

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16759

研究課題名(和文) miRNA-146a-5pを用いた膀胱癌の新規診断・治療法の開発とその機能解析

研究課題名(英文) Development of a novel method for diagnosis and therapy of bladder cancer using miRNA-146a-5p and its functional analysis

研究代表者

薄場 渉 (Usuba, Wataru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90867649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌患者の尿中で発現が上昇しているmiR-146a-5pに着目し、膀胱癌への作用メカニズムの解明と新規治療法への応用を目的として研究を行った。網羅的発現解析によりmiR-146a-5pの標的遺伝子としてTET2を同定し、TET2がc-Mycを介して膀胱癌の血管新生を促進することをin vitroで明らかにした。マウスモデルではmiR-146a-5pによるTET2の抑制が膀胱癌の腫瘍増殖能や血管新生能を促進させることが示された。膀胱癌患者の生存分析ではTET2低発現およびc-Myc高発現は予後不良因子であった。以上より、miR-146a-5pは膀胱癌の治療標的としての有用性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは1種類で同じパスウェイに存在する複数の遺伝子を標的とすることができる。よって強固な機能抑制が期待できるため、miRNAはsiRNAと比べ新規治療標的として効果的である。今回の研究ではmiR-146a-5pが膀胱癌の成長を促進することが示された。この結果を用いてmiR-146a-5pの膀胱内注入療法を確立し発現制御が可能となれば、これまでにない新規・再発治療法の早期実現に繋がり、さらにmiR-146a-5pにより制御を受ける他癌腫に対しての効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on miR-146a-5p, which is upregulated in the urine of bladder cancer patients, we conducted research to elucidate the mechanism of action of miR-146a-5p on bladder cancer and to apply it to novel therapeutic methods.

As a target gene of miR-146a-5p, TET2 was identified by microarray gene expression analysis. In vitro experiments using bladder cancer cells and vascular endothelial cells showed that TET2 promotes angiogenesis of bladder cancer via c-Myc. Suppression of TET2 by miR-146a-5p in a mouse model promotes tumor growth and angiogenic potential of bladder cancer. Kaplan-Meier survival analysis of bladder cancer patients showed that low TET2 expression and/or high c-Myc expression were poor prognostic factors. These results suggest that miR-146a-5 may be useful as a therapeutic target for bladder cancer.

研究分野：泌尿器科学

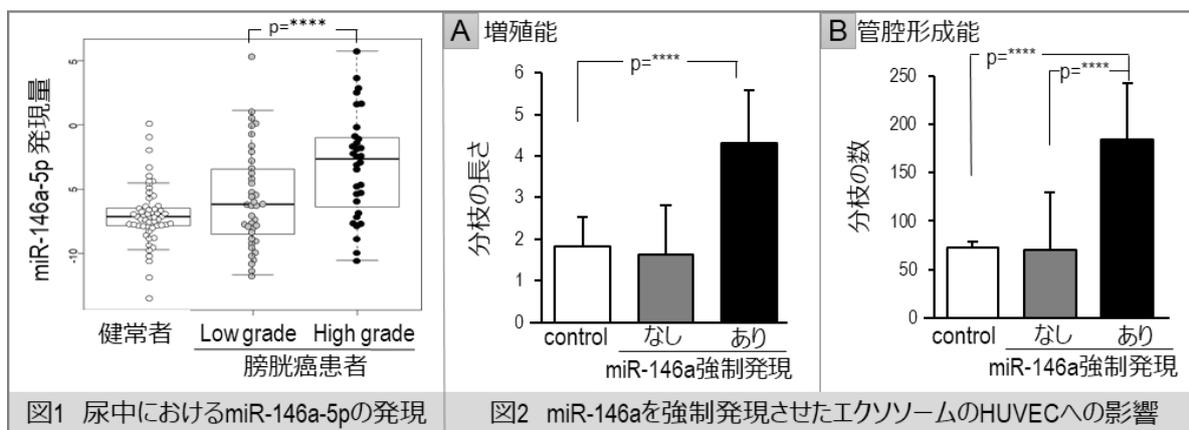
キーワード：miR-146a-5p 膀胱癌 エクソソーム TET2 膀胱腔内注入療法 血管新生

