



Title	miR-130 familyの膀胱癌治療標的としての評価と seed-targeting LNAによる核酸医薬創製に向けた研究
Author(s)	江川, 博
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56169
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

平成 27 年度 博士学位論文

miR-130 family の膀胱癌治療標的としての評価と
seed-targeting LNA による核酸医薬創製に向けた研究

大阪大学大学院 薬学研究科

創成薬学専攻 博士後期課程 3 年 江川 博

目次

目次	2
略記一覧	3
緒論	5
本論	8
第1章 膀胱癌において高発現するmiR-130 familyの同定	8
第1節 実験材料と実験方法	8
第2節 膀胱癌において高発現する miRNA 群の同定	10
第3節 小括	11
第2章 膀胱癌における miR-130 family の機能解析	12
第1節 実験材料と実験方法	12
第2節 miR-130 family 阻害剤の作用評価	20
第3節 5637 細胞における miR-130 family 阻害の表現型解析	21
第4節 miR-130 family 阻害による膀胱癌細胞の運動性調節メカニズムの解析	21
第5節 miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞株の樹立	23
第6節 miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞株の表現型解析	24
第7節 小括	25
第3章 膀胱癌における miR-130 family の標的遺伝子探索	26
第1節 実験材料と実験方法	26
第2節 PTEN の miR-130 family 標的遺伝子としての評価	28
第3節 PTPN11/SHP-2 の miR-130 family 標的遺伝子としての評価	29
第4節 膀胱癌臨床検体における PTEN と PTPN11/SHP-2 の免疫組織化学	34
第5節 小括	35
第4章 miR-130 family の seed-targeting LNA 創製と機能解析	36
第1節 実験材料と実験方法	36
第2節 miR-130 family seed-targeting LNA のデザインと作用評価	37
第3節 miR-130 family seed-targeting LNA の表現型解析	38
第4節 miR-130 family seed-targeting LNA の抗腫瘍作用の評価	40
第5節 小括	41
総括	43
結論	46
謝辞	47
参考文献	48

略記一覽

1-methoxy-PMS	1-methoxy-5-methylphenazinium
2-Me	2-mercaptoethanol
ARHGAP12	Rho GTPase Activating Protein 12
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extracellular <i>Matrix</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition /or Transformation
Ex/Em	Excitation/Emission
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	Gene ontology
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	Hypoxia-inducible factor
HRP	Horseradish peroxidase
iTRAQ	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation
MMP	Matrix metalloproteinase
MST	Median Survival Time
NKRF	NF-kappa-B-repressing factor
Oct	Octamer-binding transcription factor 4
OncomiR	Oncogenic microRNA
PBS	Phosphate buffered saline
PDX	Patient-Derived Xenograft
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPAR α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PS	Phosphorothioated

PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
Rac1	RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SILAC	Stable Isotope Labeled Amino acids in Culture
TAZ	Transcriptional coactivator with. PDZ-binding motif
TIMP2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TSC1	Tuberous sclerosis complex 1
TuR BT	Transurethral resection of the Bladder Tumor
Tween 20	Tween polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium monosodium salt
YAP	Yes-associated protein
ZEB1/2	Zinc finger E-box binding homeobox 1 or 2

緒論

膀胱癌は世界中で年間およそ 380, 000 人が発症し, 150, 000 人もの命を奪っている¹. 初発性膀胱癌の 55-60%は表在性癌として発症するが, 経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-BT)の予後は比較的良好で治療満足度も高い. 一方で浸潤性膀胱癌患者の 5 年生存率は 60%に留まっており^{2,3}, 遠隔転移を呈する症例に至っては生存期間中央値(MST)が 15 カ月と非常に予後不良である⁴. 筋層浸潤を呈した浸潤性膀胱癌治療の第一選択は膀胱全摘出術であるが, 患者の著しい QOL 低下を招くという側面も併せ持っている⁵. この状況はここ 20 年近く変わっておらず, 有効な治療薬の登場が切望されてきた.

膀胱癌は表在性乳頭癌 (pTa)と浸潤性癌 (pT1<)とでドライバー変異が異なるという Two-pathway model が提唱されており, 以前からその多様性が指摘されてきた⁶. 遺伝子変異数がメラノーマ, 肺癌に次いで 3 番目に多い癌種でもあり, 多様性のみならず腫瘍内の不均一性も高いと推測されている⁷. こうした背景から病態の細分化が進み, Sjödaahl らは臨床検体でのトランスクリプトーム解析に基づき膀胱癌を Urobasal A (UroA), Urobasal B (UroB), Genomically Unstable (GU), Squamous Cell Carcinoma-Like (SCCL), infiltrated の 5 種類のサブクラスに分類している^{6,7}. このうち UroB と SCCL は共に予後不良であるにも関わらず, 異なる遺伝子発現プロファイルを示しており, 膀胱癌は多様性の高い癌であることが解明されてきた. このような異なるサブクラスの腫瘍が同時多発的に発生するという特徴も, 膀胱癌治療の難しさを助長している. 分子標的治療薬が隆盛する昨今において, いまだに膀胱癌に対しては細胞障害性抗腫瘍薬の併用である M-VAC (メトトレキサート・ビンブラスチン・ドキソルビシン・シスプラチン)療法あるいは GC (ゲムシタビン・シスプラチン)療法が使われ続けている. 有効な分子標的治療薬の不在も, 膀胱癌の病態が単一分子によって規定されていないことを示唆しており, 同癌に対する創薬標的分子には多様な制御遺伝子を有している標的が適切だと考えられる.

こうした特徴を考慮し, 私は膀胱癌治療標的として non-coding RNA の一種である microRNA (miRNA)に注目した. miRNA は 20-25bp の non-coding RNA であり, 標的 mRNA の翻訳阻害あるいは分解によって遺伝子発現を制御する. 1 つの miRNA は平均 200 個もの標的遺伝子を有しており^{8,9}, 逆に哺乳類の遺伝子の約 60%は miRNA による制御を受けていると試算されている^{10,11}. つまり癌で発現上昇している oncomiR を標的とすることで, 多様な癌関連シグナル伝達経路を制御出来る可能性がある. 一方で miRNA は標的 mRNA の poly-A 鎖の脱アデニル化を介した不安定化, あるいは mRNA 当たりのリボソーム量の低下によって標的 mRNA の翻訳阻害を行うため, それぞれの標的遺伝子に対する抑制作用は極めて小さい¹³. また miRNA ノックアウトスタディでもその大部分が表現型を示さず, 単独の miRNA の作用自体もそこまで強いものではない. これは miRNA 欠損による標的遺伝子の発現変動が多くとも Fold-change 2 倍以下であり, この程度の発現変動は生物本来の恒常性維持機構で補正できるためだと考えられている^{14,15}. こうした知見から,

miRNA は多様な遺伝子の発現を微調整する"ファインチューナー"として理解されている¹³。以上の背景を踏まえると、治療標的として強い薬効を示すためには複数の疾患特異的 miRNA を同時に標的とする戦略が有効であると考えられる。事実、複数の miRNA から構成される miRNA-cluster¹⁶や miRNA-family¹⁷において機能的重複が報告されており、こうした miRNA 群を同時に阻害することで単独阻害時よりも強力に癌の進展を制御できる可能性が示唆されている¹⁸⁻²⁰。しかしながら膀胱癌においては oncomiR-family の存在は確認されておらず、この治療戦略の実現は事実上不可能であった。

これまでに当研究室では大阪大学医学部泌尿器科から供与して頂いた腎盂尿管癌臨床検体を用いて、miRNA microarray 解析を行い、浸潤性腎盂尿管癌で高発現する 4 種類の miRNA として miR-130b, miR-301a, miR-301b, miR-210 を同定している (Fig.1)。

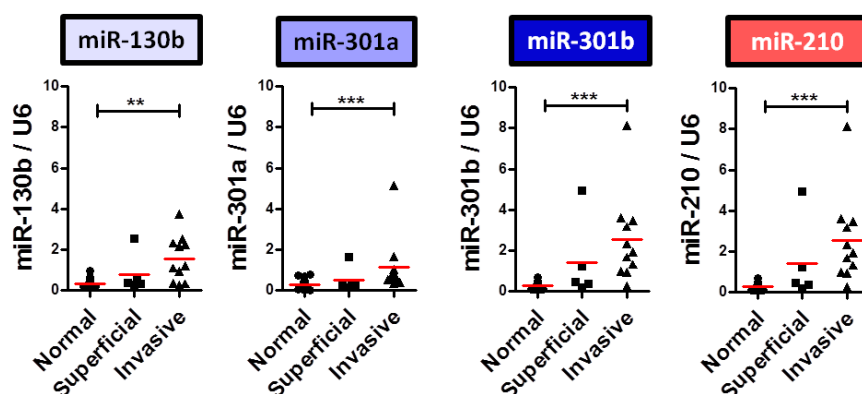


Figure. 1 miR-130b, miR-301a, miR-301b and miR-210 were significantly upregulated in invasive renal pelvis and ureter carcinoma specimens. The expression of the miR-210 and miR-130 family was validated by RT-PCR. Normal n = 17, Superficial n = 5, Invasive n = 11. Data are mean ± S.D. **p<0.01, ***p<0.001.

腎盂・尿管は組織学的には膀胱と同一の移行上皮に分類されることから、膀胱癌においてもこれらの miRNA が発現上昇する可能性が考えられた。そこで第 1 章では膀胱癌臨床検体を用いてこれら 4 種類の miRNA の発現量を定量した結果、確かに膀胱癌部での発現上昇が認められた。miR-210 は膀胱癌における機能解析が既に報告されていたため²¹、新規性の観点から miR-130 family に焦点を当てた。Table.1 に示すように miR-130 family は oncomiR としての報告が大多数を占め、治療標的として適切な miRNA 群だと考えられるが、膀胱癌における機能は全く分かっていない。癌種に依存して機能が異なることを考慮すると、標的とする癌における機能解析は必須である。そこで第 2 章では同定した miR-130 family が oncomiR-family として膀胱癌進展に寄与しているかを、細胞株を用いた *in vitro* 解析により評価した。続けて第 3 章では標的遺伝子の探索を行い、miR-130 family の膀胱癌での機能の本質に迫った。最後に第 4 章では同定した miR-130 family に対する seed-targeting LNA をデザインし、治療薬としての有効性を *in vitro* と *in vivo* の両面から検討した。一連の解析を通して興味深い知見が得られたので、ここに博士論文としてまとめた。

has-miR-130b-3p				has-miR-301a-3p			
Onco/Supp	Target	Tumor type	Reference	Onco/Supp	Target	Tumor type	Reference
Suppressor	IRF1	肝臟癌	Lin YH <i>et al</i> ²²	OncomiR	RUNX3	胃癌	Wang M <i>et al</i> ³⁷
Suppressor	ZEB1	子宮內膜癌	Dong P <i>et al</i> ²³	OncomiR	SMAD4	咽頭扁平上皮癌	Lu Y <i>et al</i> ³⁸
Suppressor	STAT3	脾臟癌	Zhao G <i>et al</i> ²⁴	OncomiR	GAX	肝臟癌	Zhou P <i>et al</i> ³⁹
Suppressor	MMP-2	前立腺癌	Chen Q <i>et al</i> ²⁵	OncomiR	SMAD4	結腸直腸癌	Lu Y <i>et al</i> ³⁸
Suppressor	CSF-1	卵巢癌	Yang C <i>et al</i> ²⁶	OncomiR	AMPKα1	骨肉腫	Zhang Y <i>et al</i> ⁴⁰
OncomiR	PPARγ	肝臟癌	Tu K <i>et al</i> ²⁷	OncomiR	SMAD4	膝癌	Xia X <i>et al</i> ⁴¹
OncomiR	TP53INP1	肝臟癌	Ma S <i>et al</i> ²⁸	OncomiR	NKRF	睪囊腺癌	Lu Z <i>et al</i> ⁴²
OncomiR	PPARγ	結腸直腸癌	Colangelo T <i>et al</i> ²⁹	OncomiR	BIM	睪囊腺癌	Chen Z <i>et al</i> ⁴³
OncomiR	DICER1	子宮內膜癌	Li BL <i>et al</i> ³⁰	OncomiR	NDRG2	前立腺癌	Guo YJ <i>et al</i> ⁴⁴
OncomiR	PTEN	食道扁平上皮癌	Yu T <i>et al</i> ³¹	OncomiR	SOCS6	大腸癌	Fang Y <i>et al</i> ⁴⁵
OncomiR	CCNG2	乳癌 (miR-130b-5p)	Chang YY <i>et al</i> ³²	OncomiR	TGFBR2	大腸癌	Zhang W <i>et al</i> ⁴⁶
OncomiR	TGFBR2	非小細胞肺癌	Mitra R <i>et al</i> ³³	OncomiR	TIMP2	多發性骨髓腫	Liang B <i>et al</i> ⁴⁷
OncomiR	TP53INP1	成人 T 細胞白血病	Yeung ML <i>et al</i> ³⁴	OncomiR	PTEN	乳癌	Ma F <i>et al</i> ⁴⁸
OncomiR	PPARγ	神經膠腫	Sheng X <i>et al</i> ³⁵	has-miR-301b-3p			
OncomiR	CYLD	胃癌	Sun B <i>et al</i> ³⁶	OncomiR	NDRG2	前立腺癌	Guo YJ <i>et al</i> ⁴⁴

Table.1 Identified target genes of miR-130 family among various cancer types. All target genes were validated by dual-lucifersae reporter assay using reporter vector containing 3'-UTR of each genes.

