

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591861

研究課題名(和文) microRNA発現プロファイルに基づく膀胱癌の新規治療の開発

研究課題名(英文) Developing new treatment modalities of bladder cancer on the basis of microRNA expression profile

研究代表者

川元 健 (KAWAMOTO KEN)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員

研究者番号：80363620

研究成果の概要(和文)：157種 microRNA スクリーニングによる臨床膀胱癌の microRNA 発現プロファイルを作成した。膀胱癌で有意に発現が抑制されていた microRNA (miR-133a, miR-145 など) を癌抑制的 microRNA の候補とし、それらの標的遺伝子(KRT-7, FSCN1, GST-P1)は癌遺伝子的作用を有することが機能解析実験で明らかになった。また miR-96, miR-183 の臨床膀胱癌検体における発現は正常組織と比べ有意に上昇しており、腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We screened 157 microRNAs and identified the microRNA profile in clinical bladder cancer. We focused on the down-regulated microRNAs, such as miR-133a, and miR-145, which may have tumor suppressive function. Transfection of the target genes, such as KRT-7, FSCN1, and GST-P1, revealed that these genes might have oncogenic function. On the other hand, the expression levels of the up-regulated microRNAs, such as miR-96, miR-183, were indeed over-expressed in bladder cancer, suggesting that they might be potential biomarkers for bladder cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：泌尿器腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：マイクロRNA、膀胱癌、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は再発が多く、再発を繰り返すことと浸潤・転移をきたすことが特徴である。

我々は以前、DNA マイクロアレイ法により浸潤性癌と表在性癌の遺伝子プロファイルを

検討したところ、浸潤癌では細胞周期関連遺伝子である SKP2 と CKS1 の発現が有意に上昇し、これらのユビキチン化作用により分解が促進される p27 の発現が低下することが観察された。さらにこれらの遺伝子を small interfering RNA (siRNA) で発現抑制すると有意に膀胱癌の増殖が抑制されることを観察した。

microRNA は 21 塩基前後からなる短い RNA で、標的遺伝子のメッセンジャーRNA の 3'-UTR をブロックして蛋白合成を妨げる働きをする。研究開始当初、microRNA は細胞増殖、細胞死、神経細胞、脂肪細胞、血液細胞の分化増殖に重要な役割をしていることが明らかにされつつあった。癌の領域では癌抑制遺伝子の転写や発現における microRNA の役割が非常に大きく、癌の発生や進展に関わっていることが報告されつつあった。しかしながら膀胱癌における microRNA の研究は皆無であった。研究開始当時、我々は代表的な 157 種類の microRNA の中から膀胱癌で発現変動する microRNA を探索し、27 種類の microRNA が癌部で有意に発現変動していることを見出していた。さらに、microRNA が post-transcriptional な遺伝子発現レベルを抑制するのみでなく、過剰メチル化を来たした癌抑制遺伝子 (p21) のプロモーター領域に直接結合して逆に転写促進作用を有する可能性を明らかにしていた。このように microRNA は、膀胱癌において既知あるいは未知の遺伝子を直接および間接的に制御して膀胱癌の進展に深く関与していると考えられ、研究を進める動機となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は microRNA 分子ネットワークを介した膀胱癌における新しい発癌機序の解明であった。157 種類の microRNA のスク

リーニングによる「膀胱癌 microRNA プロファイル」を作成して、膀胱癌で有意に発現が低下している microRNA を臨床検体で検証した。さらにそれらの microRNA の gain-of-function study を行い、膀胱癌細胞の cell viability にどのような影響を与えるか調べた。さらにアルゴリズム解析による標的遺伝子検索を行い、有望な遺伝子については *in vitro* で loss-of-function study を行いその機序を研究した。膀胱癌で有意に発現が上昇していた遺伝子については、癌診断マーカーや再発予測マーカーになる可能性を、臨床組織検体にて検討した。

3. 研究の方法

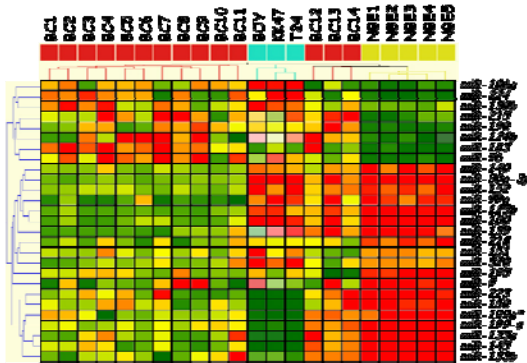
- (1) 臨床膀胱癌検体における 157 種類 microRNA のスクリーニングテストと発現プロファイル作成および多数の臨床検体における発現確認 (microRNA アレイ)。
- (2) アルゴリズムによる microRNA 標的遺伝子の予測と臨床膀胱癌検体における発現確認 (Web-based software, Real-time RT-PCR, 免疫組織学的染色)
- (3) microRNA および標的遺伝子の機能解析 (microRNA transfection, XTT, Wound healing assay, Cell invasion assay, Apoptosis array, Flow cytometry, Luciferase assay)
- (4) 臨床組織検体 microRNA 測定 (Real-time RT-PCR)
- (5) 統計解析