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌、特に筋層非浸潤性膀胱癌は再発頻度が高く、より早期に癌を検出し、初期治療後も慎重かつ定期的な経過観察を要する。筋層非浸潤性膀胱癌の初期診断・術後経過観察に用いられる検査は「尿細胞診検査」と「膀胱鏡検査」があり、前者は侵襲性の低い検査であるものの感度が40-60%と低く、後者は侵襲を伴う検査である点が問題となっている。そのため、より癌検出の感度が高く低侵襲かつ簡便な新たな腫瘍マーカーの開発が望まれている。加えて筋層非浸潤性膀胱癌は、治療および再発予防目的でBCG膀胱内注入療法が行われるが、30-40%の症例はBCG療法が奏功せず、膀胱全摘除術を余儀なくされている。BCG抵抗性癌、中でもBCG unresponsive癌に対する新規治療法の開発は我々に課せられた急務の課題である。

本研究において研究代表者は、約20塩基の1本鎖のnon-coding RNAであるmiRNAに着目した。着目するmiRNAは細胞間のコミュニケーションツールとして知られているエクソソームに内包され安定して存在している事が分かっている。加えてエクソソームの中でも特に腫瘍から分泌されるエクソソームは新規のhallmarkとなることが期待されている。近年ではエクソソーム中のmiRNAが新規の癌バイオマーカーとして注目されており、研究代表者グループではこれまでに尿中miR-146a-5pの発現が、健常者比べて膀胱癌患者でより上昇している事を明らかにした。さらに膀胱癌細胞から分泌されたエクソソームに内包されたmiR-146a-5pが、血管内皮細胞に作用することで血管増殖を来し、膀胱癌の悪性化に深く関わっていることをこれまでの実験で確認している。具体的に、定量的RT-PCR法にて膀胱癌患者のhigh grade症例とlow grade症例の尿中のエクソソーム内miR-146a-5pの発現を比較したところ、high grade症例で有意に高いmiR-146a-5p発現を確認した(図1)。さらにmiR-146a-5pが低発現のJ82膀胱癌細胞株にmiR-146aを過剰発現させた後、その培養上清から抽出したエクソソームをヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)に添加したところ、HUVECの増殖能および管腔形成能が有意に増加した。(図2)

以上のことを踏まえて、膀胱癌に対するバイオマーカーの候補である miR-146a-5p に注目し、その癌増殖・進展への作用メカニズムを解明し、創薬につなげる研究を立案した。



2. 研究の目的

本研究では「miR-146a-5pの尿中膀胱癌バイオマーカーとしての有用性の検証」「miR-146a-5pが膀胱癌に作用するメカニズムの解明」「miR-146a-5pまたはその標的遺伝子を用いた膀胱腔内注入療法の開発」の3つを目的とした。

再発・病期進展の可能性が高い筋層非浸潤性膀胱癌は、局所治療として腔内治療である膀胱内注入が可能である。RNA干渉を用いた膀胱内注入治療の試みは散見されるが、未だ実用化にはつながっていない。研究代表者のグループはすでに、miRNAを用いた膀胱内注入局所療法の試みに成功しており、独自にマウスモデル系も立ち上げている。また、miRNAが治療標的として有利な理由は、1種類のmiRNAで複数種類の遺伝子を標的とすることである。siRNAでは、基本的に1対1対応で標的とした遺伝子のみを抑制するが、miRNAを用いることで、同じパスウェイに存在する複数遺伝子を標的としうるため、より強固な機能抑制が期待される。このように、miRNAの膀胱内注入により膀胱内でのmiR146a-5p発現制御が可能となれば、従来の治療とは一線を画す新規治療法ならびに再発予防法の開発に繋がる可能性がある。miR146a-5pをターゲットした治療の有用性が確立すれば、miR146a-5pにより制御を受ける他癌腫に対する治療効果も期待でき、その波及効果は大きいと考えた。

3. 研究の方法

(1) 網羅的遺伝子発現解析による miR-146a の標的遺伝子の同定

miR-146a の標的遺伝子を同定するため、miR-146a を強制発現させた HUVEC から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子の網羅的発現解析を行った。miRNA の標的遺伝子の予測プログラムである Target Scan を用いて、発現が変動していた遺伝子のうち miR-146a の標的遺伝子を選定した。さらに HUVEC に miR-146a を強制発現させ、候補遺伝子の発現の変化を検討し、真に標的となっている遺伝子を同定した。