本論

第1章 膀胱癌において高発現する miR-130 family の同定

第1節 実験材料・実験方法

治療標的探索に際し, 膀胱癌において高発現しているmiRNAを同定するため, 大阪大学医学部泌尿器科から供与して頂いた膀胱癌臨床検体をサンプルとしたRT-PCRを行った.

膀胱癌臨床検体

大阪大学医学部泌尿器科より供与して頂いた臨床検体を用いた. 臨床情報は以下の通り.

Age		Gender		Pathological tumor stage		Pathological tumor grade	
Median	72	Male	16	pTa	16	G1	4
Range	47-86	Female	7	pT1	5	G2	10
				pT2	2	G3	8
						unknown	1

Table 2. Bladder cancer clinical samples used for RT-PCR analysis and immunohistochemistry

組織ホモジナイズ

- ・ QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)

RNA 抽出, cDNA 合成

- ・ miRNeasy mini kit (QIAGEN)
- ・ Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis and qRT-PCR SYBR Kits (TaKaRa)

RT-PCR

- ・ Polymerase premix
SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BIO-RAD)
- ・ Primers (Clontech)
mRQ 3' primer
U6 Reverse primer
U6 Forward primer

・ Primers (Life Technologies)

Target	Sequence
hsa-miR-130b-3p	5'-CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT-3'
hsa-miR-301a-3p	5'-CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGC-3'
hsa-miR-301b-3p	5'-CAGTGCAATGATATTGTCAAAGC-3'
hsa-miR-210-3p	5'-CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA-3'

・ PCR 装置

CFX96 Real-Time System (BIO-RAD)

臨床検体からの miRNA 抽出

RNA 抽出に先立ち、凍結組織内の RNA 安定化の目的で、凍結組織を RNA later ICE Frozen Tissue Transition Solution (Ambion) 中で-20℃/16 時間以上保存した。その後、組織片を QIAzol (QIAGEN) 700 µL と破碎用 φ5.5mm ステンレスビーズ 1 個が入ったサンプルチューブに入れ、Micro smash MS-100 (TOMY)を用いて破碎し、ホモジネートを得た。破碎条件としては、4800 rpm/30 秒間を 2 回繰り返し、途中 1 分間の氷上放置とした。組織ホモジネートにクロロホルム 140 µL を添加して混和後、12,000 g/15 分間遠心し、得られた水層を RNA 抽出に用いた。全自動核酸抽出装置 QIA Qube (QIAGEN)を使用し、200 nucleotide (nt)以上の RNA を RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN)で、200 nt 以下の RNA は miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出精製し、RNA の濃度測定には極微量分光光度計 Nano Drop を使用した。

RT-PCR for miRNA

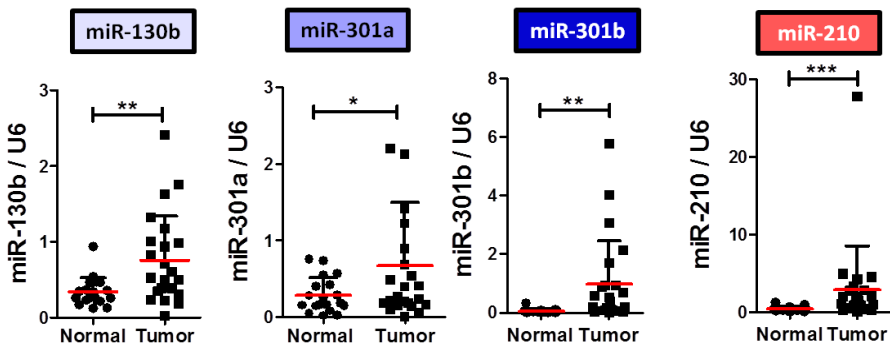
抽出したtotal RNA 500 ng を用いて、Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis and qRT-PCR SYBR Kits にてポリアデニル化とcDNA 合成を行い、MilliQ 水にて10 倍希釈してからRT-PCR に用いた。あらかじめ10 µM に希釈したprimer および SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BIO-RAD) をMilliQ 水にて希釈したものにcDNA を加えて20 µL とし、CFX96 Real-Time System (BIO-RAD) にてRT-PCR を行った。PCR条件は以下の通り。

[miR-130b, miR-301a, miR-301b, U6 snRNA]

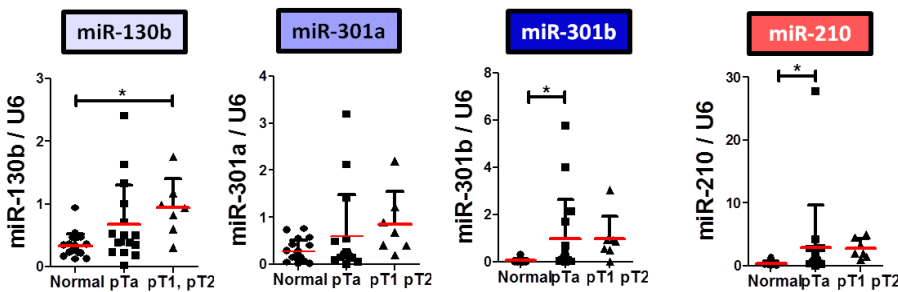
98℃	30sec	
95℃	2sec	
63℃	5sec	x40
55℃	5sec	
95℃	5sec	

第2節 膀胱癌において高発現する miRNA 群の同定

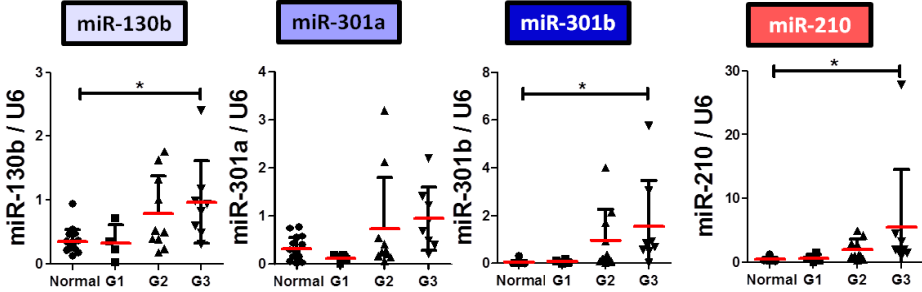
A. Normal VS Tumor



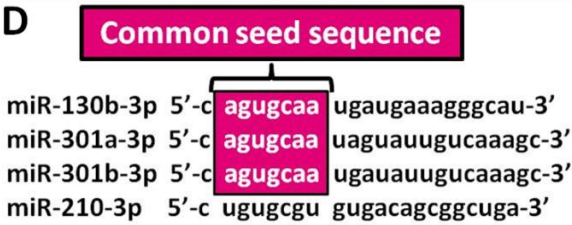
B. Stage



C. Grade



D



E

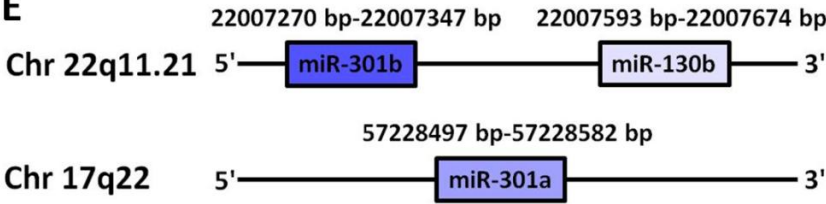


Figure. 2 The miR-130 family and miR-210 are significantly upregulated in bladder cancer specimens. The expression of the miR-130 family was compared between normal and tumor tissues (A), among pathological tumour stages (B), and among pathological tumor grades (C). (D) The miR-130 family has a common seed sequence. (E) Genomic localization of the miR-130 family. Data are mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

腎盂・尿管癌での結果を受け、膀胱癌部23例と正常尿路19例の臨床検体を用いてRT-PCRによるvalidationを実施した。その結果、膀胱癌臨床検体でも腎盂・尿管癌と同様にこれらのmiRNAが非癌部と比較して発現上昇が確認され (Fig.2 A), その発現レベルは浸潤度あるいは異形度の進展に相関していた (Fig.2 B, C)。

第3節 小括

腎盂・尿管癌で発現上昇する4種類のmiRNA群に関して膀胱癌でも発現レベルを検討した結果、同様に発現上昇が観察された。膀胱癌におけるmiR-130 family発現誘導機構は解明されていないが、他疾患での発現制御機構には諸説ある。肺高血圧症においては特に解析が進んでおり、肺動脈性内皮細胞及び筋繊維芽細胞ではHypoxia-HIF2 α -Oct4 axis依存的にmiR-130aを含むmiR-130 familyいずれもが発現上昇し、これが肺性高血圧を引き起こす⁴⁹。他にも肺高血圧症の初期には細胞外マトリックス (ECM)のリモデリングによってECMが硬化するが、これがHippoシグナル伝達経路を活性化し、その結果転写因子YAP/TAZが活性化し、標的であるOct4依存的にmiR-130 familyが誘導される⁵⁰。一方でmiR-130bがtumor suppressorとして機能する卵巣癌においては変異p53がmiR-130bプロモーター領域に結合することで発現が低下する²³。またmiR-301aはNF- κ Bのp50RelAがプロモーター領域に結合することでによってその発現が亢進する。更にmiR-301aはNKRFというNF- κ Bシグナル抑制因子を標的とすることで同シグナルを活性化、ポジティブフィードバックを促進することで自身の発現誘導を行うことも知られている⁴²。つまりmiR-130 familyにはそれぞれ異なる発現制御メカニズムが存在している。本研究においてもmiR-130b, -301a, -301b間の発現上昇レベルはそれぞれ異なっており (Fig. 2 A-C : 膀胱癌臨床検体, 及びFig. 3 A: 膀胱癌細胞株), 膀胱癌においても各miRNA固有の制御メカニズムが存在すると考えられる。

膀胱癌においては筋層浸潤が臨床上的課題となっているが、筋層浸潤癌の前段階であるpTa, pT1症例でmiR-130 familyが発現上昇することは治療標的としての利点である。更にGenecards (<http://www.genecards.org/>)に示されるRNA-Seqのデータでは、miR-130 familyのいずれもが正常膀胱において発現が認められず、これも副作用の観点からは好都合である。興味深いことに、miR-210以外の3種類のmiRNAは共通したseed配列を有するfamily分子であった (Fig.2 D)。miRNA-familyはgenomic localizationが異なるが (Fig.2 E), 2-8塩基目までのseed配列が共通しているmiRNA群を指す¹¹。miR-210は膀胱癌を含む多数の癌でoncomiRとして既報であったため²¹、本研究ではmiR-130b, miR-301a, miR-301bから構成されるmiR-130 familyに焦点を当てて解析を進めることとした。