4. 研究成果

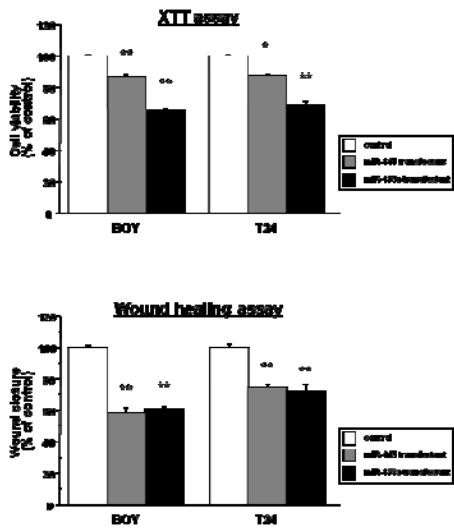
(1) 癌抑制的 microRNA の研究

157 種類 microRNA のスクリーニングテストの結果、膀胱癌で特異的に発現が低下していた miR-30a-3p1, miR-125, miR-195, miR-133a, miR-133b, miR-145, miR-199a*

に注目した。これらは多数の臨床検体における発現確認においても膀胱癌で有意にその発現は低下していた。まず我々はアルゴリズム解析にてサイトケラチンの一つである KRT7 が miR-145 や miR-133a の標的遺伝子であることを見出し、臨床膀胱癌検体におけるそれら発現は逆相関することを証明した (Ichimi、下図)。

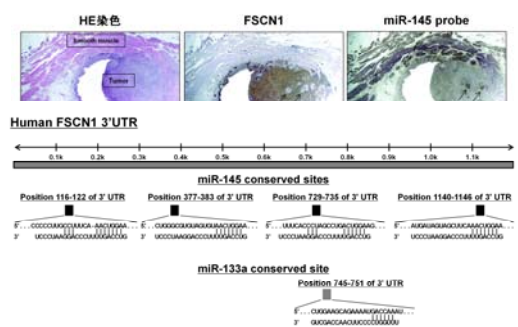


また miR-145 や miR-133a を膀胱癌細胞株にトランスフェクションすると増殖・遊走・浸潤能が有意に抑制されることが判明した (Chiyomaru、下図)。

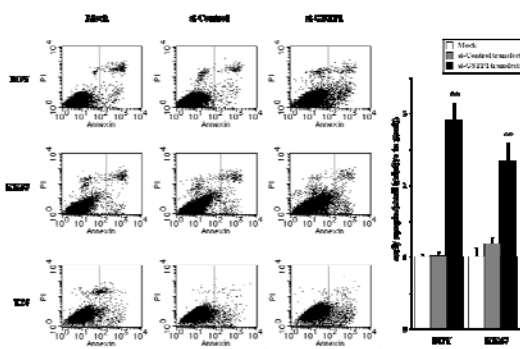


miR-145 トランスフェクタントの遺伝子発現プロファイルでは、アクチン結合タンパクの一つである FSCN1 の発現が有意に低下しており、Web-based software により示唆された FSCN1 の 3 末側非翻訳領域に

miR-145 と miR-133a が直接結合して、FSCN1 の発現を抑制することを Luciferase assay により証明した。FSCN1 は癌遺伝子的作用を持つことが示唆され、その発現は腫瘍のステージと相関することが免疫組織学的染色で示唆された。組織検体における逆相関は in situ hybridization にて証明された (Chiyomaru、下図)。

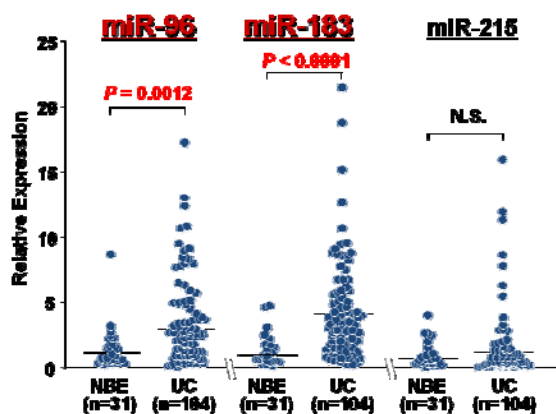


さらに解毒系酵素の GSTP1 はアポトーシスを抑制するという報告がこれまでにあったが、GSTP1 は miR-133a の標的遺伝子であることが判明した。miR-133a の導入はアポトーシスを誘導することが明らかになったが、その機序は miR-133a の発現低下による GSTP1 の過剰発現によるものと考えられた (Uchida、下図)。