(2) エクソソーム内 miR-146a-5p と標的遺伝子の血管内皮細胞における影響の検討

miR-146a を強制発現させた J82 細胞 (miR-146a-5p の発現が低い細胞株) の培養上清から抽出したエクソソームを HUVEC に添加し、miR-146a 標的遺伝子の mRNA および蛋白質レベルの発現の変化を確認した。また、siRNA を用いて HUVEC の miR-146a 標的遺伝子の発現を抑制し、HUVEC の増殖能や管腔形成能への影響を確認した。

(3) 膀胱癌患者の TET2 ならびに c-Myc の発現量で層別化した生存分析

(1) と (2) において miR-146a の標的遺伝子であると同定した TET2 とその下流因子である c-Myc について、膀胱癌患者における発現量で層別化し、全生存率に及ぼす影響について Kaplan-Meier 分析にて検討した。

(4) 同所性膀胱癌モデルマウスにおける miR-146a の腫瘍増殖と血管新生能への影響

ルシフェラーゼ活性を有する膀胱癌細胞株をマウスに移植することで、腫瘍の状態を生体の外から確認出来るシステム (in vivo imaging system; IVIS) を用い、同所性膀胱癌マウスモデルにて検討を行った。まず miR-146a を過剰発現させた膀胱癌細胞株を尿道カテーテルにて膀胱内に注入、3 週間後まで経時的に観察し腫瘍サイズを測定した。さらに腫瘍を摘出し、病理組織標本を作製後、血液領域を示す CD31、低酸素マーカーである HIF1 α の発現について免疫染色法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子発現解析による miR-146a の標的遺伝子の同定

種々の細胞由来のエクソソームを取り込ませた HUVEC から RNA を抽出し、RNA マイクロアレイを用いて遺伝子の網羅的発現解析を行った。細胞の miR-146a-5p の発現量や miR-146a の強制発現あり/なしで層別化して候補遺伝子を絞り込み、Target Scan により 5 つの遺伝子を選定した (図 3)。これらの遺伝子発現を qPCR で検証したところ、CYB5R4 と TET2 だけが miR-146a の強制発現によって発現が低下した (図 4)。この 2 つの遺伝子の機能やパスウェイを検討したところ、最終的に血管新生との関係が報告されている TET2 が miR-146a の標的遺伝子であると同定した。