第2章 膀胱癌における miR-130 family の機能解析

第1節 実験材料・実験方法

細胞培養

UM-UC-2, EJ-1, T24, 5637, J82, RT-4, SV-HUC-1 細胞は奈良県立医科大学より供与されたものを使用した. UM-UC-2, T24, EJ-1 細胞は DMEM 10% FCS で, RT-4, 5637 細胞は RPMI-1640 10 % FCS で, SV-HUC-1 細胞は Ham's F12 10% FCS で, 37°C, 5%CO₂ 環境中で培養した. 継代には 0.025% Trypsin/EDTA を用いて 37°C, 5% CO₂ にてインキュベートすることで細胞を剥離し, 1500rpm/3-5 分間の遠心により回収した.

miRIDIAN Hairpin Inhibitor

本研究では Dharmacon 社より購入した miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor を終濃度 50 nM で使用した.

miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor	カタログ番号
Negative Control #1	(IN-001005-01-05)
hsa-miR-130b-3p - Hairpin Inhibitor	(IH-300660-07-0005)
hsa-miR-301a-3p - Hairpin Inhibitor	(IH-300657-05-0005)
hsa-miR-301b-3p - Hairpin Inhibitor	(IH-301252-02-0005)

トランスフェクション (miRIDIAN Hairpin Inhibitor)

5637 細胞に miRIDIAN Hairpin Inhibitor をトランスフェクションする際には Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen)を用いてリバース法で導入した. 12 well plate の場合, 血清未添加の RPMI-1640 液体培地 200 μ L 中で終濃度 50 nM の miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor と Lipofectamine RNAi MAX 2.2 μ L を予め 15 分間反応させた. この後 7.5×10^4 個/800 μ L となるように調整した 5637 細胞と混合し well に播種した. CO₂ インキュベーター内にて 24 時間培養した後に 10% FCS を添加した RPMI-1640 培地に交換し, さらに 48 時間経過後に実験に使用した. 12 well plate 以外の well plate 若しくは dish で実験を行う際には 12 well plate の底面積を参考に各試薬の使用量を比率で求め使用した.

Primer

Primer はいずれも Life Technologies に合成を依頼したものを使用した。

a. For Dual-luciferase reporter construct

Target miRNA	Sequence	
hsa-miR-130b-3p	Sense	5'-CTAGCGGCCGCTAGTATGCCCTTTCATCATTGCACTGG-3'
	Antisense	5'-TCGACCAGTGCAATGATGAAAGGGCATACTAGCGGCCGCTAGAGCT-3'
hsa-miR-301a-3p	Sense	5'-CTAGCGGCCGCTAGTGCTTTGACAATACTATTGCACTGG-3'
	Antisense	5'-TCGACCAGTGCAATAGTATTGTCAAAGCACTAGCGGCCGCTAGAGCT-3'
hsa-miR-301b-3p	Sense	5'-CTAGCGGCCGCTAGTGCTTTGACAATATCATTGCACTGG-3'
	Antisense	5'-TCGACCAGTGCAATGATATTGTCAAAGCACTAGCGGCCGCTAGAGCT-3'

b. For pri-miRNA expression construct

Target miRNA	Sequence	
hsa-miR-130b-3p	Sense	5'-TCGAAAGCTTTACCCAATTTCGCTCCCTTCT-3'
	Antisense	5'-TCGAGGATCCCACCCACCTGATCCTCTGAT-3'
hsa-miR-301a-3p	Sense	5'-GCGAATTCTCCAAATATGTAACAGAAAGCAACA-3'
	Antisense	5'-GCGGATCCTTCCTTTCTACATCTATGCATGTTT-3'
hsa-miR-301b-3p	Sense	5'-GCAAGCTTGGTGTCTGGGTTCTGAAGACC-3'
	Antisense	5'-GCGGATCCCAGGCCTGTCTAGAATCTCAAGTT-3'

Plasmid 作製

Plasmid Vector

pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega E1330)

pmR-ZsGreen1 Vector (Clontech Z2541N)

pmirGLO reporter construct の作製 (Oligonucleotide によりインサートを作製)

1 µg の pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector を *SacI*/*SalI* を用いてそれぞれ 37°C/overnight 制限酵素処理を行った。切断産物を 1%アガロースゲル電気泳動により単離し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した。標的配列に相補的な Oligonucleotide を Sense/Antisense 鎖それぞれ 2 µg を 46 µL の Oligo Annealing Buffer と混合した。95°Cから 5°Cずつ低下させ、30°Cまで各 5 分間処理させることでアニーリングさせた。Oligonucleotide pairs を制限酵素処理した pmirGLO vector と 1:10 となるように混合し、Ligation high を用いてライゲーションした。その後、*E.coli* DH5α を用いて形質転換し、Luria-Bertani (LB, ampicillin) plate で 37°C一晩培養した後、*NotI*処理によってインサートチェックを行い、ポジティブなクローンを LB (ampicillin)培地中で 18 時間培養し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)を用いて Plasmid 精製した。

pmirGLO reporter construct の構築 (クローニングによりインサートを作製)

・ PCR 反応液の組成

試薬名	(μ L)
2 \times PCR buffer for KOD FX	25
2 mM dNTPs	10
10 μ M sense primer	2.5
10 μ M antisense primer	2.5
Template DNA (cDNA)	0.5
KOD FX	0.5
Water	9.0
Total	50

・ PCR 反応条件 (x, y は Primer 及び標的遺伝子産物の塩基長により決定)

94°C	2 min	
98°C	10 sec	
x°C	30 sec	
68°C	y min	x30
12°C	O/N	

PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動により単離し, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した. Sense/Antisense Primer に設定した 2 種類の制限酵素処理を 37°C/overnight で別々に行い, 1 回目の制限酵素処理後は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)によりゲル電気泳動をせずに核酸のみ抽出し, 2 度目の制限酵素処理後にはゲル電気泳動を行い, 目的核酸断片のみを精製した. 以降の操作は Oligonucleotide によるインサート作製時と同様である.

miR-130 family 安定高発現 UM-UC-2 細胞の作製

miR-130b, miR-301a, miR-301b が発現している 5637 細胞 のゲノム DNA をテンプレートとして, 各 miRNA の pri-miRNA をクローニングした. PCR 産物を任意の制限酵素で処理した後, pmR-ZsGreen1 ベクターにライゲーションした. 得られたプラスミド DNA を miR-130 family の発現量が低い UM-UC-2 細胞にトランスフェクションし, G418 を用いてセクションを行った. 2 週間培養して一過性発現している細胞をすべて除去した後, 限界希釈法により ZsGreen1 陽性シングルコロニーをピックアップして発現量を測定した. Empty ベクターを導入した細胞と比較して各 miRNA の発現量が上昇している細胞株を miR-130 family 高発現 UM-UC-2 細胞として樹立した.

Dual-luciferase reporter assay

Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて添付のプロトコールに従って行い、GloMax 20/20n Luminometer (Turner Biosystems)を用いて測定した。96 well plate に 1.2×10^4 cells/well の 5637 細胞を播種し、24 時間後に pmirGLO vector (50 ng) / miRIDIAN Hairpin Inhibitor (50 nM)を Lipofectamine 2000 0.4 μ L/well を用いてフォワード法でトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に細胞を冷却 PBS で 3 回洗浄し、1 \times Passive lysis buffer 20 μ L 加え、室温で 15 分間振盪して細胞ライセートを調製した。ライセート 5 μ L につき 20 μ L の Luciferase assay reagent II を加え、タッピングしてからホタル・ルシフェラーゼの発光を 10 秒間の積算値として測定した。次に基質 (5637 細胞は 1/2500, UM-UC-2 細胞は 1/500 希釈)を含む Stop & Glo Reagent を 20 μ L 加え、タッピング後にウミシイタケ・ルシフェラーゼの発光を 10 秒間の積算値として測定した。Luciferase 活性はホタル・ルシフェラーゼの測定値をウミシイタケルシフェラーゼの測定値で割った値として算出される。サンプル間の相対活性は、全測定値を Mock の値で割って標準化し、Mock の値を 1 とすることで Relative Luciferase Activity を求めた。

WST-1 assay

miRIDIAN Hairpin Inhibitor トランスフェクション 24 時間後の 5637 細胞を 96 well plate に 2000 cells/well となるように細胞を播種し、その 24・48・72 時間後 (Day1, 2, 3) に 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium salt (WST-1) / 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 溶液 : 1-methoxy-PMS 溶液 を 9 : 1 に混合し、5% となるよう細胞培養液に添加した。2 時間後にプレートリーダー (BIORAD) を用いて測定波長として 450 nm, 対照波長として 630 nm の吸光度をそれぞれ測定した。miR-130 family 高発現 UM-UC-2 細胞の場合は 800 cells/well となるように播種し、以降は同様の操作で細胞増殖能を測定した。再播種 24 時間後の測定値でそれぞれの測定値を割って標準化し、Day1 の値を 1 とすることで Relative cell growth を算出、細胞増殖能として評価した。

Wound healing assay

実験には 12 well plate を使用し、トランスフェクション 3 日目後の細胞あるいはコンフルエント状態の miR-130 family 高発現 UM-UC-2 細胞を用いた。細胞がコンフルエントになっていることを確認後、1000 μ L ピペットチップの先で細胞層に傷をつけた。傷をつけた時点を 0 時間とし、任意の時間まで観察を行った。遊走面積は Image J により定量し、細胞の遊走能は「(ある時点での傷面積)-(0 時間の時点での傷面積)」という式で評価した。

Invasion assay

a. xCELLigence DP system (5637 細胞に使用)

Roche 社製 CIM Plate を使用し、実験に使用する実験器具は事前に 4 °C で冷やしておいた。CIM Plate の Upper chamber を Matrigel (BD Growth Factor Reduced) でコーティングし、Lower chamber に化学誘引物質として FCS を 10% 含んだ RPMI-1640 を加えた。miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor トランスフェクション 1 日後の 5637 細胞を 2×10^4 cells/well となるように無血清培地に懸濁して Upper chamber に播種し、xCELLigence DP system にセットして細胞浸潤能をリアルタイムに測定した。

b. BD BioCoat™ 癌細胞浸潤アッセイシステム (UM-UC-2 細胞に使用)

室温に戻した BD BioCoat™ 癌細胞浸潤アッセイシステムのインサートに 37 °C に温めた無血清 DMEM 溶液を 75 μ L 加え、miR-130 family 高発現 UM-UC-2 細胞を 3×10^3 cells/well となるように無血清 DMEM 溶液 25 μ L で調整し、上部チャンバーに添加した。下部チャンバーには化学誘引物質として FCS を 10% 含んだ DMEM 溶液を 200 μ L 加え、プレートを 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 22 時間インキュベートした。その後に溶液を除去し、下部チャンバーに Calcein AM (2.0 μ g/mL) を 200 μ L 加えて 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 1 時間インキュベートした後、Ex: 485 nm, Em: 535 nm の吸光値を EnVision™ マルチラベルカウンター (Perkin Elmer) で測定した。

抗体

本研究で使用した抗体の希釈倍率とメーカーは以下の通り。

anti-FAK polyclonal (1:1000, Santa Cruz, sc-557, Santa Cruz, CA, USA), anti-p-FAK⁵⁷⁶ (1:1000, SIGMA, SAB4503869, St Louis, MO, USA), anti-p-FAK⁵⁷⁶ (1:1000, Santa Cruz, sc-16563-R), anti-MMP-9 (1:1000, CST, #3852S), anti-Akt (1:1000, CST, #C67E7), anti-p-Akt⁴⁷³ (1:1000, CST, #D9E), anti-PTEN polyclonal (1:1000, Sigma, SAB4300336: for western blot analysis and immunocytochemistry), anti-PTEN polyclonal (1:1000, CST, #9188: for western blot analysis and immunohistochemistry), anti-Actin polyclonal antibody (1:50000, Sigma, A5316). Horse radish peroxidase-conjugated goat anti-mouse/rabbit-IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, INC, mouse:sc-2005, rabbit:sc-2030)

Western blot

- 6× SDS sample buffer
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 mL, グリセロール 2.0 mL, 10% SDS 4.0 mL, 2-メルカプトエタノール 1.2 mL, bromophenol blue 少量を MilliQ 水で 10 mL にメスアップして

使用した. 0.5M Tris-HCl (pH6.8) 2.5 mL, 2-Me 1 mL, 10% SDS 4 mL, スクロース 1 g を MilliQ 水で 10 mL にメスアップした.

