

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462490

研究課題名(和文)機能性RNA分子ネットワーク解析による膀胱がんの新規個別化治療の確立

研究課題名(英文)Order made therapy for bladder cancer by investigating functional RNAs associated molecular networks

研究代表者

中川 昌之(Nakagawa, Masayuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90164144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA-143/145、microRNA-23b/27b、microRNA-451a/144-3p/144-5p、microRNA-145-5p/3pの発現は、正常膀胱組織に比べ膀胱癌では有意に抑制されていた。またBIRC5・WNT7A・CCNE1・CCNE2・CDC25A・PKMYT1・CCNE1・CCNE2・UHRF1などが、これらのmiRNAの標的遺伝子候補となった。従来はmiRNAの生合成過程でpassenger strandは機能しないと考えられていたが、本研究により実は癌細胞においては強力な癌抑制型miRNAとして機能することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of microRNA-143/145, microRNA-23b/27b, microRNA-451a/144-3p/144-5p, and microRNA-145-5p/3p were down-regulated in bladder cancer tissues compared to normal bladder tissues. These microRNAs target BIRC5, WNT7A, CCNE1, CCNE2, CDC25A, PKMYT1, CCNE1, CCNE2, and UHRF1. The passenger strand had been considered as having no function. However, we newly found that the passenger strand of specific microRNA actually function as strong tumor suppressors. From our experiments, we found new strategy for treatment of bladder cancer.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：マイクロRNA 膀胱癌

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における膀胱癌の罹患数は 17,461 人 (2007 年) また死亡数は 6,804 人 (2010 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決定打とならない。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、保険適応のある有効なセカンドライン抗癌剤治療は現在も確立されていない。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、治療成績の向上のために新規治療法の開発は急務である。近年、肺癌・乳癌・腎癌などで適用承認となった分子標的薬と GC 療法を併用した転移性膀胱癌に対する第 2 相試験が行われてきたが、それらの成績は従来の GC 療法を凌駕するものではなかった。しかしながら米国 NCI が主導した CALGB-90101 に於いては、免疫組織学的染色で HER2 強陽性患者に対してのみ選択的に Trastuzumab を投与したところ、全奏成功率 70% (CR 11%、PR 59%) と良好な成績を示した。この事は、個々の症例において、活性化しているシグナル伝達経路を見出し、適切に遮断できれば、既存薬による追加治療が十分に奏功する可能性を示唆している。

近年、機能性 RNA 分子の中で、microRNA (miRNA) とよばれる 19-23 塩基の小さな RNA 分子が生命の発生・分化などの過程に多大な影響を及ぼす事が報告され注目されている。現在までにヒトでは約 2500 種の miRNA が登録されている (miRBase release 21)。この RNA 分子は、最終的に 1 本鎖の RNA 分子として機能し、タンパクコード RNA の翻訳阻害や分解を通してタンパクコード遺伝子の制御をしている。ヒト癌においては、癌遺伝子型・癌抑制型として機能する miRNA の報告が相次いでいる。我々は 2007 年から、国内で逸早く膀胱癌臨床検体を用いた miRNA の発現プロファイルに着手し、癌抑制型 miRNA の探

索とその機能解析を行ってきた。その結果、miRNA-1、miRNA-133a、miRNA-145、miR-218、miR-574-3p などは膀胱癌で、癌抑制型 miRNA として機能していることを見出し、それらが制御する新規癌遺伝子 (TAGLN2、SWAP70、GSTP1、FSCN1) が癌細胞の増殖・遊走・浸潤に密接に関与することを報告してきた。膀胱癌の miRNA の研究から、miRNA が制御する複雑な分子ネットワークを解明する事が、膀胱癌の新たな分子メカニズムを解明する糸口となり、この事により、膀胱癌の新規個別化治療戦略を構築できると考えた。

