

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K09430

研究課題名(和文) エクソソーム中miRNAを起点とした治療抵抗性膀胱癌に対する新規治療戦略の探索

研究課題名(英文) Exploring novel therapeutic strategies for treatment-resistant bladder cancer using miRNAs in exosomes as a starting point

研究代表者

山田 保俊 (YAMADA, Yasutoshi)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授

研究者番号：40437968

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)：本研究の成果として患者由来膀胱尿路上皮癌(n=3)、膀胱癌CIS(n=3)、腎盂尿管尿路上皮癌(n=3)血清エクソソーム中RNAを用いてRNAシーケンス解析を行ったところ、正常検体と比べて尿路上皮癌ではエクソソーム含有核酸の様相が全く異なることを確認した。次に、候補となる核酸の中からLncRNAの一つであるBYCRN1に注目し、血清エクソソーム中RNAの発現を調査したところ、尿路上皮癌患者では健常対照と比較して有意に発現が増加していた。さらに、BYCRN1をノックダウンすると抗腫瘍効果が示され、また術前後の検体で発現を見てみると術後は発現が低下した。以上の結果をまとめて論文化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、臨床的に感度・特異度ともに有用な尿路上皮癌(腎盂尿管癌および膀胱癌)の腫瘍マーカーは無く、患者は放射線被曝を伴うCT検査や侵襲の大きな尿管鏡検査や膀胱鏡検査が一般的に行われている。そこで、エクソソーム含有核酸を用いて尿路上皮癌に対する腫瘍マーカーとなる核酸を検出することを本研究の目的としたが、我々の研究成果は血清エクソソーム中のBYCRN1が尿路上皮癌患者で有意に高く、また術後に発現が低下した。更にBYCRN1をノックダウンすることで抗腫瘍効果が得られることを確認し、エクソソーム中RNAを起点とした治療抵抗性膀胱癌に対する新規治療戦略の一步を踏み出したと考える。

研究成果の概要(英文)：As a result of this study, we performed RNA sequencing analysis using patient-derived bladder urothelial carcinoma (n=3), bladder cancer CIS (n=3), and renal pelvis ureteral urothelial carcinoma (n=3) serum exosomal RNAs and confirmed that the aspect of exosome-containing nucleic acids was completely different in urothelial carcinoma compared with normal samples. Next, we focused on BYCRN1, one of the LncRNAs among the candidate nucleic acids, and investigated its expression in serum exosomal RNA, and found that its expression was significantly increased in patients with urothelial carcinoma compared to healthy controls. Furthermore, knockdown of BYCRN1 showed an antitumor effect, and when expression was examined in pre- and postoperative samples, expression decreased after surgery. These results are summarized in the paper.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：膀胱癌 治療抵抗 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における膀胱癌の罹患数は 20,640 人 (2015 年)、また死亡数は 8,635 人 (2018 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、その他の抗癌剤治療や種々の分子標的薬の臨床試験は有効性を示せていない。最近では抗 PD-1 抗体薬である Pembrolizumab が膀胱癌に対して承認されたが、その奏功率は 25% 程度でありセカンドライン治療として十分とは言えない。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、治療耐性獲得機序の解明や新規治療戦略の開拓が極めて重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

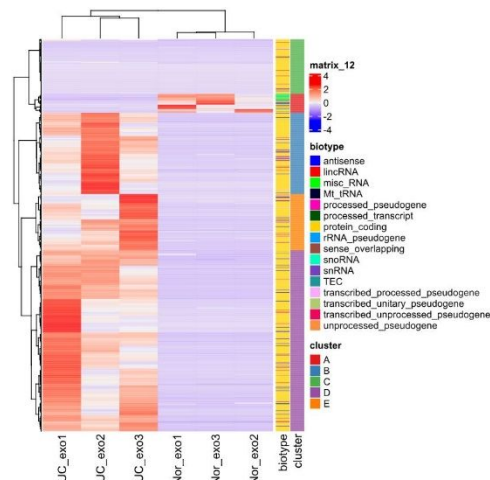
近年、機能性 RNA の一つである microRNA(miRNA)の発現異常が様々な癌において確認され、癌の促進や抑制に深く関与し、これが制御する種々の分子ネットワークの存在が多数報告されてきた。一方、最近になり細胞外小胞の一つであるエクソソームが細胞間コミュニケーションの担い手として注目されている。エクソソームの中には mRNA や miRNA といった核酸やタンパク質などが含まれ、癌においてはその分泌が増加し癌微小環境を構築することが明らかになりつつある。そこで本研究では、治療抵抗性膀胱癌におけるエクソソーム中 miRNA を起点とした耐性獲得機序を明らかにし、新規治療戦略や診断・予後予測マーカーの探索を提案する。エクソソーム中 miRNA を起点とした膀胱癌研究の新たな展開により、耐性克服薬の開発や診断・予後予測マーカーの開発に繋がるデータを得ることが期待される。予後予測マーカーを提示できれば、患者の選別化にも繋がり膀胱癌の治療費抑制にも貢献できると考える。

