

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501298

研究課題名(和文)尿路上皮癌患者尿中に存在するマイクロRNAを基点とした新規診断法の開発研究

研究課題名(英文)Development of new tumor markers based on microRNA expression in urine of the patients with urothelial carcinoma

研究代表者

榎田 英樹(enokida, hideki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80347103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は膀胱癌におけるmicroRNAの発現プロファイルを同定して新たな膀胱癌の診断マーカーの開発を行った。膀胱癌患者100例、健常者49例、尿路感染症患者25例でのレトロスペクティブな検討ではmiR-96とmiR-183は良好な感度・特異度を持って癌と非癌の区別が可能であった。これらの発現はステージ、グレードと相関し、筋層非浸潤癌の再発を予測することが可能であった。さらに前向き試験として血尿を主訴として外来を受診した患者(尿路上皮癌56例、尿路結石35例、尿路感染症51例)においてはmiR-Xは血尿による疑陽性率が少なく有望な腫瘍マーカーと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We developed novel urine markers for detecting urothelial carcinoma. Retrospective examination using 100 bladder cancer, 49 healthy volunteers, and 25 urinary tract infection patients revealed that miR-96 and miR-183 could distinguish cancer from benign disease with good sensitivity and specificity. These miRNAs expressions were well correlated with tumor stage and grade as recurrence free survival of non-muscle invasive bladder cancer. As for prospective examination of the out patients with macroscopic hematuria revealed that miR-X was a promising tumor markers with less false positive affected by macroscopic hematuria.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：microRNA 膀胱癌 診断マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

現在臨床的に有用な尿路上皮癌(膀胱癌および腎盂尿管癌)の腫瘍マーカーは尿細胞診検査である。ところが尿細胞診は検査法として特異度は高いが(90 - 95%)感度が低く(30 - 40%)、陰性であっても癌を否定できない欠点がある。近年、BTA や NMP-22 などの新しい分子マーカーが開発されたが感度・特異度ともに中途半端でありブレイクスルーとなっていない<sup>1)</sup>。腎盂尿管癌では尿細胞診検査が陰性であった場合、診断のために侵襲の大きな尿管鏡検査が必要となることがある。また、膀胱癌に対する内視鏡手術(TUR-BT)後の再発の診断には頻回に膀胱鏡検査が実施されており、患者への侵襲やコスト面の問題は大きい。このような現状から非侵襲的で感度・特異度ともに優れた腫瘍マーカーの早急な開発が望まれている。

近年、種々の遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構の一つとして、蛋白をコードしない一本鎖機能性RNAであるmicroRNA(miRNA)が注目されてきている。miRNAは21塩基前後の短いRNAで、ターゲットであるメッセンジャーRNAの翻訳領域もしくは3'末側非翻訳領域をブロックして蛋白合成を妨げる。このようなmiRNAは、2014年5月時点でヒトでは2500種類以上が報告されており全遺伝子の約60%を制御しているとされ、発生や分化、細胞増殖、アポトーシス等様々な役割を担っている。癌患者の腫瘍組織においてはこれらmiRNAの発現が変化し癌細胞自体の増殖能や生存能が変化することが報告されている。当然のことながら、癌特異的に発現が亢進しているmiRNAの存在は知られており、尿路上皮癌に特異的に発現するmiRNAを尿中で測定することにより、従来の尿細胞診を凌駕できる腫瘍マーカーの開発が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は尿中マイクロRNA(miRNA)

の検出を利用して優れた尿路上皮癌の腫瘍マーカーを開発することと、これら癌遺伝子的miRNAを介した尿路上皮癌の分子ネットワークの解明である。本研究は尿中のmiRNAを測定することが特色である。他の癌腫で血中のmiRNAを測定する試みがなされているが、早期癌の検出は困難であることが予想される。尿路上皮癌は直接尿に触れているために、剥離癌細胞(尿沈渣)中のmiRNAや癌細胞が破壊されて尿に溶けたmiRNAを効率よく測定できると考えられた。我々が採用したmiRNAは独自のmiRNA発現プロファイルに基づくものであり独創的である(特許取得済)。このリストの上位のmiRNA(miR-96, miR-183)やさらにその他のmiRNAについて尿中での測定を試み腫瘍マーカーとしての有効性の検証を行った。さらに癌の診断だけではなく、浸潤度・悪性度の予測や予後の推測、また内視鏡手術後の再発マーカーとして従来の侵襲的な内視鏡検査の代替検査として使える腫瘍マーカーの開発を目指した。さらに、単なる検出系の実験だけではなく分子生物学的にmiRNAの標的遺伝子に対する発現調節のメカニズムを解明することにより、miRNAを基点とした新しい癌シグナルの探索やこれに基づく新しい治療薬の開発にもつながる可能性を模索した。