- SDS-PAGE 泳動 buffer

Tris base 15.1 g, glycine 72.0 g, SDS 5.0 g を MilliQ 水に溶解して 1000 mL とした. 使用時に MilliQ 水で 5 倍希釈して用いた.

- Transfer buffer

14.4 g/L Tris, 3.03 g/L-glycine, 5 %メタノール (in water)

- TBS-T (Tris-buffered saline with Tween 20) 10 mM Tris-HCl (pH7.4), 600 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 (in water)

- Blocking buffer

5 % スキムミルク(森永乳業) (in TBS-T) 2.5 g のスキムミルクを 50 mL の TBS-T に溶解した.

12 well plate に播種した細胞を冷却 PBS で 3 回 wash してから 6× SDS sample buffer を 50 μ L 滴下, 1 mL チップを用いて細胞を溶解・回収し, 95°C で 10 分間加熱した後で氷冷したサンプルを細胞ライセートとして使用した. まずアクリルアミドゲルを用いて, 20 mA 定電流下でサンプルの SDS-PAGE を行った. 次に PVDF 膜をメタノールで処理し, Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD) もしくは Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BIO-RAD) を用いて 25 V/1 時間のトランスファーを行った. その後メンブレンを 5% スキムミルク溶液を用いて 15 分間のブロッキングを行い, 一次抗体を 4°C で一晩反応させた. 翌日メンブレンを TBS-T で 15 分間洗浄する操作を 3 回行い, 二次抗体を室温で 1 時間反応させた. 抗体反応にはオービタルローテーター (バイオクラフト) を使用し, 攪拌させながら反応させた. 再び TBS-T による洗浄を行った後, ECL Plus Western Blotting Detection Reagents を用いて発光させ, ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) によるバンドの撮影を行った. Densitometry の定量には Image J を使用した.

Gelatin zymography

miRIDIAN Hairpin Inhibitor トランスフェクション 24 時間後に serum free の RPMI-1640 にメディアウム交換を行い, 48 時間培養した. この培養上清を回収して 3000 rpm/5 分間の遠心分離により死細胞を除去し, 2-Me(-) の 6× SDS sample buffer と混合, 37°C/30 分間インキュベートを行うことでサンプルを作製した. サンプルを 0.1% Gelatin solution (SIGMA) 含有の 10% ポリアクリルアミドゲルで展開し, 1× Denaturing buffer / 1× Developing buffer で 30 分間ずつインキュベートした後, 新しい 1× Developing buffer で 37°C/24 時間インキュベートした. ゼラチンの分解を CBB 染色により検出し, これを MMP 活性として評価した.

培養細胞からの Total RNA 抽出

回収した細胞ペレットに Trizol reagent (Invitrogen) を 1 mL 加え, 5 分間のボルテックスにより細胞を溶解させ, さらに 5 分間静置した. クロロホルム 200 μ L を加え, 再び 2 分間ボルテックスした後に室温で 3 分静置した. 12,000 rpm/4°C で 15 分遠心後に上清を回収し, 500 μ L のイソプロパノールを加えて混和し, -80°C で 30 分以上静置した. 15000 rpm/4°C で 20 分遠心後, デカンテーションで上清を捨て, 80%エタノール 1 mL により沈殿を洗い, 12,000 rpm/4°C で 10 分遠心後に再びデカンテーションで上清を捨てエタノールが揮発するまで風乾した. その後, RNase free water を加えてタッピングにより RNA を溶解した.

RT-PCR for mRNA

Real-time PCR 装置には Light Cycler (Roche) を用い, DNA ポリメラーゼとして Thunder Bird (TOYOBO) を使用した. PCR 反応は total 10 μ L の系で行った. Primer 配列と PCR 条件は以下に記載.

・ Primer 配列

Target gene		Sequence
<i>GAPDH</i>	Sense	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'
	Antisense	5'-AATGAGCCCCAGCCTTCTCC-3'
<i>MMP-9</i>	Sense	5'- ACCTCGAACTTTGACAGCGACA-3'
	Antisense	5'- GATGCCATTTCACGTCGTCCTTA-3'
<i>MMP-2</i>	Sense	5'- GATAACCTGGATGCCGTCGTG-3'
	Antisense	5'- CAGCCTAGCCAGTCGGATTTG-3'

・ PCR 反応条件

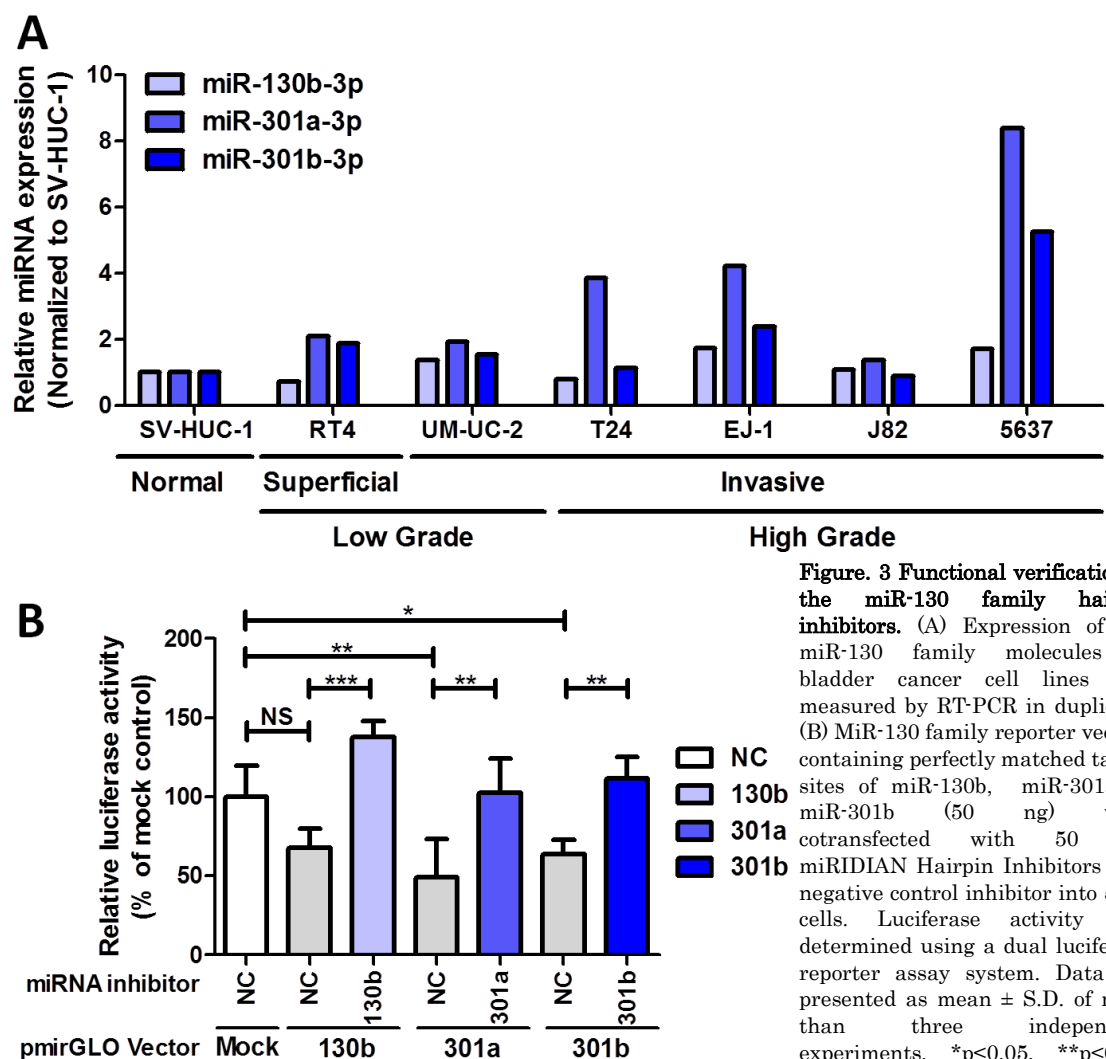
<i>GAPDH</i>			<i>MMP-9/2</i>		
95 °C	30 sec		95 °C	10 sec	
95 °C	15 sec		95 °C	5 sec	
60 °C	30 sec		60 °C	20 sec	x 40
72 °C	15 sec	x 40	融解曲線分析		
融解曲線分析					

細胞染色(培養細胞)

カバーガラスを敷いた 12 well plate に播種した 5637 細胞に miRNA 阻害剤あるいは miR-130 family seed-targeting LNA をトランスフェクションし、トランスフェクション後 3 日目の細胞を染色に用いた。培地を除去して PBS で一度洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (PFA)を用いて固定した。その後 Blocking buffer (5% BSA, 0.3% Triton X-100 in 40 mL PBS)で 1 時間ブロッキングし、一次抗体を添加して 4℃で一晩インキュベートした。翌日 PBS で 3 回洗浄を行い、二次抗体を添加して暗所・室温で 1 時間インキュベートし、PBS による洗浄を行った。なお F-actin と共染色する場合は二次抗体インキュベート時に 40 nM となるように Acti-stain 488 Fluorescent Phalloidin (Cytoskeleton, Inc.)を添加した。DAPI 入りの封入剤である vectashield with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (Southern Biotech)を用いて封入した後に、システム生物顕微鏡 BX51 (OLYMPUS)を用いて観察した。

第2節 miR-130 family 阻害剤の作用評価

前述したように miR-130 family は oncomiR として知られているが, miR-130b に関しては tumor suppressor としての報告も複数存在する (Table.1). また膀胱癌における miR-130 family の機能は未解明であったため, まず膀胱癌細胞を用いて *in vitro* 機能解析を実施した. 解析に際して正常様膀胱細胞株 SV-HUC-1 細胞に加えて 6 種類の膀胱癌細胞株における miR-130 family 発現量を定量し (Fig.3 A), 機能阻害実験には最も発現量が高い 5637 細胞を使用した. miRNA 阻害剤の効果は Dual-luciferase reporter assay により評価し, 内在性の miR-130 family に起因する翻訳阻害を抑制することを確認した (Fig.3 B).



第3節 5637細胞における miR-130 family 阻害の表現型解析

第2節の実験系を用いて miR-130 family 機能阻害が 5637 細胞の細胞増殖能・遊走能・浸潤能に与える影響を解析した結果、細胞増殖には目立った影響を与えなかった (Fig.4 A). しかしながら細胞浸潤性を低下させる傾向を認め (Fig.4 B), 細胞遊走能を顕著に低下させた (Fig.4 C, D).