## 3. 研究の方法

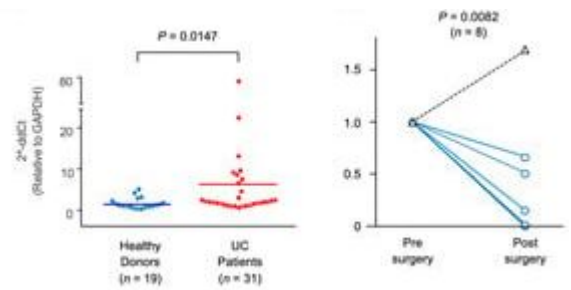
本研究は治療抵抗膀胱癌におけるエクソソーム中 miRNA を起点とした耐性獲得機序を明らかにし、新規治療戦略や診断・予後予測マーカーを開発することが目的である。始めに当科で樹立したゲムシタピン・シスプラチン耐性膀胱癌細胞由来の培養液中エクソソームを用いた機能解析を、in vitro のみならず in vivo において行う。エクソソーム抽出に関しては、スピカラムを用いる方法を採用し、既にヒトサンプルや細胞培養液からエクソソームのみを、比較的短時間で効率的に抽出する方法を確立している。更にシスプラチン耐性膀胱癌細胞由来の培養液中エクソソームを用いたスクリーニング解析を起点として、新たな治療戦略や診断や予後予測マーカーのデータを収集し、最後はヒト臨床検体を用いて治療効果予測を検討する。

## 4. 研究成果

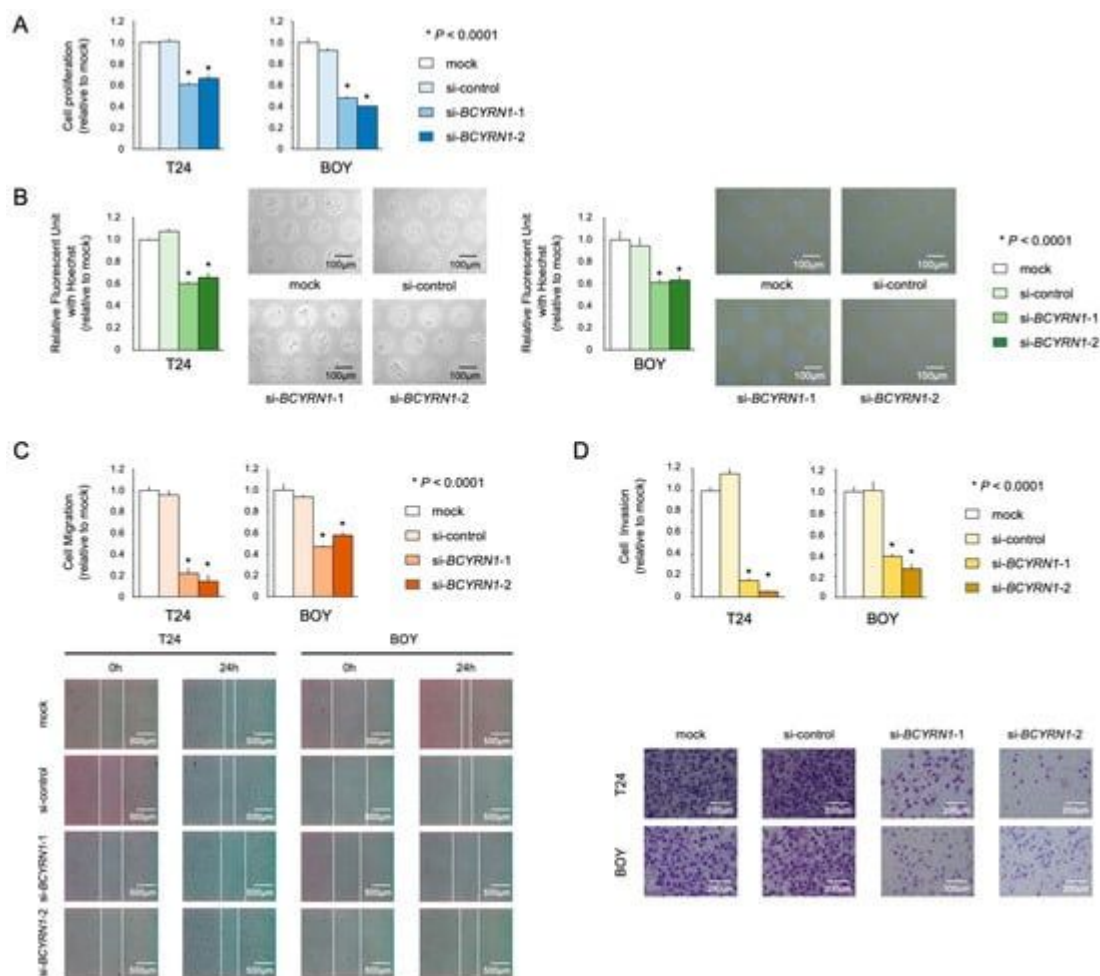
始めに患者由来膀胱尿路上皮癌 (exo1、n=3)、膀胱癌 CIS (exo2、n=3)、腎盂尿管尿路上皮癌 (exo3、n=3) 血清エクソソーム中 RNA を用いて RNA シークエンス解析を行い、正常検体と比べて尿路上皮癌ではエクソソーム含有核酸の様相が全く異なることを確認した (右図)。興味深いことに膀胱尿路上皮癌、膀胱癌 CIS、腎盂尿管尿路上皮癌の間でも発現パターンが異なっていた。



