

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16590

研究課題名(和文)平坦型尿路上皮腫瘍の鑑別に有用なマイクロRNAおよび関連分子の発現機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the expression mechanism of microRNAs and related molecules useful for differentiating flat type urothelial tumors

研究代表者

森田 剛平(Morita, Kohei)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60533718

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):尿路上皮癌は腎盂、尿管から膀胱、尿道に至る尿路系に異時性に多発する腫瘍である。その診断スクリーニングは尿細胞診が頻用されるが、感度、特異度は低い。Nucleus accumbens-associated protein 1(NACC1)は細胞周期や転写活性に関わる分子で、多数の癌において腫瘍の進展や化学療法抵抗性に関与することが報告されている。

申請者は尿路上皮癌検体においてNACC1変異を確認した。尿路上皮癌細胞株3種(T24、J82、UMUC6)においては、NACC1抑制下において細胞の増殖抑制が確認され、またmiR-331-3pの導入により、NACC1の発現低下及び細胞増殖抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌は再発を繰り返す腫瘍である。膀胱鏡による低侵襲治療も行われているが、筋層浸潤を認める場合は原則的に膀胱摘出となる。筋層浸潤の有無が生命予後及びQOLに大きな影響を及ぼすため、それらの防止、及び早期発見が重要である。

申請者は尿路上皮癌切除検体、及び細胞株において、NACC1及びmicroRNA-331-3Pと腫瘍の浸潤・進展能との関連性を見出すことができた。NACC1をターゲットとした治療介入により、これらの浸潤能を制御できる可能性があり、尿路上皮癌の予後改善に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文):Urothelial carcinoma (UC) typically occurs in the urinary system and is the most common type of bladder cancer. The nucleus accumbens-associated protein 1 (NACC1) is a transcription factor constitutively expressed in the urothelium, where it regulates cell growth, senescence, autophagy, and epithelial-mesenchymal transition.

Immunohistochemical analysis of TUR-BT specimens revealed that over 70% of UC cells presented strongly positive results for NACC1. Functional experiments involving miR-331-3p and its target molecule NACC1 were conducted using the UC cell lines, T24, UMUC6, and KU7. Overexpression of miR-331-3p resulted in significantly suppressed NACC1 mRNA and cell proliferation in these cell lines, and reduce cell proliferation, migration. Cell senescence via cell cycle arrest at the G1 phase was induced by NACC1 inhibition. These findings suggest that NACC1 regulated by miR-331-3p, plays a key role in UC cell proliferation and invasion.

研究分野：病理診断学

キーワード：尿路上皮癌 microRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌は膀胱、尿管、腎盂のいずれからも異時性、同時に単発ないし多発性に発生する上皮系腫瘍で、尿中の癌細胞を捉えることが診断の糸口となる。しかしながら腫瘍性病変と非腫瘍性病変とを鑑別しうる特異的な分子マーカーがなく、細胞・組織診断による形態診断に頼るものの、診断に難渋しているのが現状である。microRNA(miRNA)は 19-25 塩基よりなる non-coding short RNA で、miRNA の発現異常が癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現ネットワークを攪乱し、発癌や進展、転移に深く関与することが明らかとなっており、膀胱癌においても miRNA による種々の遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構が注目されている。miRNA やその標的分子が診断への応用、がん細胞の増殖や進展を抑制する機能から治療戦略としての応用の可能性があるものの、臨床病理学的な有用性はまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

申請者は尿路上皮に恒常的に発現する分子の一つ NACC1 が尿路上皮癌細胞の増殖を促進することと特に上皮内癌において高発現し、細胞の浸潤の抑制に寄与することを見出した。本研究では尿路上皮の腫瘍性および非腫瘍性病変を分子生物学的に鑑別可能なマーカーを見出すことを最終目標とし、1)正常尿路上皮、再生性尿路上皮、異形成及び上皮内癌における NACC1 の発現の違いを明らかにする。2)次世代シーケンサー(NGS)を用いて NACC1 遺伝子多型を検索し、組織型と発現動態との関連性を見出す。3)NACC1 が制御する microRNA (miRNA) とその標的分子を検索し、機能解析を行って NACC1 による細胞増殖能および浸潤能の調節に寄与する分子をそれぞれ特定することから分子生物学的な腫瘍および非腫瘍性病変の鑑別点を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1)正常尿路上皮、再生上皮、異形成および上皮内癌における NACC1 の評価、(2)尿路上皮癌細胞を用いて代表的な癌関連 miRNA として NACC1 を制御する miRNA の一つ、miR-331-3p と NACC1 について分子生物学的機能解析を行って尿路上皮癌細胞における細胞増殖・浸潤能での役割を明らかにする、(3)尿路上皮癌の形態学的特性と miRNA および標的分子の発現との関連性の検証、ということ踏まえて研究を進めた。

