード配列を参照配列 (miRBase release 22.1) にマッピングし、既知 miRNA の発現レベルの算出および転写物へのアノテーション付与を行う。正常膀胱上皮のマイクロ RNA 発現プロファイルと比較して、間質性膀胱炎組織で発現が変動しているマイクロ RNA を明らかにする。

(2) 間質性膀胱炎組織で発現が抑制されているマイクロ RNA を膀胱癌細胞株に核酸導入し、発現が抑制される遺伝子の探索を行う。

(3) (2) で探索された蛋白について、間質性膀胱炎組織で免疫染色を行い、標的タンパクが過剰発現されているか検証する。

(4) 間質性膀胱炎患者血清からエクソソームを抽出し、small RNA cDNA ライブラリーを作製する。(1) 同様に、次世代シーケンサーを用いて、「間質性膀胱炎・患者血清由来エク

「ソソーム・マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成する。

4. 研究成果

(1) 間質性膀胱炎マイクロ RNA 発現プロファイルの作成と標的遺伝子の探索

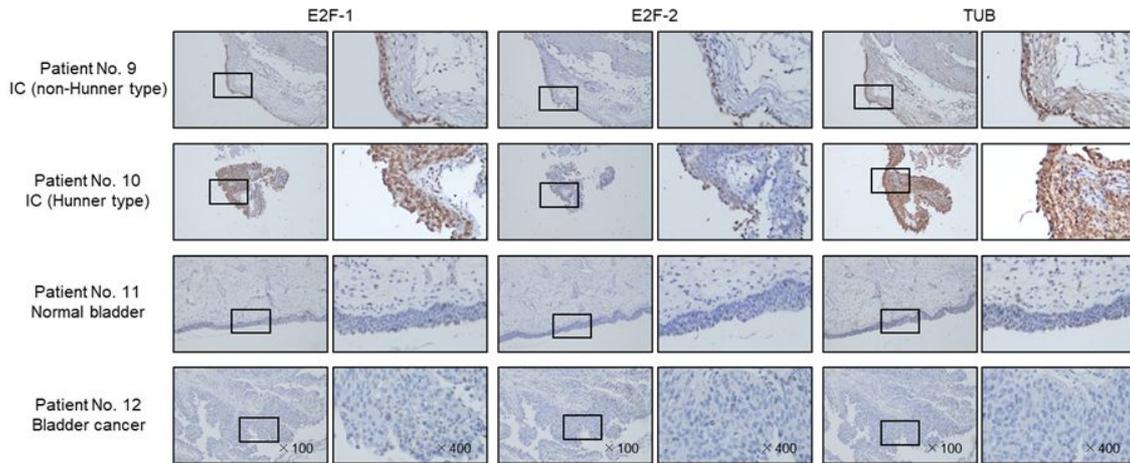
正常膀胱組織のマイクロ RNA 発現プロファイルと比較したところ、間質性膀胱炎特異的に発現異常を認める 336 個のマイクロ RNA (203 個は発現低下、163 個は発現亢進) が同定された。

(間質性膀胱炎組織において発現が抑制されているマイクロ RNA)

miRNA	Locus	LogFC	PValue	FDR
<i>hsa-miR-1</i>	chr18:19408976-19408997 chr20:61151558-61151579	-11.6127553	5.01E-35	2.31E-33
<i>hsa-miR-320b</i>	chr1:117214409-117214430 chr1:224444751-224444772	-9.75050559	3.13E-185	2.01E-182
<i>hsa-miR-206</i>	chr6:52009199-52009220	-8.80501163	1.30E-33	5.87E-32
<i>hsa-miR-320c</i>	chr18:19263520-19263539 chr18:21901680-21901699	-8.46345695	3.99E-184	2.06E-181
<i>hsa-miR-23b-5p</i>	chr9:97847509-97847530	-8.4344279	7.59E-141	2.17E-138
<i>hsa-miR-185-5p</i>	chr22:20020676-20020697	-7.53855032	1.36E-205	1.17E-202
<i>hsa-miR-107</i>	chr10:91352513-91352535	-7.20622575	0	0
<i>hsa-miR-320a</i>	chr8:22102488-22102509	-6.96040067	9.58E-150	3.08E-147
<i>hsa-miR-4732-5p</i>	chr17:27188718-27188740	-6.84346767	1.20E-28	4.53E-27
<i>hsa-miR-378g</i>	chr1:95211436-95211455	-6.771734	1.18E-23	3.74E-22
<i>hsa-miR-193b-5p</i>	chr16:14397837-14397858	-6.69333043	5.00E-80	9.90E-78
<i>hsa-let-7b-5p</i>	chr22:46509571-46509592	-6.68695305	3.43E-285	4.41E-282
<i>hsa-let-7c-5p</i>	chr21:17912158-17912179	-6.59513023	4.81E-184	2.07E-181
<i>hsa-miR-139-3p</i>	chr11:72326110-72326132	-6.53182382	1.34E-95	3.14E-93
<i>hsa-miR-5010-5p</i>	chr17:40666226-40666247	-6.5095352	3.60E-19	9.29E-18
<i>hsa-let-7e-5p</i>	chr19:52196046-52196067	-6.43238405	3.17E-57	3.03E-55
<i>hsa-miR-92b-5p</i>	chr1:155164987-155165008	-6.12493967	6.59E-38	3.40E-36
<i>hsa-miR-320e</i>	chr19:47212551-47212568	-5.96248147	1.35E-17	3.21E-16
<i>hsa-let-7f-5p</i>	chr9:96938635-96938656 chrX:53584207-53584228	-5.90219762	1.80E-94	3.85E-92
<i>hsa-miR-140-3p</i>	chr16:69967045-69967065	-5.81398525	4.32E-157	1.59E-154