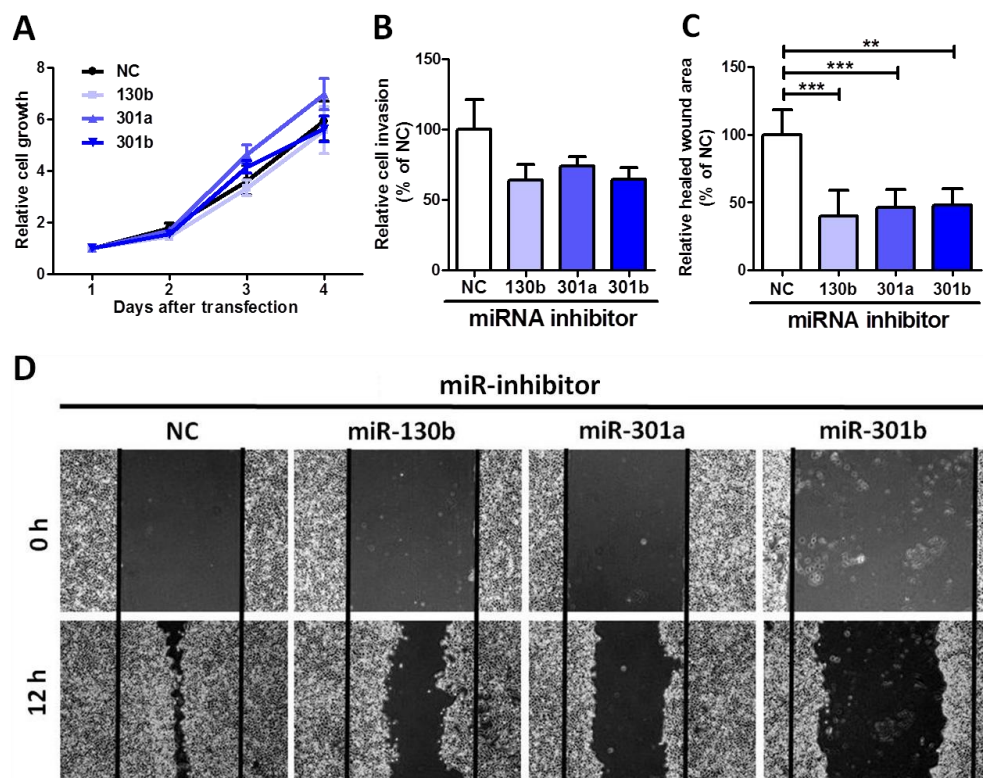


Figure. 4 Inhibition of the miR-130 family suppresses 5637 cell invasion and migration. (A) The effect of miR-130 family inhibitors on cell growth was measured by a WST-1 assay. (B) Invasion assay was performed by xCELLigence real-time cell monitoring system 72 h after transfection. (C) Cell migration was estimated by a wound healing assay. The wound was formed by scraping 60 h after transfection and then relative cell migration was measured after 12 h. In all the experiments, 50 nM miRIDIAN hairpin miRNA inhibitors were transfected in 5637 cells. Data are mean \pm S.D. of more than three independent experiments. **p<0.01, ***p<0.001.

第4節 miR-130 family 阻害による膀胱癌細胞の運動性調節メカニズムの解析

第3節の結果より miR-130 family が膀胱癌の運動性亢進に寄与する可能性が示唆されたため、その制御メカニズムの解析を行った。膀胱癌の病理像において幼若血管はほとんど認められず、血管新生による遠隔転移は少ないと考えられている。その転移様式は主に EMT による Cell-Cell interaction の破綻、あるいは細胞骨格再編成による運動性の獲得によって亢進することが知られている⁶。膀胱癌転移先の第1位は骨盤内のリンパ節、第2位が周辺骨への転移である。血行性転移すると考えられる肺や肝臓はそれぞれ第3, 4位であることから、周辺組織への浸潤が膀胱癌転移の主要メカニズムであることは明白である。

⁵¹. EMT に関しては miR-200 family の発現低下による ZEB1/2 発現上昇がこれを誘導することが知られているため¹⁷, 本研究においては miR-130 family が細胞骨格再編成に伴う運動性亢進に与える影響を評価した。

まず細胞の運動性に重要なストレスファイバー形成を Phalloidin 染色によって評価した結果, miR-301a/b 阻害剤の導入によってこれが減弱する傾向が観察された (Fig. 5 A). ストレスファイバーは焦点接着斑(focal adhesion)を起点に伸長しており, その構成要素の一つである FAK の Tyr⁵⁷⁶ のリン酸化はストレスファイバー形成を促進することが知られている⁵². ウェスタンブロット解析の結果, 同リン酸化部位は miR-301a/b 阻害剤の導入により阻害されることが明らかとなった (Fig.5 B). また FAK の下流因子である Akt⁵³ の Ser⁴⁷³ リン酸化も miR-130 family 阻害によって減弱していた (Fig.5 C). 細胞浸潤能は MMP によっても制御されるが, このうち MMP-9 は PI3K/Akt シグナルにより制御される⁵⁴. そこで MMP-9 タンパク質発現量を評価したところ, miR-301a/b 阻害によって発現量の低下傾向が観察された (Fig.5 C).

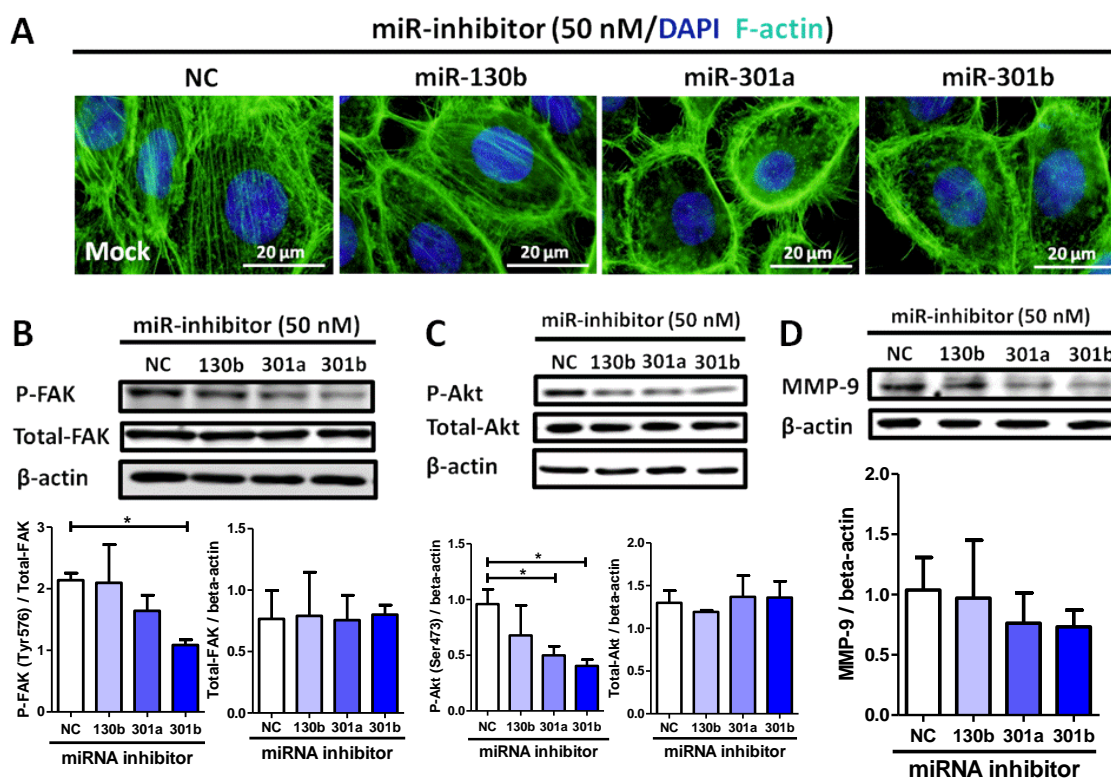


Figure. 5 The effects of the miR-130 family inhibitors on stress fiber formation, phosphorylation status of FAK and Akt, and MMP-9 expression in 5637 cells. (A) Stress fiber formation was observed by F-actin staining with Phalloidin. Phosphorylation status of FAK at Tyr⁵⁷⁶ (D), Akt at Ser⁴⁷³ (C), and MMP-9 expression (D) were examined by Western blot analysis and these graph showed the relative protein expression levels. Densitometry of each proteins were normalized to β-actin or dephosphorylated proteins. In all experiments, 50 nM miRIDIAN hairpin miRNA inhibitors were transfected in 5637 cells. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. *p<0.05.

更に Gelatin Zymography によりそのプロテアーゼ活性を評価したところ, タンパク質発現量と相関した結果を得た (Fig.6 B). 興味深いことに miR-130 family 阻害は MMP-2 活性

には影響しておらず、RT-PCR においても MMP-2 発現量には影響していなかった (Fig.6 A). MMP-2/9 のうち MMP-9 のプロモーター領域にのみ結合する転写因子は 5 種類存在するが、このうち PI3K/Akt シグナルの下流に存在するのは NF- κ B である⁵⁵. miR-130 family 標的候補遺伝子のうち MMP の Active form への Cleavage を抑制できる因子として TIMP2 が知られているが、これは MMP-2 特異的である⁵⁶ことから、FAK-Akt-axis 制御下で転写活性化されているものと推測される。

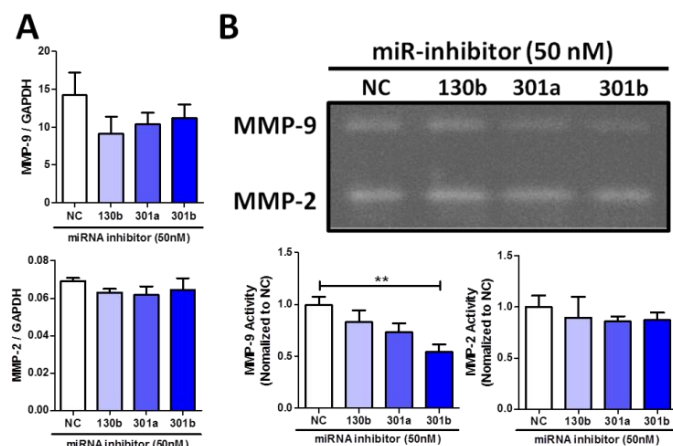


Figure. 6 The miR-130 family suppresses mRNA expression and protease activity of MMP-9 (A) Expression of MMP2 and MMP9 in the miR-130 family inhibitor-transfected 5637 cells was examined by RT-PCR. (B) Gelatin zymography was performed using the supernatants of the miR-130 family inhibitor transfected 5637 cells. Data are mean \pm S.D. of three independent experiments. **p<0.01.

第 5 節 miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞株の樹立

miRNA 阻害剤は標的とする miRNA のみならず、配列相同性の高い他種の miRNA に対しても非特異的な阻害活性を発揮することが知られている。ホモロジーが高い miRNA-family は必然的にこの影響を受けやすく、miR-130 family においても非特異的な作用が懸念される。この可能性を排除するためには miR-130 family の過剰発現実験を行い、機能阻害実験と逆の表現型を観察する必要がある。そこで miR-130 family の発現量が低い膀胱癌細胞株である UM-UC-2 細胞 (Fig.3 A)を用いて、安定高発現細胞株の樹立を行った (Fig.7). 内在性 miR-130 family 分子の発現量が若干高いために、miR-301a 高発現細胞株に関しては 4 倍程度の発現上昇にとどまったが、いずれの miRNA に対しても高発現細胞を樹立することができた。

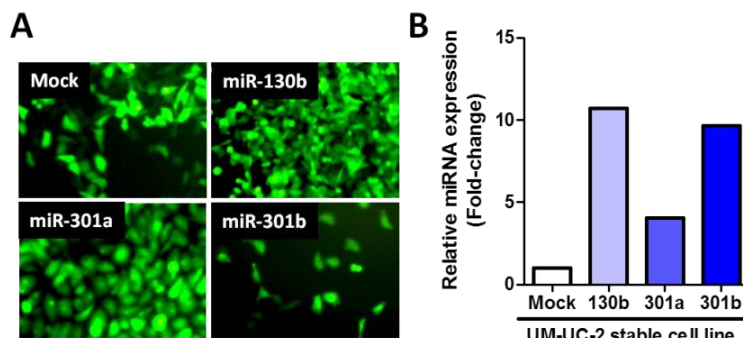


Figure. 7 Establishment of the miR-130 family-stably expressing UM-UC-2 cells Each pmrZsGreen1 miRNA expression vector was transfected into UM-UC-2 cells. Representative images of ZsGreen1 positive colonies were showed in (A). (B) Relative miR-130 family expression in established UM-UC-2 stable cell lines. The expression levels of each miRNA were determined with RT-PCR by a $\Delta\Delta$ CT method, and compared with a mock-transfected cell line.