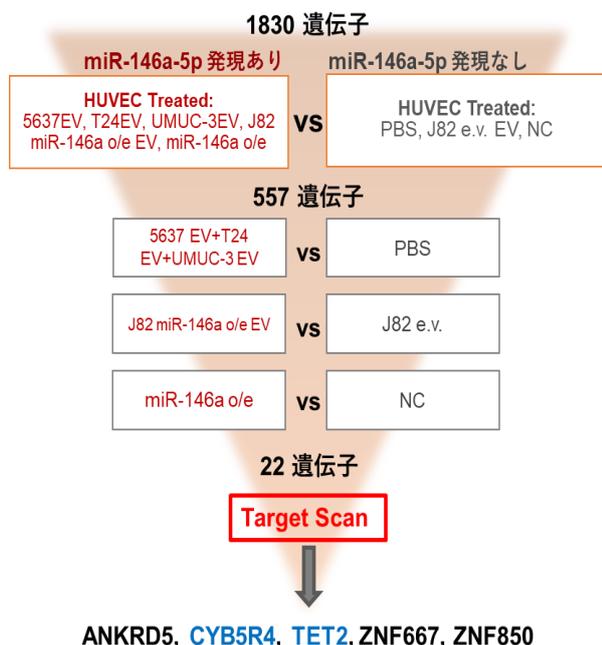


図 3. miR-146a-5p の標的候補遺伝子探索フロー

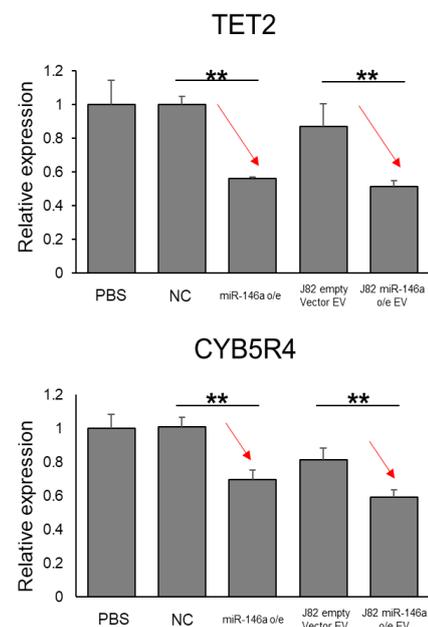


図 4. miR-146a の強制発現による遺伝子発現の変化

(2) エクソソーム内 miR-146a-5p と標的遺伝子の血管内皮細胞における影響の検討

miR-146a を過剰発現させた J82 細胞のエクソソーム、あるいは合成 miR-146a を HUVEC に添加し mRNA および蛋白レベルの発現を解析したところ、どちらにおいても TET2 の発現が抑制されることが示された (図 5)。また、siRNA を用いて HUVEC の TET2 の発現をノックダウンしたところ、HUVEC の増殖能が促進された。これは TET2 が DNA 脱メチル化の調節因子であり、その発現が悪性腫瘍における腫瘍抑制因子であるという報告を裏付ける結果であった。

さらに TET2 の下流で働く因子について、マイクロアレイ解析の結果からターゲットをしぼり発現解析を行った結果、TET2 は c-Myc を介して、膀胱癌の血管新生を促進していることが明らかになった。加えて、免疫組織化学染色により膀胱癌における血管新生と TET2 の局在を確認したところ、TET2 と血管内皮マーカである CD31 は同じ場所に局在が見られ、TET2 発現が低下している標本では CD31 発現が亢進していた。

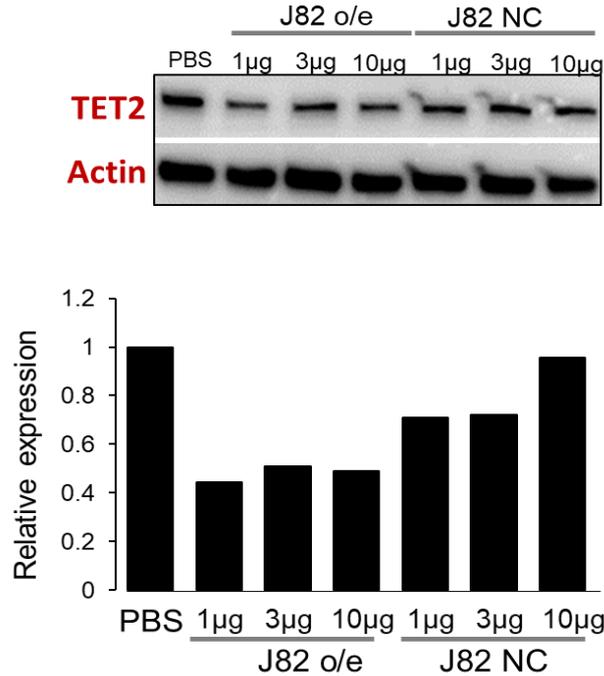


図 5. miR-146a 過剰発現による HUVEC の TET2 発現の変化

(3) 膀胱癌患者の TET2 ならびに c-Myc の発現量で層別化した生存分析

膀胱癌患者 (n=404) を TET2 および c-Myc の発現量の違いで分類して生存分析を行った。TET2 発現量の低値、c-Myc 発現量の高値は単独で膀胱癌の予後不良に関連していた。また、TET2 低発現かつ c-Myc 高発現の群では全生存率はさらに低下 ($p < 0.0001$) することから、miR-146a による TET2 の抑制が膀胱癌の予後に重大な影響をあたえることが示唆された (図 6)。