LncRNA の一つである BCYRN1 に注目し、血清エクソソーム中 RNA の発現を調べたところ、UC 患者では健常対照と比較して有意に発現が増加していた(右図左)。更に、術後の発現を見たところ候補核酸の発現は低下しその後再発も認めなかったが(実線、n=8)、発現が低下しなかった症例(点線、n=1)は後に転移を認めた(右図右)。



更に BCYRN1 をノックダウンすると増殖アッセイ(図 A)、スフェロイド形成(図 B)、細胞遊走アッセイ(図 C)、細胞浸潤アッセイ(図 D)において抗腫瘍効果が示された。



## 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 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshino Hirofumi, Tatarano Shuichi, Tamai Motoki, Tsuruda Masafumi, Iizasa Sayaka, Arima Junya, Kawakami Issei, Fukumoto Wataru, Kawahara Ichiro, Li Gang, Sakaguchi Takashi, Inoguchi Satoru, Yamada Yasutoshi, Enokida Hideki | 4. 巻<br>630           |
| 2. 論文標題<br>Exosomal microRNA-1 and MYO15A as a target for therapy and diagnosis in renal cell carcinoma   | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>71 ~ 76 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2022.09.056  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Kawakami Issei, Yoshino Hirofumi, Fukumoto Wataru, Tamai Motoki, Okamura Shunsuke, Osako Yoichi, Sakaguchi Takashi, Inoguchi Satoru, Matsushita Ryosuke, Yamada Yasutoshi, Tatarano Shuichi, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki | 4. 巻<br>611            |
| 2. 論文標題<br>Targeting of the glutamine transporter SLC1A5 induces cellular senescence in clear cell renal cell carcinoma  | 5. 発行年<br>2022年        |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>99 ~ 106 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2022.04.068   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Arima Junya, Yoshino Hirofumi, Fukumoto Wataru, Kawahara Ichiro, Saito Saeki, Li Gang, Fukuda Ikumi, Iizasa Sayaka, Mitsuke Akihiko, Sakaguchi Takashi, Inoguchi Satoru, Matsushita Ryosuke, Nakagawa Masayuki, Tatarano Shuichi, Yamada Yasutoshi, Enokida Hideki | 4. 巻<br>25                |
| 2. 論文標題<br>LncRNA BCYRN1 as a Potential Therapeutic Target and Diagnostic Marker in Serum Exosomes in Bladder Cancer   | 5. 発行年<br>2024年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>5955 ~ 5955 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms25115955   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

〔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<br>Hirofumi Yoshino, Motoki Tamai, Issei Kawakami, Hideki Enokida. |
| 2. 発表標題<br>Role of exosomal antitumor microRNA-1 in renal cell carcinoma   |
| 3. 学会等名<br>第59回日本癌治療学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|