(1)正常尿路上皮、再生上皮、異形成および上皮内癌における NACC1 の発現の評価

pT 分類ごとに症例を選択し、NACC1 の発現を免疫組織化学染色にて検討した。

(2)尿路上皮癌細胞を用いて、miRNA および NACC1 の細胞増殖能・浸潤能の評価

尿路上皮癌細胞株として、T24, UMUC6, KU7 を用いた。miRNA の検索から miR-331-3p が NACC1 を制御することから、miR-331-3p の過剰発現もしくは NACC1 の抑制による尿路上皮癌の細胞増殖能、浸潤能の検討として、細胞増殖能は MTS assay, AnnexinV, 浸潤能はマトリゲルアッセイを行った。

(3)尿路上皮癌の形態学的特性と miRNA および標的分子の発現との関連性の検証

尿路上皮癌の異型度や分化傾向を踏まえ、高異型度および分化傾向のある症例については、高異型度と分類した。浸潤能の組織学的評価として、免疫組織化学染色によってリンパ管を同定し、リンパ管浸潤を評価した。

### 4. 研究成果

(1)正常尿路上皮、再生上皮、異形成および上皮内癌における NACC1 の発現の評価

免疫組織化学染色では、NACC1 は細胞の核に局在し、その発現は正常あるいは過形成の尿路上皮よりも尿路上皮癌で有意に高かった。NACC1 の発現は、高異型度の浸潤癌と比較して、低異型度の日浸潤性尿路上皮癌(pTa)および高異型度の上皮内癌(pTis)において高く発現していた(表1)。

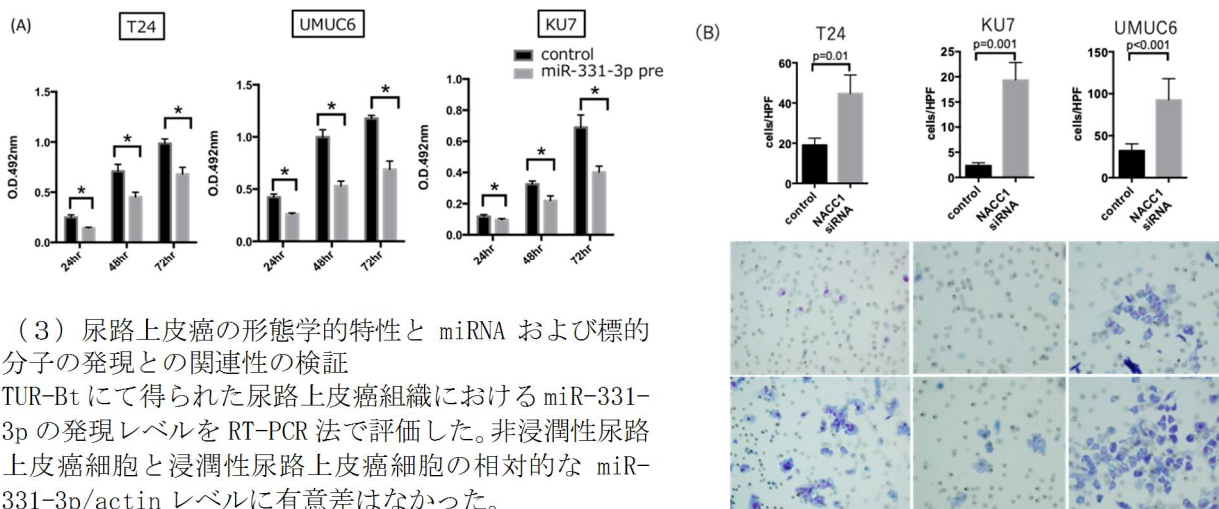
	NACC1 positive
pTa (n=16)	15 (94%)
pT1 (n=13)	8 (62%)
pT2 (n=9)	3 (33%)
pTis (n=4)	4 (100%)

