

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791676

研究課題名(和文)尿中マイクロRNAを指標とした非侵襲的な膀胱腫瘍の新規診断法および治療の試み

研究課題名(英文)New method for non-invasive diagnosis and treatment of bladder tumor based on the analysis of urine microRNA

研究代表者

佐々木 秀郎 (Sasaki, Hideo)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30386990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱腫瘍におけるmicroRNA(miR)の発現解析から尿中の新規腫瘍マーカーの確立を目指した。まず膀胱腫瘍細胞株を用いたmiRマイクロアレイにて網羅的解析を行い、膀胱腫瘍で発現が亢進している3種類の候補miRを見出した。膀胱洗浄液中のmiR発現量を定量したところ、3候補のうちmiR-Aは膀胱腫瘍群において有意に発現量が高く、健常群に上限値を設定し腫瘍群と明確に区別することができた。さらに臨床検体の自排尿では、尿細胞診陰性の癌症例をも検出できた。また組織学的悪性度と関連があり、膀胱腫瘍切除術後に低下することから、miR-Aは真に膀胱腫瘍と関連した有用な尿中マーカーであることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish new urine markers for diagnosis of bladder tumor. On the basis of miRNA microarray analyses of total RNA isolated from bladder tumor cell lines, we found three candidate miRNAs (miR-A, B, and C) that were up-regulated in bladder tumor cells. The determination of the levels of these miRNAs in the bladder washings from patients with or without bladder tumor revealed that miR-A was significantly up-regulated in the patients with bladder tumor, and able to discriminate the tumor group from normal one by setting an appropriate cut-off value. Comparable results were also obtained in voided urine samples from the patients, and furthermore, miR-A in urine discriminated the bladder tumor patients negative for urine cytology. The expression levels of miR-A correlated with both pathological grade and stage, and normalized after tumor resection, which suggest that it is a promising urine marker specific for bladder tumor.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱腫瘍 microRNA 腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

膀胱腫瘍は泌尿器科腫瘍の中で発生頻度の高い疾患である。腫瘍の多くは、表在性であり悪性度も低い。2年再発率が50から60%と高く再発の診断および再発予防が非常に重要である。再発した腫瘍の30%に悪性度と病期の進行を認めるとされ、再発は予後に大きく影響を与える。患者の予後改善のためには、膀胱腫瘍の早期診断および再発の早期発見が重要であると考えられている。現在、診断の方法として尿細胞診が多く利用されているが、特異度は高い(>95%)ものの感度は低い(<40%)のが現状で、侵襲性が高い膀胱鏡検査を頻回に施行する必要がある。このような現状の中で、現在も尿中の腫瘍マーカーがいくつか報告されているが、いずれも感度は優れているが特異性が低く、マーカー単独での膀胱腫瘍の診断は困難である。患者の再発予防ならびに予後の改善のためには、新しい腫瘍マーカーによる非侵襲的で簡便な診断法、さらには治療法を開発することが必須であると考えられる。

いままで申請者は、H17~18年度の科学研究費の交付を受け、マイクロアレイを使用した尿中DNA解析を行ってきた(若手研究B、膀胱癌の腫瘍マーカーの検索および遺伝子治療)。その中で、尿中RNAは微量かつ分解が進んでいるためアレイ解析は困難であることが判明した。そこで、膀胱腫瘍患者ならびに正常者(腎移植ドナー)の膀胱洗浄液から抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析を施行し、有意に発現が変動している157の候補遺伝子を選択することができた。候補遺伝子の中で具体例を挙げると、すでに膀胱腫瘍の血中マーカーとして有用であると報告されているUroplakin 1A1)など以外に、現在までに膀胱腫瘍との関連が報告されていない遺伝子も多数選択されてきている。

そこで今回は、近年その発現異常が癌の発症や進展に関与することが確認され注目を集めているマイクロRNA(miRNA)に着目し、候補遺伝子を制御するmiRNAによる診断・治療法を開発を提案した。

miRNAは細胞内に存在する機能性低分子

RNAであり、転写後の配列特異的なRNAサイレンシングにより標的遺伝子の発現を抑制する。大きな利点としてsiRNAなど他の低分子RNAと違いmiRNAは体液中に分泌されるため診断マーカーとなり得ることがあげられる。近年、miRNAは生物の高次機能の調節のみならず、ヒトのさまざまな疾患の発症など極めて広範囲の生命現象に関与していることが確認され、新しい腫瘍マーカーとしての開発や、治療への応用の模索が始まっている。