## 3. 研究の方法

- (1) 臨床尿路上皮癌検体における667種類miRNA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(miRNAアレイ)
- (2) 早朝尿30ccを3000rpmで10分の遠心を行いデカントして、尿沈渣と上清1ccから市販のキットを用いてTotal RNAを抽出する。以後は組織検体と同様にリアルタイムPCRによるmiRNAの測定を行う。尿検体は尿路上皮癌患者尿100検体、コントロールとしての健常人尿49検体・尿

路感染症患者尿 25 検体をレトロスペクティブな検証に用いた。

(3) プロスペクティブな検証としては、血尿を主訴に外来受診をした患者の尿を用いた。患者背景は平均年齢 65.8 歳 (男性 110 例、女性 77 例) であり、最終的な診断は尿路上皮癌 56 例、尿路結石 35 例、尿路感染症 51 例、その他 44 例であった。

(4) その他癌抑制 miRNA および標的遺伝子の機能解析を行った (miRNA transfection, XTT, Wound healing assay, Cell invasion assay, Apoptosis array, Flow cytometry, Luciferase assay)。

(5) アルゴリズムによる miRNA 標的遺伝子の予測と臨床尿路上皮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)。

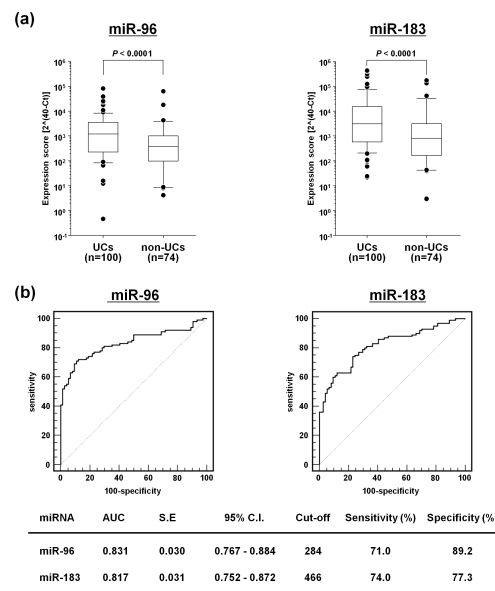
(6) 統計解析

#### 4. 研究成果

(1) 尿中 miRNA 測定プロトコルの完成: 目標達成のための問題点としては、サンプル (尿) 保存法、サンプルの収集から RNA の処理に至るまでの時間および保存温度の設定が重要であったが、特に、核酸保護剤であるポリエチレングリコールの濃度の最適化を完成した。またサンプル収集後、室温で 24 時間経過後でも安定して miRNA の検出は可能であるということが判明した。

(2) 「尿路上皮癌 miRNA 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。対象は尿路上皮癌患者 (n=100) 健常者 (n=49) および尿路感染患者 (n=25) の尿から total RNA を抽出して stem-loop PCR にて miR-96 および miR-183 を測定した。尿路上皮癌患者における miR-96、miR-183 の発現は健常者や尿路感染患者の尿に比べて有意に高く、ステージやグレードと関連していた。miR-96 の検出は感度 71.0% 特異度 89.2% (AUC 0.831) で癌患

者と非癌患者の区別が可能であった。また尿細胞診で陰性であった 44 症例中 27 例で miR-96 が検出され、尿細胞診と合わせると 78.2% の診断感度であった。さらに術前・術後の比較では miR-96、miR-183 の発現は術後に有意に低下していた。尿中の microRNA 測定は尿路上皮癌の非侵襲的な診断法として有用である可能性が示唆された。



(3) さらに、同じプロファイルから癌抑制 microRNA の研究に着手している。miR-574-3p が膀胱癌細胞において腫瘍増殖抑制効果があることが明らかになった。以上の患者背景は平均年齢 65.8 歳 (男性 110 例、女性 77 例) であり、最終的な診断は尿路上皮癌 56 例、尿路結石 35 例、尿路感染症 51 例、その他 44 例であった。以前、後ろ向き研究で膀胱癌診断に有望とされていた 2 つの miRNA (miR-96, miR-183) は、今回の前向き試験では高頻度の偽陽性 (False positive) が観察された。特に、尿路結石症での偽陽性率が高く (35%) その原因として赤血球の混入が考えられた。実際に末梢血を尿に混入した肉眼的血尿モデルでは miR-96, miR-183 の発現が高値になることが確認された。セルソーターで赤血球の分離を行うことも検討し