第6節 miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞株の表現型解析

樹立された細胞株を用いて miRNA 阻害剤処理と同様に表現型解析を実施した結果、細胞増殖能 (Fig.8 A)には影響せず、細胞浸潤能 (Fig.8 B)並びに細胞遊走能 (Fig.8 C, D)の亢進が観察された。ゲノムへのベクター挿入位置に起因する表現型である可能性を排除するために、別クローンを用いた解析も行ったが、細胞増殖能には影響せずに細胞遊走能を上昇させるという結果が得られた (Data not shown)。阻害剤の結果も考慮すると、

miR-130 family は確かに膀胱癌細胞の運動亢進に寄与すると考えられる。

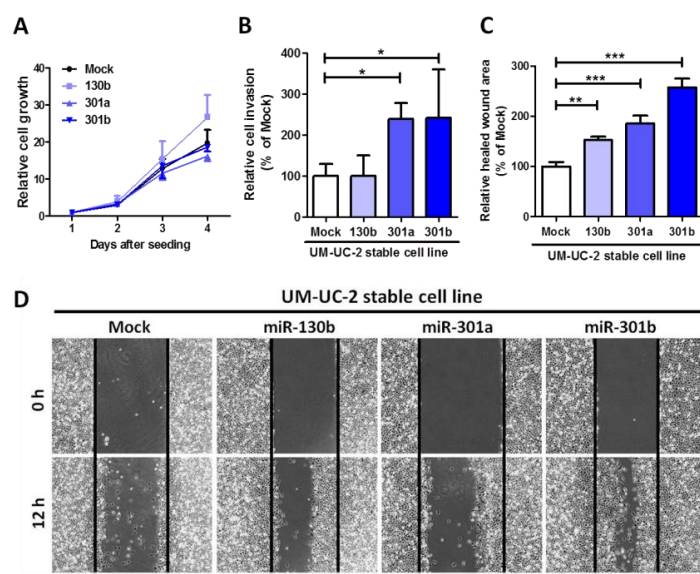


Figure. 8 Stable expression of the miR-130 family promotes UM-UC-2 cell invasion and migration. (A) Relative cell growth was measured by WST-1 assay. (B) The cell invasiveness was examined by BD BioCoat™ Tumor Cell Invasion Systems. (C, D) Relative cell migration was examined by a wound healing assay. Data are mean \pm S.D. of quadruplicated (A) or triplicated (C) or quintuplicated (D) experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

同様にストレスファイバー形成に関しても形成促進が認められ (Fig.9 A Normal), その傾向は細胞遊走先端でより顕著であった (Fig.9 A leading edge). FAK 以下のシグナル伝達経路に関しても同様に解析したところ、機能阻害実験とは逆にリン酸化レベルあるいは発現量が亢進する傾向が観察された (Fig.9 A-D)。

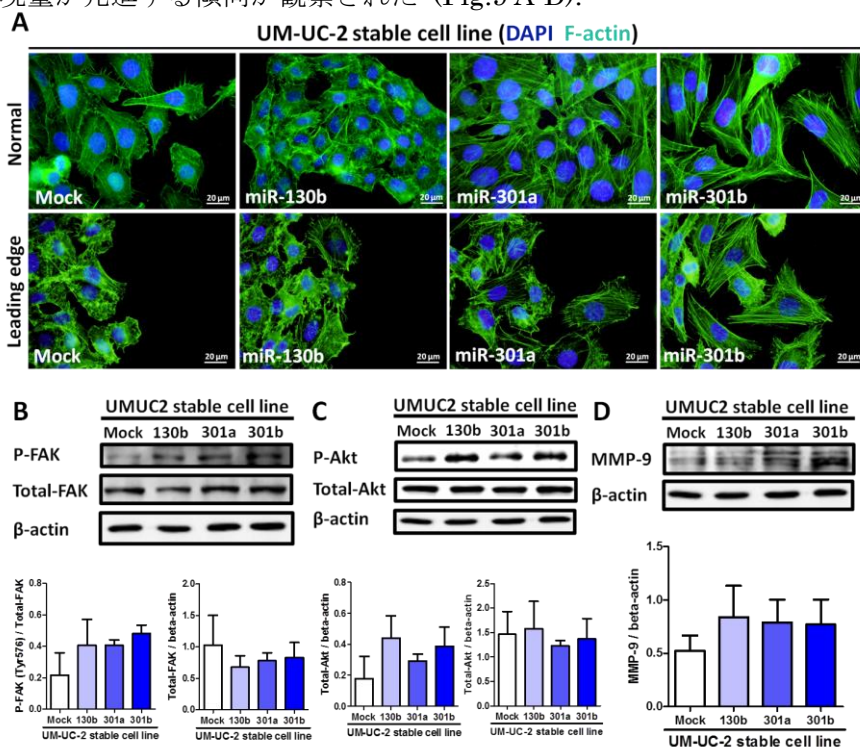


Figure. 9 Stress fiber formation, phosphorylation status of FAK and Akt, and MMP-9 expression in the UM-UC-2 cells stably expressing the miR-130 family. (A) Stress fiber formation was observed by F-actin staining with phalloidin. Phosphorylation status of FAK at Tyr⁵⁷⁶ (B) and Akt at Ser⁴⁷³ (C), and the protein expression of MMP-9 (D) were examined by western blot analysis and these graph showed the relative protein expression levels. Densitometry of each protein were normalized to β -actin or dephosphorylated proteins. Data are mean \pm S.D. of triplicated experiments.

第7節 小括

個々のmiRNA間で表現型の強弱は存在するが、本章の結果からmiR-130 familyのいずれもが膀胱癌細胞の運動性亢進に寄与していることが解明された。miR-130bの機能阻害ではストレスファイバー形成やFAKのリン酸化に対する抑制作用を示さず、miR-130b過剰発現UM-UC-2細胞においても他のmiRNA種と比較して表現型は微弱であった。機能阻害実験に関しては、使用した5637細胞の内在性miR-130b発現量が低いことに起因すると推測される。またmiR-130b過剰発現UM-UC-2細胞においては、miR-130bがtumor suppressorとして機能した可能性が考えられる。本章第2節の冒頭並びにTable. 1でmiR-130bのtumor suppressorとしての側面について言及したが、miR-130bは膵臓癌でSTAT3²⁴、卵巣癌でZEB1⁵⁷、更に骨肉腫、グリオーマ、結腸直腸癌でPPAR α をそれぞれ標的としている⁵⁸⁻⁶⁰。これらの標的遺伝子はいずれも膀胱癌ではoncogeneとして機能している。特にPPAR α は特定のサブクラスの浸潤性膀胱癌で高発現して悪性化に寄与するのみならず、PPAR α 作動薬であるピオクリダゾンによる膀胱癌発症リスクも指摘されている^{6,61,62}。癌抑制遺伝子のみならず癌遺伝子も標的とすることで、miR-130bのoncogenicな機能が減弱してしまった可能性が考えられる。しかしながらmiR-130bが膀胱癌細胞の運動性亢進に寄与することは明確であり、治療標的として適切なmiRNAの一つだと考える。

第1章の発現解析において、miR-130 familyの発現量は膀胱癌の浸潤度あるいは異形度に相関していた。この結果からmiR-130 familyの阻害剤が膀胱癌細胞の筋層浸潤の予防に有効である可能性を認めたが、実際にmiR-130 familyが膀胱癌細胞の運動性を調節できるという結果はその仮説を裏付けるものであると考える。

第3章 膀胱癌における miR-130 family の標的遺伝子探索

第1節 実験材料・実験方法

Plasmid作製

第2章と同様の手法で行った. ヒトPTENのクローニングには正常様膀胱細胞株であるSV-HUC-1細胞のcDNAを使用した.

Plasmid Vector

pcDNA3.0 empty vector

Primer

Target gene	Sequence
PTEN WT1	Sense 5'-CTAGCGGCCGCTAGTTGGTTTCACATCCTACCCCTTTGCACTTG-3'
	Antisense 5'-TCGACAAGTGCAAAGGGGTAGGATGTGAACCACTAGCGGCCGCTAGAGCT-3'
PTEN Mut1	Sense 5'-CTAGCGGCCGCTAGTTGGAACGTGACGATCCCCTAACGTGACG-3'
	Antisense 5'-TCGACGTCACGTTAGGGGATCGTACAGTTCCAACCTAGCGGCCGCTAGAGCT-3'
PTEN WT2	Sense 5'-CTAGCGGCCGCTAGTGACATTATAATGGGCTTTTGCACTGG-3'
	Antisense 5'-TCGACCAGTGCAAAGCCATTATAATGTCAGTACGCGGCCGCTAGAGCT-3'
PTEN Mut2	Sense 5'-CTAGCGGCCGCTAGTGACAATTTTTAGGGGATAACGTGACG-3'
	Antisense 5'-TCGACGTCACGTTATCCCCTAAAAATTGTCAGTACGCGGCCGCTAGAGCT-3'
PTPN11 WT	Sense 5'-TTGTGAGCTCTATTTTGCAGATTATGGGGA-3'
	Antisense 5'-TTGTGTCGACCATTTGGCGACCAAAAACAC-3'
PTPN11 Mut	Sense 5'-TTGTGTCGACCATTTGGCGACCAAAAACAC-3'
	Antisense 5'-GACTCTTTAATGCCTCACGTTAGGTCAACT-3'
Human PTEN	Sense 5'-ATGGATCCATGACAGCCATCATCAAAGAGAT-3'
	Antisense 5'-GCGAATTCTCAGACTTTTGTAATTTGTGTATGC-3'

トランスフェクション (Plasmid DNA)

5637 細胞に plasmid DNA をトランスフェクションするには Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いてフォワード法で導入した. 12 well plate の場合 6.0×10^4 個の細胞を播種し, 24 時間後に血清未添加の RPMI-1640 液体培地 800 μ L に交換した. 血清未添加の RPMI-1640 液体培地 200 μ L 中で終濃度 1 μ g の plasmid DNA と Lipofectamine 2000 2.0 μ L を予め 15 分間反応させた. このトランスフェクタントを well に添加し, CO₂ インキュベーター内にて 4 時間培養した後, 10% FCS 添加 RPMI-1640 培地に交換し, さらに 44 時間経過後に実験に使用した. 12 well plate 以外の well plate 若しくは dish で実験を行う際には 12 well plate の底面積を参考に各試薬の使用量を比率で求め使用した.

Dual-luciferase reporter assay, Wound healing assay, 細胞免疫染色

第2章と同様の手法で行った. またPTPN11/SHP-2の3'-UTRのクローニングには, 機能阻害実験にも使用した細胞株である5637細胞のcDNAを用いた.

Argonaute2 Immunoprecipitation (Ago2-IP)

1×10⁷個以上のmiR-301b高発現UM-UC-2細胞を用意し, RIP Assay for microRNA kit (MBL)の添付プロトコールに従いAgo2免疫沈降を行った. UM-UC-2細胞におけるAgo2免疫沈降は小スケールの実験で確認した (Fig.13A). 細胞回収の前日にProtein G sepharose (GE healthcare) 50 µLとAnti-EIF2C2 (AGO2) (Human) mAb(MBL)あるいはIsotype control IgGを20 µLずつ, 1× Protease inhibitor cocktail (ナカライテスク), 1.5 mM DTT (Wako), 40 U/mL RNase OUT™ (Invitrogen)存在下のRIPA buffer (Invitrogen)中で混合し, 4℃でovernightローテート反応させることで抗体吸着ビーズを作製した. 翌日に細胞回収を行いソニケーター (UD-100, TOMY社製: Level 70 / 1秒間 × 4回を1セットとし, 氷冷を挟んで計2回実施)で破碎した. ライセート作製時のRIPA bufferには抗体ビーズ作製時よりも高濃度の200 U/mLのRNase OUT™を添加した. ライセートを抗体未吸着のProtein G sepharoseで4℃/1時間ローテートすることでプレクリアし, 上清を回収した. 回収した上清に抗体吸着ビーズを混合し, 4℃/3時間ローテートさせることでビーズ-抗原複合体を形成させた. Wash後に沈殿したビーズを回収し, これにQIAzolを700 µL添加した. これ以降は第1章の第1節に記載した方法に準拠し, miRNeasy mini kitによりビーズ-抗原複合体より沈降してきたmRNAを回収した. mRNA回収のみRIP Assay for microRNA kitではなくmiRNeasy mini kitのプロトコールで行う手法はUchino *et al* の論文を参考にした⁶³.