## 2. 研究の目的

機能性 RNA 分子のひとつである microRNA (miRNA) は、タンパクコード遺伝子の発現制御を司る重要な RNA 分子であり、癌の発生・進展・転移に深く関わっている。我々は膀胱癌の miRNA 解析に逸早く取り組み、これまでに癌抑制型 miRNA の探索と miRNA が制御する遺伝子群の報告をしてきた実績がある。その中で、膀胱癌で見出された癌抑制型 miRNA が複数の受容体型チロシンキナーゼ (VEGF・EGFR・FGFR・IGFR など) とその下流のシグナル伝達経路を制御している知見を得た。そこで膀胱癌患者における癌抑制型 miRNA の発現とその下流の分子ネットワークを詳細に検討する事で、個々の患者に適した分子標的薬や既存薬剤の個別化治療が可能と考えた。本申請は、現在使用可能な既存治療薬の標的となっているシグナル伝達機構と、膀胱癌細胞における機能性 RNA 分子ネットワークの相互関係を研究・理解して、膀胱癌の新規個別化治療戦略を構築し提案する事が目的である。

## 3. 研究の方法

研究は大きく分けて以下の 3 段階のステップを経て行った。

(1) 膀胱癌・癌抑制型 miRNA の探索継続と癌

抑制型 miRNA が制御する分子ネットワークの構築。

- (2) 膀胱癌で活性化されているシグナル伝達経路の探索とその経路を遮断する既存治療薬の選択。
- (3) マウスモデルを用いた既存治療薬による抗腫瘍効果の確認。

#### 4 . 研究成果

Deep sequencing による microRNA (miRNA) 発現解析では、933 個の既知 miRNA の中でクラスターを形成する microRNA-143/145 は癌抑制的作用を有し BIRC5 や WNT7A を直接制御することを明らかにした。

また microRNA-24-1 は FOXM1 を直接制御することで膀胱癌細胞株の増殖を抑制することが明らかになった。

さらに microRNA-23b/27b クラスターはともに共同して著明ながん遺伝子である EGFR と cMET を抑制することも明らかにした。また microRNA-451a/144-3p/144-5p クラスターの発現は、正常膀胱組織に比べ膀胱癌組織・癌細胞株では有意に抑制されていた ( $p < 0.0001$ )。また miRNA-451a/144-3p/144-5p を膀胱癌細胞に核酸導入すると、miRNA-451a では癌細胞の増殖は抑制されなかったが、miRNA144-3p/144-5p では癌細胞の増殖を抑制した。さらに miRNA-144-5p は細胞周期において G1-arrest を誘導する事で癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。miRNA-144-5p の制御する分子ネットワークを探索した結果、細胞周期関連遺伝子 (CCNE1・CCNE2・CDC25A・PKMYT1) が、この miRNA の標的遺伝子候補となった。さらにルシフェラーゼレポーターアッセイにて、miRNA-144-5p がこれら細胞周期関連遺伝子 (CCNE1・CCNE2・CDC25A・PKMYT1) を直接制御することを証明した。CCNE1、CCNE2、CDC25A、PKMYT1 の発現は、正常組織に比べ膀胱癌臨床検体・癌細胞株で有意に亢進していた ( $p <$

$0.0001$ )。さらに臨床膀胱癌検体において CCNE1、CCNE2 の高発現群では全生存率の有意な低下を認めた ( $p = 0.0251$ ,  $p = 0.0324$ )。最近の研究では DNA メチル化促進作用のある UHRF1 遺伝子の発現を microRNA-145-5p/3p 共に抑制することを明らかにした。従来は miRNA の生合成過程で従来は passenger strand として機能しないと考えられていた miR-144-5p であるが、本研究により実は正常細胞で発現があり、癌細胞においては強力な癌抑制型 miRNA として機能することを見出した。このような研究を通して microRNA を基点としていくつかの重要な膀胱癌の治療戦略の糸口が明らかになった。今後、vivo の実験を展開していく予定である。