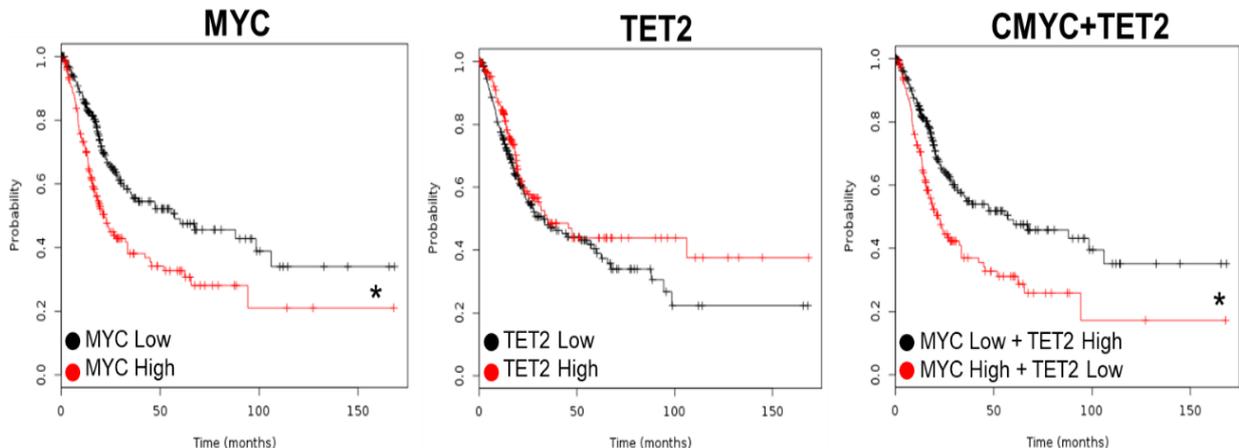


図 6. 膀胱癌患者における c-Myc および TET2 低発現/高発現群別の生存曲線

(4) 同所性膀胱癌モデルマウスにおける miR-146a の腫瘍増殖と血管新生能への影響

miR-146a を過剰発現させた膀胱癌同所移植モデルマウスを作成し、0~3 週間後まで IVIS イメージングを用いて腫瘍サイズを測定したところ、miR-146a の過剰発現あり/なし群での比較において、図 7 に示すように過剰発現あり群は有意に腫瘍が大きい傾向が見られた ($p < 0.01$)。

次に腫瘍を摘出後、血管内皮マーカである CD31 の局在を免疫染色にて検討したところ、血管領域を示す CD31 陽性領域は、過剰発現あり群の腫瘍でより広範であった。加えてほとんどの血管は、腫瘍を包んでいる腫瘍底辺部・膀胱の内側に見られた。このことから、血管領域と密度は細胞への酸素供給に関連があると推測し、低酸素マーカーである HIF1 α の発現を検討した。その結果、CD31 陽性領域の少ない腫瘍部位は、HIF1 α 発現が高いことが判明した (図 8)。