表1) NACC1 の発現

(2)尿路上皮癌細胞を用いて、miRNA および NACC1 の細胞増殖能・浸潤能の評価

これまでに、TargetScan 解析 (release 6.2, June 2012) と miRSearch (V3.0, EXIQON) を用いて miR-331-3p が NACC1 を標的とすることが推測され、miR-331-3p と NACC1 の相互作用は、miRGate と DIANA TOOLS (Micro T-CDS) を用いて確認した。3つの尿路上皮癌細胞株では、NACC1

の抑制および miR-331-3p を過剰発現させると、T24、UMUC6、KU7 細胞株において細胞増殖が有意に抑制された (図 1 A)。NACC1 の抑制による浸潤能の変化を検討したところ、3 つの尿路上皮癌細胞株において浸潤能が有意に亢進した。



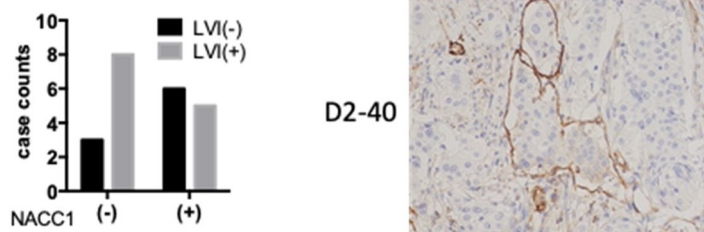
(図 1)

(A) miR-331-3p pre 導入下での MTS assay  
(B) NACC1 siRNA 導入下でのマトリゲルアッセイ

(3) 尿路上皮癌の形態学的特性と miRNA および標的分子の発現との関連性の検証

TUR-Bt にて得られた尿路上皮癌組織における miR-331-3p の発現レベルを RT-PCR 法で評価した。非浸潤性尿路上皮癌細胞と浸潤性尿路上皮癌細胞の相対的な miR-331-3p/actin レベルに有意差はなかった。

浸潤能の組織学的評価として、リンパ管浸潤の有無について評価を行った。免疫組織化学染色は D2-40 で行った。NACC1 発現の高い組織において脈管浸潤は減少していた。このことから、NACC1 は尿路上皮癌において浸潤能を抑制する機能を有することが示唆された。



(図 2)

TUR-Bt 組織中のリンパ管浸潤の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tomomi Fujii, Hiroe Itami, Tomoko Uchiyama, Kohei Morita, Tokiko Nakai, Kinta Hatakeyama, Aya Sugimoto, Keiji Shimada, Shoutaro Tsuji, Chiho Ohbayashi	4. 巻 526(4)
2. 論文標題 HEG1-responsive microRNA-23b regulates cell proliferation in malignant mesothelioma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 927-933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.172	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 Shota Tatsumoto, Takahiro Itoh, Junko Takahama, Nagaaki Marugami, Kiyoyuki Minamiguchi, Toshihiro Tanaka, Fumikazu Koyama, Kohei Morita, Kimihiko Kichikawa	4. 巻 38(6)
2. 論文標題 Accuracy of magnetic resonance imaging in predicting dentate line invasion in low rectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese journal of radiology	6. 最初と最後の頁 539-546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11604-020-00933-5	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 Mitoro A, Nishikawa T, Yoshida M, Sawai M, Okura Y, Kitagawa K, Seki K, Furukawa M, Ozutsumi T, Takeuchi M, Morita K, Ohbayashi C, Yamao J, Yoshiji H.	4. 巻 48(5)
2. 論文標題 Diagnostic Efficacy of Liquid-Based Cytology in Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration for Pancreatic Mass Lesions During the Learning Curve: A Retrospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 686-689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001304	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 森田剛平、内山智子、伊丹弘恵、中井登紀子、藤井智美、畠山金太、大林千穂
2. 発表標題 膵体尾部膵癌における、D2-40染色を用いたリンパ管侵襲数の測定の意義
3. 学会等名 第108回日本病理学会春季総会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------