正常膀胱組織と比較して、発現が亢進しているマイクロ RNA として、miR-141-5p、miR-141-3p、miR-126-5p、miR-126-3p が検出された。一般的に、マイクロ RNA の生合成において、passenger strand (miR-141-5p、miR-126-5p) は、細胞質で分解されて機能を有しないとされている。これらマイクロ RNA の発現異常と本疾患の関連について今後の課題である。

今回は、そのうち特に発現低下が顕著であったマイクロ RNA320 ファミリー (miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-320e)に着目し、ゲノムワイド解析およびイン・シリコ解析を用いてその標的遺伝子の探索を行ったところ、3 つの転写因子 (E2F-1, E2F-2, TUB) が miR-320 ファミリーから制御を受けている事が判明した。次に、間質性膀胱炎臨床検体において、これら転写因子の発現を免疫染色にて行ったところ、これら 3 つの転写因子は全て病変部において発現が亢進していた。



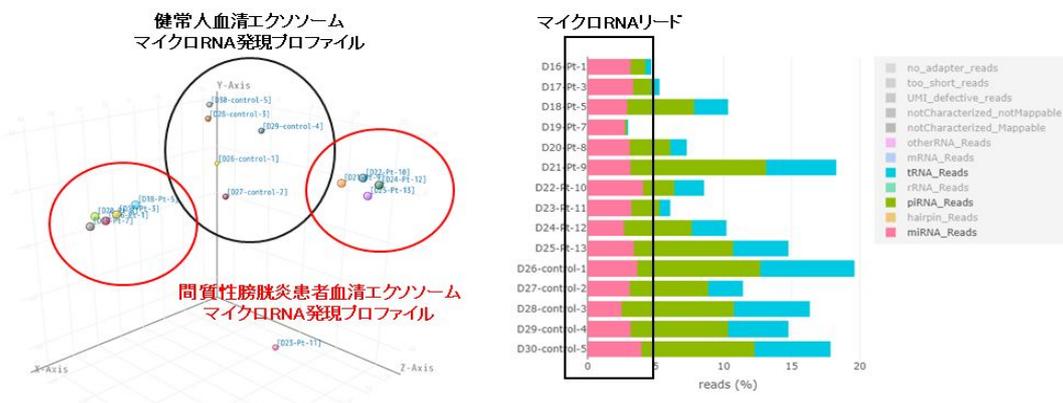
転写因子 E2F は、細胞周期の進行に必要な一連の遺伝子群の発現を制御し、細胞増殖に必須の役割を果たしている事が明らかとなっている。E2F は、癌抑制型遺伝子の一つである RB 蛋白の標的分子である。つまり、RB 蛋白が E2F に結合している間は、E2F は不活性型である。転写因子 E2F1/E2F2 の発現によりどのような遺伝子群が誘導され、本疾患に関与しているのか、今後の課題である。

(2) 間質性膀胱炎患者エクソソーム由来マイクロ RNA 発現プロファイルの作成

近年、「エクソソーム」と呼ばれる細胞外小胞の中に、マイクロ RNA が含まれている事が明らかとなり、エクソソームを介した細胞間のコミュニケーションが注目されている。エクソソーム内のマイクロ RNA の含量から病態の進行を予測する研究が相次いでいる。間質性膀胱炎患者血清からエクソソームを抽出し、RNA シークエンスにより「IC 患者血清由来エクソソーム・マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。

RNA シークエンスによるマイクロ RNA 解析では、マイクロ RNA の十分なリード数が得られており、また、健常人と患者のプロファイルは大きく異なる事が示された。

患者血清中エクソソーム内では、miR-203b-3p、miR-3960、miR-4783-5p、miR-5590-3p の含量が健常人と比較して少ない事が明らかとなった。これらマイクロ RNA が制御する蛋白の同定と、マイクロ RNA の含有量を指標とした確定診断法の確立に向け検討を行っている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Arai T, Fuse M, Goto Y, Kaga K, Kurozumi A, Yamada Y, Sugawara S, Okato A, Ichikawa T, Yamanishi T, Seki N.	4. 巻 63
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of interstitial cystitis based on microRNA expression signature: miR-320 family-regulated molecular pathways and targets.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 543-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-018-0419-x.	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0件

〔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
研究協力者	関 直彦 (Seki Naohiko)		
研究協力者	山西 友典 (Yamanishi Tomonori)		