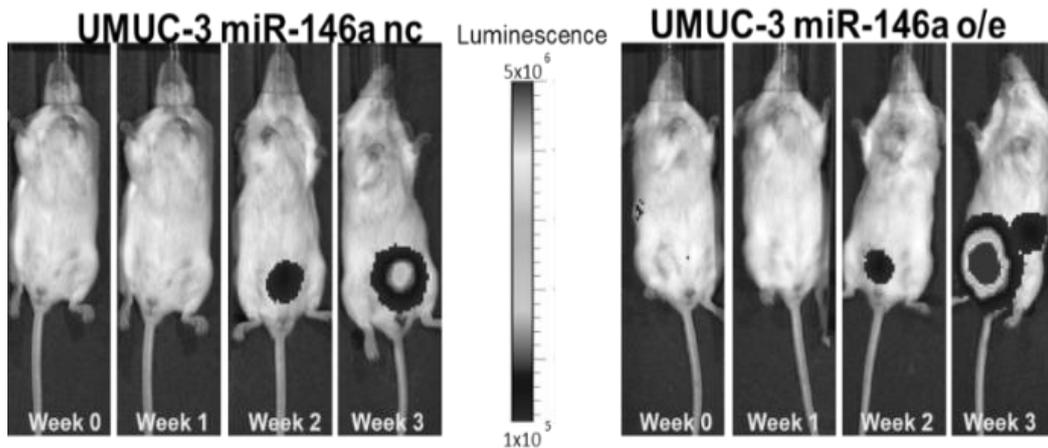


図 7. miR-146a を過剰発現した同所性膀胱癌モデルマウスにおける腫瘍サイズの変化

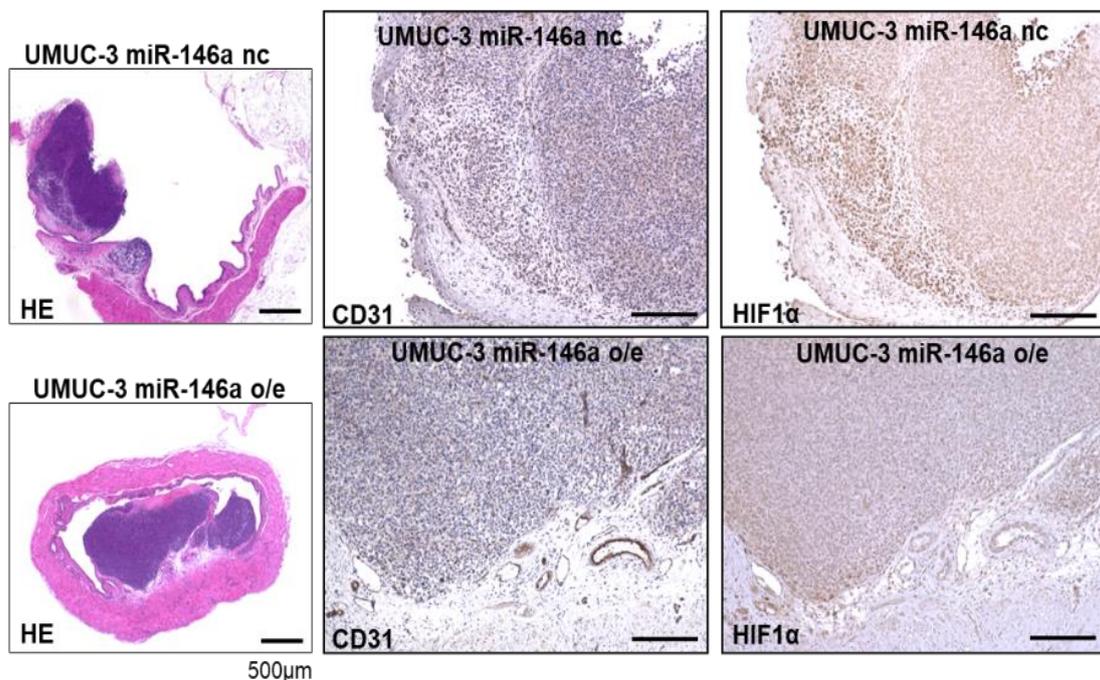


図 8. miR-146a を過剰発現した同所性膀胱癌モデルマウス腫瘍における CD31 および HIF1 α の局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Prieto Vila Marta, Usuba Wataru, Yoshioka Yusuke, Takeshita Fumitaka, Yoshiike Miki, Sasaki Hideo, Yamamoto Yusuke, Kikuchi Eiji, Ochiya Takahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 High grade bladder cancer cells secrete extracellular vesicles containing miRNA 146a 5p and promotes angiogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Biology	6. 最初と最後の頁 e47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jex2.47	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayakawa Nozomi, Yamada Ryuji, Aratake Satoe, Yoshiike Miki, Usuba Wataru, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Kikuchi Eiji.
2. 発表標題 CD55 positive exosomes as a novel urinary biomarker for bladder cancer.
3. 学会等名 19th Urological Association of Asia Congress（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 薄場渉, 吉池美紀, 荒武里衣, 吉岡祐亮, 山田龍治, 早川望, 落谷孝弘, 菊地栄次.
2. 発表標題 膀胱がんにおける尿中エクソソームの表面抗原CD55・CD9と内包物質miR-146a-5pのバイオマーカーとしての検討.
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 薄場渉, 吉池美紀, 荒武里衣, 吉岡祐亮, 山田龍治, 早川望, 落谷孝広, 菊地栄次.
2. 発表標題 尿中CD55/CD9共陽性エクソソームは膀胱癌の新規診断バイオマーカーかつ予後進展に關与する
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	吉池 美紀 (Yoshiike Miki) (60398964)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員 (32713)	
研究協力者	荒武 里衣 (Aratake Satoe)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員 (32713)	

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