たが、実際の臨床応用ではコスト的に問題があると思われたため、再度膀胱癌のマイクロRNA 発現プロファイルを検討して別のマイクロRNA の候補を選択した(miR-X)。この miR-X の測定値は膀胱癌患者尿において有意に高く (P<0.001)、病理学的事項 (ステージ・グレード) とも有意な相関を示した (P=0.003, P=0.0115)。Receiver-Operator-Curve (ROC) 曲線解析において、高感度 (>60%)、高特異度 (>80%) をもって癌と非癌の区別が可能であった。特許案件のため詳細な報告は差し控えるが、本研究により、安定した尿中マイクロRNA の検出法を確立できたと考えられる。当初の計画に従い有望な腫瘍マーカーを開発でき、既に企業 (知的財産戦略ネットワーク株式会社) への特許の譲渡が成立しており、特筆すべきと考えられる。miR-X による遺伝子発現調節の機構を解明については、miR-X 発現導入細胞株の遺伝子発現解析や細胞機能解析が進行中である。

(総括)

以上の一連の研究により、尿中 miRNA の診断は前向き試験を展開して新しい腫瘍マーカーの開発に繋がった。また複数の癌抑制 miRNA についても興味深い知見が得られ、miRNA を基点とする癌の発生・進展のメカニズムの解明に繋がった。

#### 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6件)

1. Yoshino H, Seki N, Itesako T, Chiyomaru T, Nakagawa M, Enokida H. 他2名. 1番目. 6番目. Aberrant expression of microRNAs in bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2013;10:396-404. 査読有
2. Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka H. 他7名. 1番目. 2番目. 3番目. 4番目. Novel molecular targets regulated by tumor suppressors

microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer. *Int J Oncol*.

2012;40:1821-1830. 査読有

3. Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K. 他6名. 2番目. 3番目. Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer. *Urol Oncol*. 2012;30:434-443. 査読有
4. Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, Nohata N, Yamasaki. 他4名. 3番目. 4番目. 5番目. 6番目. 8番目. Novel oncogenic function of mesoderm development candidate 1 and its regulation by MiR-574-3p in bladder cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2012;40:951-959. 査読有
5. Yoshino H, Enokida H, Chiyomaru T, Tatarano S, Hidaka H, Yamasaki. 他6名. 1番目. 2番目. 5番目. 6番目. Tumor suppressive microRNA-1 mediated novel apoptosis pathways through direct inhibition of splicing factor serine/arginine-rich 9 (SRSF9/SRp30c) in bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417:588-593. 査読有
6. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H. 他4名. 2番目. 4番目. 7番目. 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. 査読有

[学会発表](計10件)

以下1~3, American Urological Association (AUA) annual meeting (May 21, 2013. San Diego)。

1. Yoshino H, Enokida H. microRNA

- expression signatures in bladder cancer: microRNA-145 function as a tumor suppressor through suppression of MAPK and ErbB signaling pathways.
2. Enokida H. microRNAs detection in urine as diagnostic markers and predictors of recurrence of non-muscle invasive bladder cancer.
  3. Itesako T, Enokida H. Molecular role of miR-195/497 cluster in human bladder cancer based on multiple dataset of microRNA expression signatures by deep sequencing  
以下 1~3、American Urological Association (AUA) annual meeting (May 21, 2012. Atlanta)。
  4. Tatarano S, Enokida H. Integrated analysis of two genome profiles (CGH and microRNA expression signature) revealed miR-218 and miR-574-3p as tumor suppressors in bladder cancer.
  5. Yoshino H, Enokida H. Tumor suppressive microRNA-1 directly regulates splicing factor arginine/serine-rich 9 (SRSF9/SRp30c): a novel apoptotic pathway in bladder cancer.
  6. Enokida H. microRNAs detection in urine as diagnostic markers and predictors of recurrence of non-muscle invasive bladder cancer.
  7. Yamasaki T, Enokida H. Molecular targets regulated by tumor suppressive microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer.  
以下 1~3、American Urological Association (AUA) annual meeting (May 15, 2011. Washington DC)。
  8. Chiyomaru T, Enokida H. Functional role of LASP1 in bladder cancer cell viability and its regulation by microRNAs.
  9. Enokida H. MicroRNAs (miR-96 and miR-183) detection serves as urine markers in patients with urothelial

carcinoma.

10. Yoshino H, Enokida H. The tumor suppressive miRNA cluster of miR-1 and miR-133a targets oncogenic TAGLN2 gene in bladder cancer.

〔産業財産権〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80347103

### (2)研究分担者

川上 一盛 (KAZUMORI KAWAKAMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00404517

### (3)研究協力者

吉野 裕史 (YOSHINO HIROFUMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

日高 英雄 (HIDAKA HIDEO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

山崎 文嗣 (YAMASAKI TAKESHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生