Gene array解析

前述の方法で抽出した total RNA の純度を BioRad EXPERION により確認した後, Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems) により回収した RNA 全量(Mock 100 ng, miR-301b 54 ng)を用いて cDNA 合成を行った. 得られた cDNA 5.5 µg を GeneChip WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix)により断片化, ビオチン化した. ビオチン化された cDNA をもとに Hybridization Cocktail を作成後, GeneChip Human 1.0 ST Array (Affymetrix)に注入し, 45℃/60 rpm で 17 時間 hybridization を行った. その後, Fluidics Station (Affymetrix)を使用して GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit (Affymetrix)により array の自動洗浄・染色を行い, GeneChip Scanner 3000 によりスキャンし, データを取得した.

miR-130 family標的候補遺伝子の抽出

Gene arrayの結果をmiR-301b VS Mockとで比較し変動遺伝子数をFold-changeごとに算出した. するとFold-changeが1.3以上の遺伝子群において急激にその数が低下したため (Fig.13 B), この遺伝子セットを用いてGO解析や標的遺伝子の抽出を実施した. GO解析にはDAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)を使用した. 候補遺伝子の選定についてはmiRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>)・miRorg (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)のmiR-130 family標的候補遺伝子の上位200位, miRWALK (<http://www.umm.uni-heidelberg>

rg.de/apps/zmf/mirwalk/)のmiR-130 family標的候補遺伝子・文献調査により個別に注目していた遺伝子を、それぞれGene array結果から抽出した。

PTEN細胞内局在の観察

UM-UC-2細胞をPTEN抗体により免疫染色を行い、視野中の細胞のうち膜周辺にPTENがリング状に局在している細胞数をカウントした。合計3視野カウントし、視野中のPTEN膜局在細胞の割合を算出した。

膀胱癌臨床検体の免疫組織化学

パラフィン包埋された膀胱癌臨床検体から回転式マイクロームを用いて5 μ mの薄層切片を切り出し、スライドグラスにマウントした。スライドグラスを68°Cオーブンで10 分間処理した後、キシレンに5分間2回浸し、エタノール (100% 2回→95%→80%→70%→50%), 蒸留水, 蒸留水 + Tween 20 (0.0375%)の順に浸して脱パラフィン処理を行った。次に抗原賦活液 (三菱化学メディエンス社製 インスタント抗原賦活化液H 中性)を入れたウォーターバスを用いて10分間オートクレーブ処理を行い、抗原の賦活化を行った。このスライドグラスに5分間、3%過酸化水素水进行处理することでブロッキングを行った。1次抗体は4°C/overnight処理し、TBS-Tで洗浄後に2次抗体を室温45分間処理した。これをDAB発色試薬 (Dako)で処理した後、Gill Hematoxilinでカウンターステインを行った。水道水でスライドグラスを洗浄後、蒸留水, エタノール(70%→80%→95%→100% ×2回), キシレン×2回の順番に浸し、封入剤を滴下してカバーグラスを載せてプレパラートを作製した。

第2節 PTENのmiR-130 family標的遺伝子としての評価

これまでの解析から, miR-130 family は膀胱癌において FAK や PI3K/Akt シグナル伝達経路を調節していることが解明されたので, この知見を基盤に miR-130 family の標的遺伝子を探索した. miRorg や miRDB といった標的予測アルゴリズムを利用し, 候補遺伝子として PTEN (phosphatase and tensin homolog) に注目した. PTEN は PI3K/Akt シグナル伝達経路の抑制因子で, 極めて有名な癌抑制遺伝子である^{27, 28}. また脂質のみならずタンパク質にもホスファターゼ活性を示し, FAK の Tyr 残基も基質とすると報告されていることから⁶⁶, ここまでで示されている表現型を制御できる. PTEN の 3'-UTR には 2 か所の miR-130 family 結合領域が存在するが, それぞれに対するレポーターコンストラクトを作製し (Fig.10 A), miR-130 family 高発現 UM-UC-2 細胞において Dual-luciferase reporter assay を行った結果, miR-130b 高発現細胞において Luciferase 活性の低下を認めた (Fig.10 B).

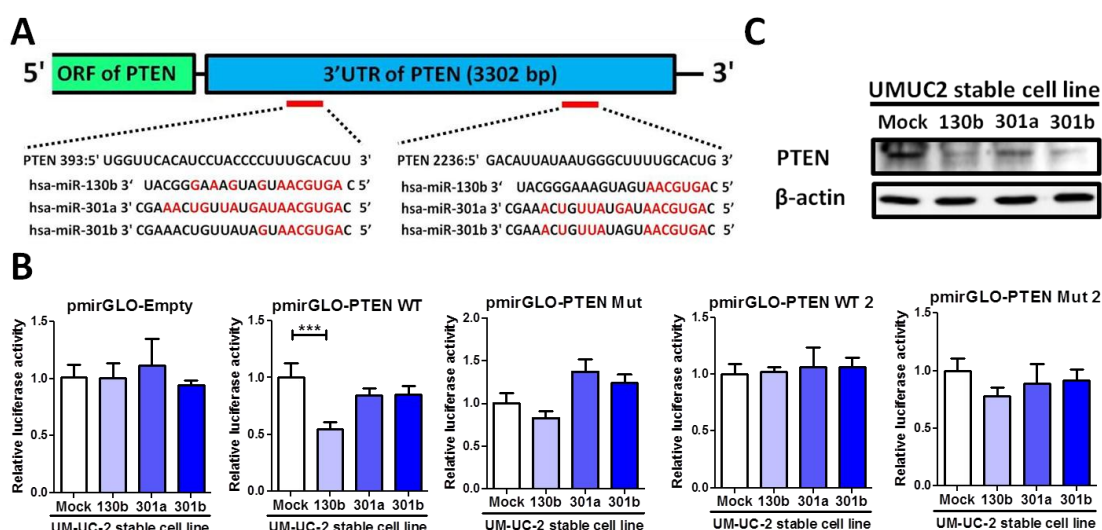


Figure. 10 Target gene validation of the miR-130 family and functional analysis of PTEN in 5637 cells. (A) Schematic model of 3'-UTR of *PTEN* gene. (B) A dual luciferase reporter assay was performed with UM-UC-2 cells stably expressing the miR-130 family. The cells were transfected with a reporter plasmid containing predicted miR-130 family binding site in the *PTEN* 3'-UTR. (C) Western blot analysis of PTEN in UM-UC-2 cells stably expressing the miR-130 family. Data are mean \pm S.D. of five independent experiments. ***p<0.001.

一方でタンパク質レベルにおいてはmiR-301a, miR-301b高発現細胞においても発現低下が認められたため (Fig.10 C), これらのmiRNAに関しては間接的にPTENを下方制御していると推測される. PTENは細胞膜直下に局在することでその安定性並びに活性が向上するが^{27, 30}, これはPIP3やインテグリンと共に接着複合体を形成したFAKなどの基質が, 細胞膜付近に局在するためである. そこでmiR-301a, miR-301bはこの膜局在調節を介してPTENタンパク質量並びにホスファターゼ活性を抑制している可能性を検証した. miR-130 family高発現UM-UC-2細胞に対してPTEN免疫細胞染色を行うと, 細胞膜周辺にPTENが

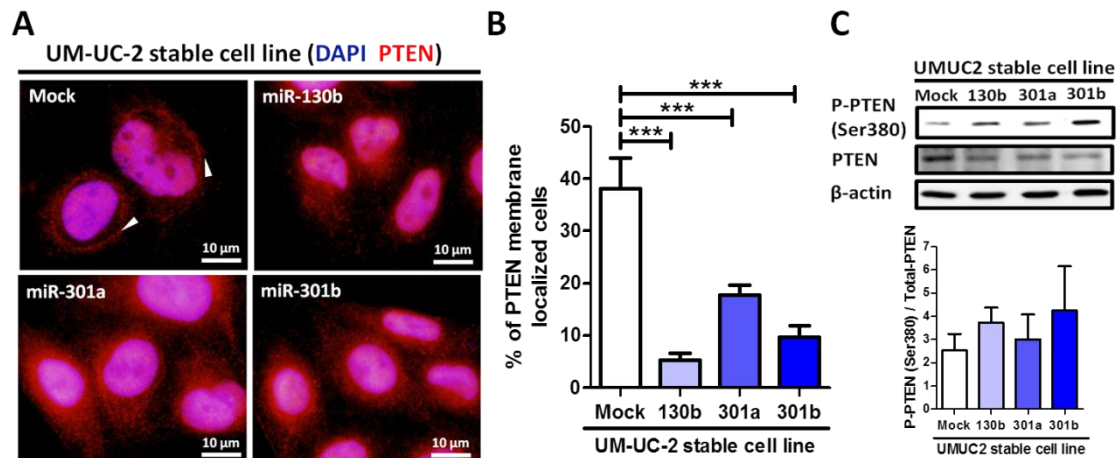


Figure. 11 The miR-130 family regulates PTEN localization via its phosphorylation. (A) UM-UC-2 cells stably expressing the miR-130 family were stained with anti-PTEN antibody and DAPI (Nucleus). (B) Representative images of subcellular localization of PTEN in miR-130 family stably expressing UM-UC-2 cells. Localization of PTEN on cell membrane is indicated by arrowhead. The number of cells in which cell membrane localization of PTEN was detectable were counted and are shown as mean \pm S.D. of triplicate experiments (>34 cells/view). *** $p < 0.001$. (C) The cell lysates were immunoblotted with anti-PTEN and anti-Ser³⁸⁰ antibodies, and relative expression of phosphorylated PTEN (P-PTEN) is shown as mean \pm S.D. of three independent experiments.

局在する細胞が減少していた (Fig.11 A, B). PTEN膜局在メカニズムの一つとしてC末端領域のリン酸化が知られており, 同領域のリン酸化によってPTENのコンホメーションが変化すると膜局在が阻害される⁶⁷. C末端リン酸化部位の一つであるPTEN Ser³⁸⁰について検討した結果, PTENの膜局在低下と逆相関する形で, PTENのリン酸化が亢進する傾向を認めた (Fig.11 C). 以上の結果からmiR-130 familyは直接の翻訳阻害のほかにリン酸化を介した間接的な制御機構によりPTENタンパク質量並びにホスファターゼ活性を抑制していると考えられる. またmiR-130 familyを高発現する5637細胞に対してPTENを過剰発現させたところ, Akt Ser⁴⁷³リン酸化 (Fig.12 A)と細胞遊走能の抑制が確認された (Fig.12 B). この時にPTEN免疫染色を行うと確かにPTENの膜局在も上昇していたので, PTENの膜局在は膀胱癌細胞の細胞運動性抑制に寄与すると考えられる. 一連の結果から, PTENは膀胱癌におけるmiR-130 familyの重要な下流遺伝子だと推測される.

一方でPTENを過剰発現させてもFAKのTyr⁵⁷⁶リン酸化には影響を与えなかった (Fig.12 A). FAKの主要なTyrリン酸化部位はTyr407/576/577/871/925が知られているが, これらはいずれもSrcによってリン酸化修飾を受ける^{68,69}. しかし他の癌と異なり浸潤性膀胱癌においてはSrcの活性が低く⁶, 実際にmiR-130 family高発現UM-UC-2細胞においてもSrcのTyr⁴¹⁶リン酸化は検出されなかった (Data not shown). キナーゼの活性化でないとするとホスファターゼの機能阻害が原因として推測されるため, PTENが関与している可能性は依然として高い. PTENがFAKを基質とすることは抗リン酸化Tyr抗体を用いた解析で明らかとなったため, 標的とするアミノ酸残基の同定までには至っていない⁶⁶. 以上の結果を踏まえると, FAKのTyr⁵⁷⁶以外のリン酸化部位が標的となっている可能性は大いに考えられる.