## 2. 研究の目的

本研究では膀胱腫瘍の早期診断および再発の早期発見を目的として、まずマイクロアレイ解析により、膀胱腫瘍マーカー遺伝子の検索を行う。そしてマーカー遺伝子を標的とするmiRNAについて尿中スクリーニングを行うことにより、膀胱腫瘍で増減しているmiRNAを見出し、簡便に膀胱腫瘍を診断できるマーカーとしての確立を目指す。更に、miRNAをin vitroおよびin vivoで膀胱腫瘍に投与し、RNA干渉を利用した遺伝子治療法としての応用を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) miRNAのマイクロアレイ解析

膀胱腫瘍の細胞株(RT-4:表在型,T-24:浸潤型)および腎移植ドナー尿管から剥離採取した尿路上皮からRNAを抽出した。RNA integrity number (RIN)を指標としてRNAの質を検定し、RIN7以上の検体を用いてAgilent社microRNA microarray Version 16.0にてマイクロアレイ解析を行なった。

### (2) 膀胱洗浄液を用いたmiRNA定量

膀胱洗浄液を検体としてRT-qPCRによる検討を行った。健常対象者(健常群)9例、膀胱腫瘍患者(腫瘍群)20例の膀胱洗9例、膀胱腫瘍患者(腫瘍群)20例の膀胱洗浄液よりRNAを抽出し、RT-qPCRを行った。発現量の比較検討にはcycle threshold(Ct)値を使用した。

### (3) 自排尿を用いた miRNA 定量

自排尿を検体として用いた RT-qPCR による検討を行った。健常群 19 例、腫瘍群 19 例の自排尿より RNA を抽出し、RT-qPCR を行った。発現量の比較検討には目的の miRNA の Ct 値から has-miR-21-3p の Ct 値を引いた Ct 値を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) miRNA のマイクロアレイ解析結果

尿管 20 検体のうち、RIN7 以上であった 6 検体を正常対照群として、膀胱腫瘍細胞 2 株の miRNA 発現量を比較解析した。

腫瘍群と対照群の miRNA 発現プロファイルは大きく異なっていることが明らかになった (Fig.1)。

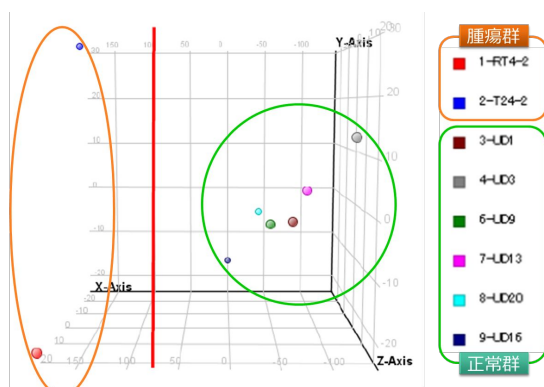


Fig.1 miRNAマイクロアレイ解析結果の主成分分析によるプロファイル

正常群の平均値と比較して、発現が 2 倍以上有意に亢進している microRNA は RT-4 で 34 種類、T-24 で 10 種類であった。逆に発現が 2 倍以上有意に減少しているのは RT-4 で 158 種類、T-24 で 169 種類であった。

### (2) 膀胱洗浄液を用いた miRNA 定量結果

RT-4 と T-24 で共通して発現が亢進している 3 種類の miRNA をマーカー候補として選定した。3 種類の候補 miRNA のうち 1 種類は qPCR で半数ほどの検体しか増幅されなかったため除外し、miRNA-A (miR-A) と -B (miR-B) について検討した。

候補 miR-A の Ct 値は腫瘍群で  $29.0 \pm 3.20$  (22.8-32.5) であり、健常群の  $35.8 \pm 6.75$  (34.4-36.7) に比較し有意に低値であった

( $P < 0.0001$ )。候補 miR-B の Ct 値も同様に、腫瘍群で  $30.1 \pm 4.13$  (23.3-38.6) であり、健常群の  $36.4 \pm 3.96$  (30.0-44.1) に比較し有意に低値であった。尿細胞診と各候補 miR の Ct 値も有意に相関し、細胞診が class になるに従い Ct 値が低下した (miR-A :  $P = 0.0005$ , miR-B :  $P = 0.0920$ )。miR-A においては健常群にカットオフラインを設定し腫瘍群と明確に区別することが可能であり (Fig.2)、腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。