(2) 腫瘍マーカーとしての microRNA 「膀胱癌 microRNA プロファイル」のリストの上位にある microRNA の腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。対象は膀胱癌検体 (n=104)、正常膀胱癌検体 (n=31) であり、miR-96 および miR-183 の発現は膀胱癌検体に

において有意に高く、腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された (Ichimi、下図)。



(総括)

以上の一連の研究により、膀胱癌における microRNA ネットワークによるエピジェネティックな分子制御機構の一端が明らかになった。今後、in vivo の実験を展開して膀胱癌の新しい治療開発への礎としたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Uchida Y, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. MiR-133a induces apoptosis through direct regulation of GSTP1 in bladder cancer cell lines. 査読有。Urol Oncol. 2011 [Epub ahead of print]
2. Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, Yamasaki T, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。miR-218 on the genomic loss region of chromosome 4p15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer. Int J Oncol. 2011; 39:13-21.
3. Yoshitomi T, Kawakami K, Enokida H, Chiyomaru T, Kagara I, Tatarano S, Yoshino H, Arimura H, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。Restoration of miR-517a expression induces cell apoptosis in bladder cancer cell lines. Oncol Rep. 2011;25:1661-1668.
4. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K, Nohata N, Seki N, Nakagawa M. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. 査読有。Br J Cancer. 2011;104:808-818.
5. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. Cancer Sci. 2011;102:522-529.
6. Matsuda R, Enokida H, Chiyomaru T, Kikkawa N, Sugimoto T, Kawakami K, Tatarano S, Yoshino H, Toki K, Uchida Y, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。LY6K is a novel molecular target in bladder cancer on basis of integrate genome-wide profiling. Br J Cancer. 2011;104:376-386.
7. Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, Fujimura L, Kikkawa N, Seki N, Nakagawa M. 査読有。miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly

- regulate FSCN1 expression in bladder cancer. Br J Cancer. 2010;102:883-891.
8. Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, Kunimoto R, Chiyomaru T, Kawamoto K, Kawahara K, Toki K, Kawakami K, Nishiyama K, Tsujimoto G, Nakagawa M, Seki N. 査読有。 Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. Int J Cancer. 2009;125:345-52.

[学会発表] (計 34 件)

1. Enokida H, Seki N, Nakagawa M. MicroRNAs (miR-96 and miR-183) detection serves as urine markers in patients with urothelial carcinoma.
 2. Chiyomaru T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Functional role of LASP1 in bladder cancer cell viability and its regulation by microRNAs.
 3. Yoshitomi T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Restoration of miR-517a expression induces cell apoptosis in bladder cancer cell lines.
 4. Yoshino H, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. The tumor suppressive microRNA cluster of miR-1 and miR-133a targets oncogenic TAGLN2 gene in bladder cancer.
 5. Tatarano S, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. miR-218 on the genomic loss region of chromosome 4P15.31 function as a tumor suppressor in bladder cancer.
- * 上記 1 ~ 5、American Urological Association (AUA) annual meeting (May 15, 2011. Washington DC)
6. Uchida Y, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. MiR-133a functions as a tumor suppressor

and directly regulates GSTP1 expression in bladder cancer.

7. Chiyomaru T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M. miR-145 and miR-133a function as tumor suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer.

* 上記 6、7、AUA annual meeting (May 29, 2010. San Francisco)

8. Enokida H, Seki N, Nakagawa M. Identification of differentially expressed mature microRNAs in bladder cancer.

* European Association of Urology (EAU) annual meeting (March 26, 2008. Milan, Italy)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: microRNA 発現プロファイリングに基づく膀胱癌の検出方法

発明者: 関 直彦、榎田 英樹、中川 昌之
権利者: 国立大学法人千葉大学、国立大学法人鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-159384

出願年月日: 平成 22 年 7 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: microRNA 発現プロファイリングに基づく膀胱癌の検出方法

発明者: 関 直彦、榎田 英樹、中川 昌之
権利者: 国立大学法人千葉大学、国立大学法人鹿児島大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-276191

出願年月日: 平成 19 年 10 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川元 健 (KAWAMOTO KEN)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員

研究者番号：80363620

(2) 研究分担者

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80347103

(3) 研究協力者

千代丸 剛

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

鑪野 秀一

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

吉野 裕史

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生