#### 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)

1. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor-suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): Inhibition of bladder cancer cell aggressiveness. Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, Goto Y, Miyamoto K, Yonemori M, Inoguchi S, Nakagawa M, Seki N. Oncotarget. 2016 [Epub ahead of print]. 査読あり
2. Tumour-suppressive microRNA-144-5p directly targets CCNE1/2 as potential prognostic markers in bladder cancer. Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Goto Y, Nishikawa R, Matak H, Tatarano S, Itesako T, Nakagawa M, Enokida H. Br J Cancer. 2015;113:282-9. 査読あり
3. Dual regulation of receptor tyrosine kinase genes EGFR and c-Met by the tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster in bladder cancer. Chiyomaru T,

Seki N, Inoguchi S, Ishihara T, Mataka H, Matsushita R, Goto Y, Nishikawa R, Tatarano S, Itesako T, Nakagawa M, Enokida H. Int J Oncol. 2015;46:487-96. 査読あり

4. Tumour-suppressive microRNA-24-1 inhibits cancer cell proliferation through targeting FOXM1 in bladder cancer. Inoguchi S, Seki N, Chiyomaru T, Ishihara T, Matsushita R, Mataka H, Itesako T, Tatarano S, Yoshino H, Goto Y, Nishikawa R, Nakagawa M, Enokida H. FEBS Lett. 2014;588:3170-9. 査読あり
5. The microRNA expression signature of bladder cancer by deep sequencing: the functional significance of the miR-195/497 cluster. Itesako T, Seki N, Yoshino H, Chiyomaru T, Yamasaki T, Hidaka H, Yonezawa T, Nohata N, Kinoshita T, Nakagawa M, Enokida H. PLoS One. 2014;9:e84311. 査読あり

[学会発表](計6件)

American Urological Association (AUA) annual meeting (May 6, 2016. San Diego).

1. Matsushita R, Seki N, Yoshino H, Miyamoto K, Yonemori M, Kurozumi A, Goto Y, Enokida H, and Nakagawa M.  
Dual tumor-suppressors (miR-145-5p/miR-145-3p) inducing cancer cell apoptosis via direct targeting UHRF1 in bladder cancer
2. Dual tumor-suppressors miR-139-5p/-3p derived from pre-miR-139 via targeting matrix metalloprotease 11 (MMP11) in bladder cancer. Yonemori M, Seki N, Matsushita R, Miyamoto K, Yoshino H, Goto Y, Kato M, Kurozumi A, Nakagawa M, Enokida H

American Urological Association (AUA) annual meeting (May 15, 2015. New Orleans).

3. MicroRNA-144-5p functions as tumour suppressor through targeting cyclin E1 and cyclin E2 that are potential prognostic markers in bladder cancer. Matsushita R, Seki N, Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Itesako T, Tatarano S, Yoshino H, Goto Y, Nishikawa R, Enokida H, Nakagawa M.
4. Target pathways regulated by clustered tumor suppressor microRNA-23b/27b cluster in bladder cancer. Chiyomaru T, Inoguchi S, Ishihara T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M.
5. Tumor-suppressive microRNA-24 inhibits bladder cancer via targeting transcription factor FOXM1. Inoguchi S, Chiyomaru T, Ishihara T, Enokida H, Seki N, Nakagawa M.
6. The microRNA expression signature of bladder cancer by deep sequencing: the functional significance of miR-195/497 cluster. Itesako T, Enokida H, Yoshino H, Chiyomaru T, Seki N, Nakagawa M.

[産業財産権]

取得状況(計3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(miR-96)

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: 5704575

取得年月日: 2015年4月22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(miR-183)

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：5704576

取得年月日：2015年4月22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尿路上皮癌の検出方法

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：5884219

取得年月日：2016年3月15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等：<http://genomejet.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 昌之 (NAKAGAWA MASAYUKI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90164144

### (2) 研究分担者

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：80347103

関 直彦 (SEKI NAOHICO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50345013

### (3) 研究協力者

千代丸剛

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

井口智生

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

石原知明

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生