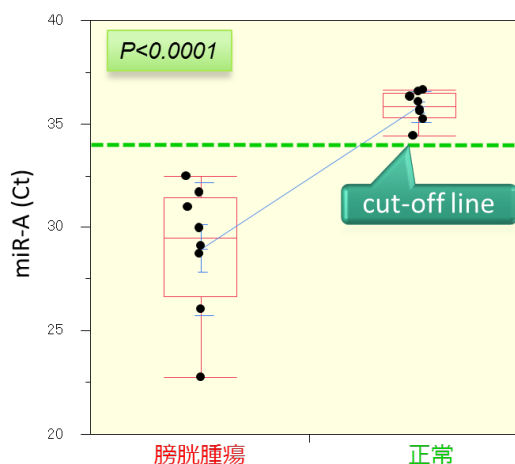


Fig.2 膀胱洗浄液におけるmiR-A発現量

### (3) 自排尿を用いた miRNA 定量結果

miR-B は尿検体における発現が安定しておらず、検出不能の検体が 3 割以上を占めるためマーカーとしての有用性は低いと考え検討から除外した。miR-A の Ct 値は腫瘍群で  $-2.2 \pm 4.6$  であり、健常群の  $-0.5 \pm 1.3$  に比較し有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。同症例の術前後での比較では、術前 ( $-4.1 \pm 5.1$ ) に比較して術後 ( $-0.4 \pm 1.8$ ) で有意に低下した ( $P = 0.04$ ) (Fig.3)。また、尿細胞診陰性の膀胱癌でも、健常群に比較してその値は有意に低下し ( $-2.1 \pm 4.8$ ,  $P = 0.02$ )、尿細胞診陰性の癌症例を検出できる可能性が示唆された。更に発現量と病理組織学的所見との相関も認められ、low grade ( $0.03 \pm 2.31$ ) に比較し high grade にて発現が亢進 ( $-5.37 \pm 5.21$ ) ( $P < 0.01$ ) し、表在性膀胱腫瘍 ( $-0.72 \pm 2.7$ ) に比較し、深在性膀胱腫瘍でその発現が有意に亢進していた ( $-5.4 \pm 5.4$ ) ( $P = 0.02$ )。以上より、miR-A は膀胱腫瘍マーカーとしての有用性のみならず、

組織学的悪性度の予測因子としての有用性も確認された。

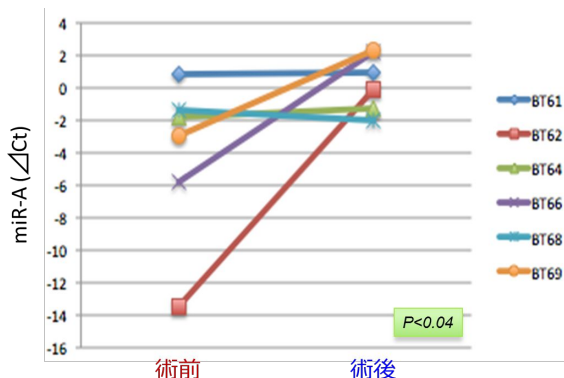


Fig.3 自排尿における術前後のmiR-A発現量

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Uchino K, Takeshita F, Takahashi R, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H, Sonoke S, Yano J, Sasaki H, Nozawa S, Yoshiike M, Kitajima K, Chikaraishi T, Ochiya T: Therapeutic effects of microRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression. *Molecular Therapy*. 21 (3):610 - 619, 2013.3, 査読有

〔学会発表〕(計3件)

佐々木秀郎, 吉池美紀, 野澤資亜利, 目時弘彰, 北島和樹, 工藤浩也, 中澤龍斗, 佐藤雄一, 小坂展慶, 落谷孝広, 力石辰也: 膀胱腫瘍の新規腫瘍マーカーとしての尿中 miRNA の有用性の検討. 第 103 回日本泌尿器科学会総会. ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市). 2015/4/21

佐々木秀郎, 吉池美紀, 野澤資亜利, 蜂須賀智, 松橋恵理子, 相田紘一郎, 北島和樹, 中澤龍斗, 佐藤雄一, 小坂展慶, 落谷孝広, 力石辰也: マイクロ RNA microarray を用いた網羅的遺伝子解析による新規膀胱腫瘍マーカーの検索. 第 102 回日本泌尿器科学会総会. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市). 2014/4/25

佐々木秀郎, 吉池美紀, 野澤資亜利, 蜂須賀智, 松橋恵理子, 西智弘, 勝岡由一, 中澤龍斗, 宮野佐哲, 佐藤雄一, 小坂展慶,

落合孝弘, 力石辰也: microRNA microarray を用いた網羅的遺伝子解析による新規膀胱腫瘍マーカーの検索. 第 101 回日本泌尿器科学会総会. さっぽろ芸術文化の館(北海道札幌市). 2013/4/26

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 秀郎 (SASAKI, Hideo)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30386990

### (2) 研究協力者

国立がんセンター、がん転移研究室  
室長 落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro)  
研究員 小坂 展慶 (KOSAKA, Nobuyosi)

聖マリアンナ医科大学、腎泌尿器外科  
講師 野澤 資亜利 (NOZAWA, Shiari)  
研究技術員 吉池 美紀 (YOSHIIKE, Miki)