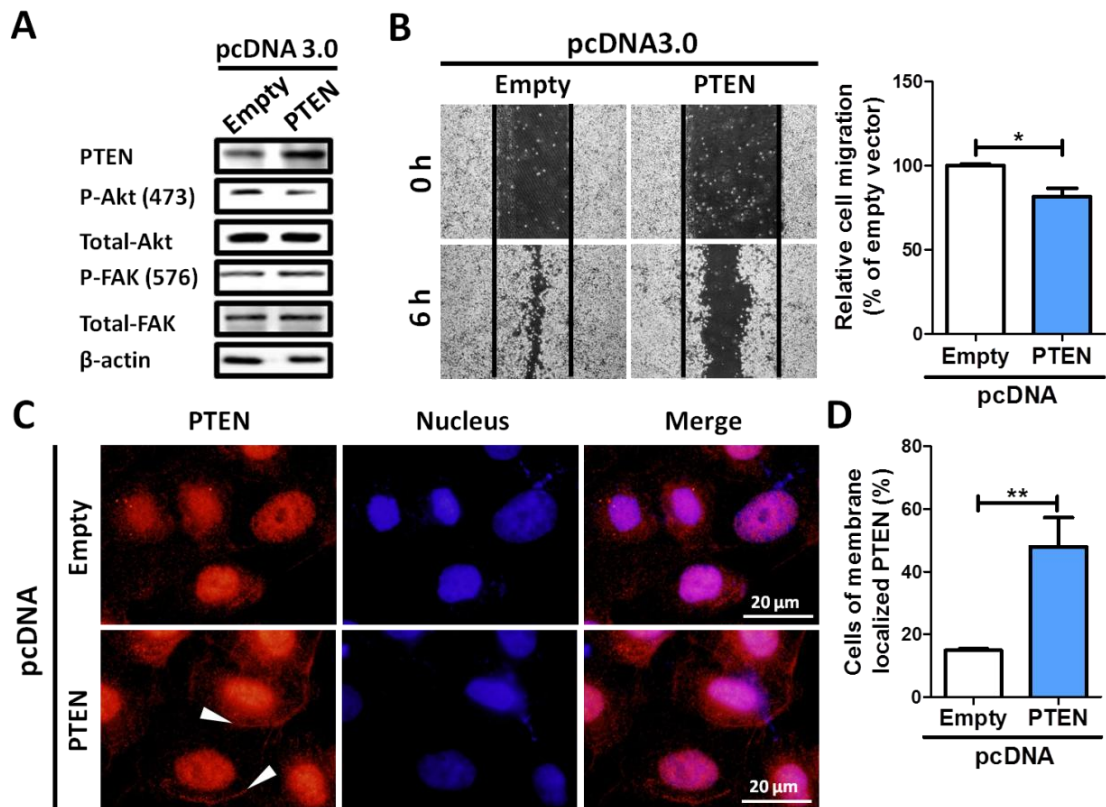


Figure. 12 Transient expression of PTEN suppresses 5637 cell migration.

One μ g pcDNA 3.0 (Empty) or pcDNA 3.0-PTEN (PTEN) vectors were transfected into 5637 cells. The following experiments were performed 72 h after transfection: (A) Western blot analysis of PTEN, Akt, FAK and their phosphorylated forms using lysates of the transfected 5637 cells. (B) A wound healing assay was performed and relative cell migration was shown as mean \pm S.D. of triplicate experiments. * $p < 0.05$. (C) Representative images of cell membrane localization of PTEN in transfected 5637 cells. The cells were stained with anti-PTEN antibody (PTEN) and 4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Nucleus). (D) The number of cells in which cell membrane localization of PTEN was detectable (indicated by arrowheads in (C)), was counted. Data are mean \pm S.D. of triplicate experiments (> 27 cells/view). ** $p < 0.01$.

第3節 PTPN11/SHP-2のmiR-130 family標的遺伝子としての評価

第1節で PTEN が miR-130b の標的遺伝子であることが解明されたが、個別の遺伝子に焦点を当てた解析では miR-301a, miR-301b の標的遺伝子は特定することができなかった。個々の miRNA が有する膨大な標的遺伝子群にアプローチするために、網羅的解析手法を駆使して新たな標的遺伝子の探索を試みた。miRNA は Argonaute2 を含むタンパク質と共に RNA-induced silencing complex (RISC) を形成して機能するため⁷⁰, Ago2 抗体を用いた免疫沈降によって miRNA が標的とする mRNA を包括的に精製することが可能である⁶³。本研究においては臨床検体で最も高い発現量を示し、また顕著な表現型を示している miR-301b 高発現細胞を使用して Ago2 免疫沈降を行い、精製した mRNA に対して Gene array 解析を行った。解析結果を用いて GO 解析を行うと、Actin や Cytoskeleton といった細胞骨格関連の Term が上位にピックアップされ、確かに miR-301b の制御下に骨格再編成

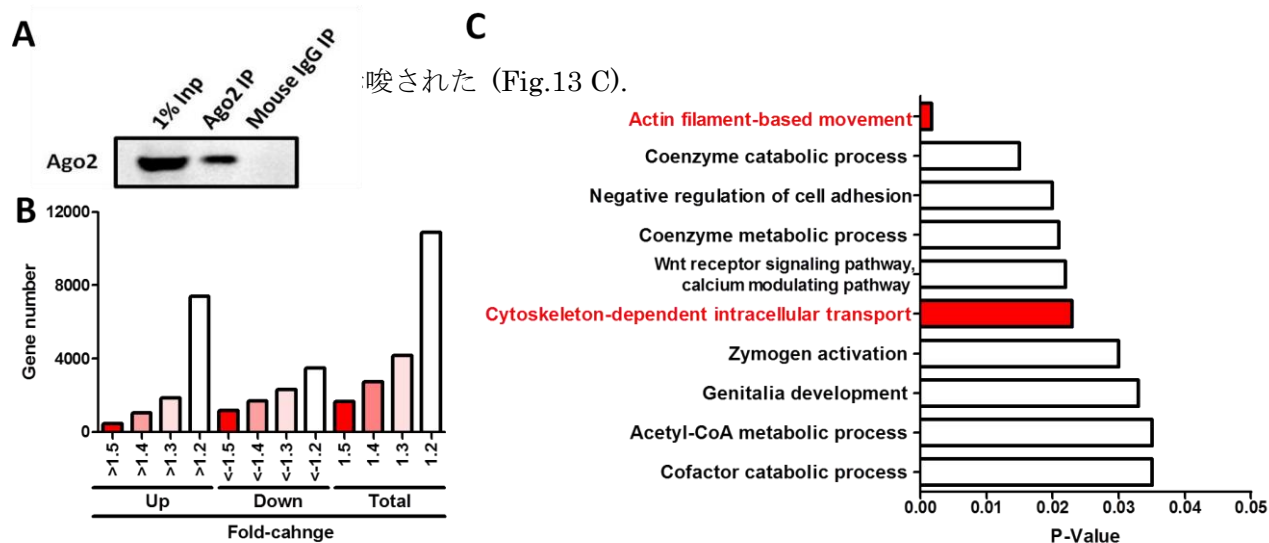


Figure. 13 Argonote2 immunoprecipitation (Ago2 IP)-Genearray analysis
 (A) Quality check of immunoprecipitated endogenous Ago2 in UM-UC-2 cells. (B) Gene array data were classified based on fold-change. (C) GO term analysis of genes with changed expression in miR-301b-overexpressing UM-UC-2 cells.

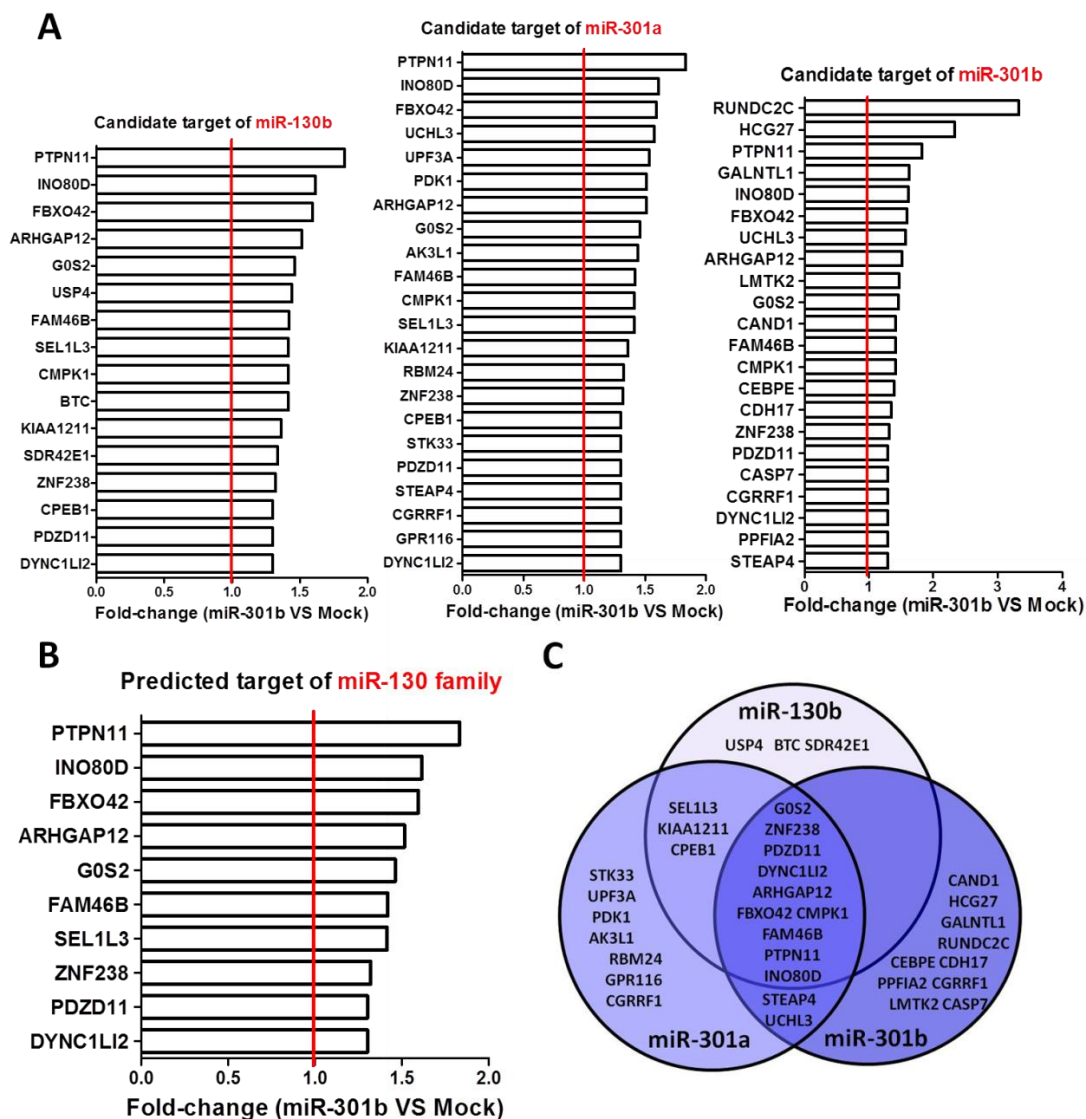


Figure. 14 The predicted target genes of miR-130 family in UM-UC-2 cells
 The fold-change of predicted target genes of each miR-130 family member (A) or miR-130 family (B). (C) These potential target genes were summarized in venn diagram.

GO 解析に用いた Gene array 結果から各種標的予測アルゴリズム、並びに文献調査により個別に注目していた遺伝子を用いて miR-130 family の予測標的を抽出した (Fig.14). その結果 35 種類の候補遺伝子群が抽出され、このうち miR-130 family に共通の標的遺伝子の中で細胞骨格を制御できる遺伝子は ARHGAP12 と PTPN11/SHP-2 であった. ARHGAP12 は Rac1 指向性の GAP (GTPase Activating Protein)であるが⁷¹, 同遺伝子の 3'-UTR を用いて miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞において Dual-luciferase reporter assay を行っても, miR-130 family による翻訳阻害は観察されなかった(Data not shown). 他方 PTPN11/SHP-2 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11)は癌遺伝子/癌抑制遺伝子のいずれとしても機能できる二面性のある遺伝子であり⁷², FAK に対してホスファターゼ活性を示すことも知られている⁷³. 以上の理由から同遺伝子に対してもレポーターコンストラクトを作製して Dual-luciferase reporter assay (Fig.15 A, B), 並びにウェスタンブロット解析 (Fig.15 C)を行うと, PTPN11/SHP-2 は miR-130b 及び miR-301b の標的遺伝子であることが明らかとなった.

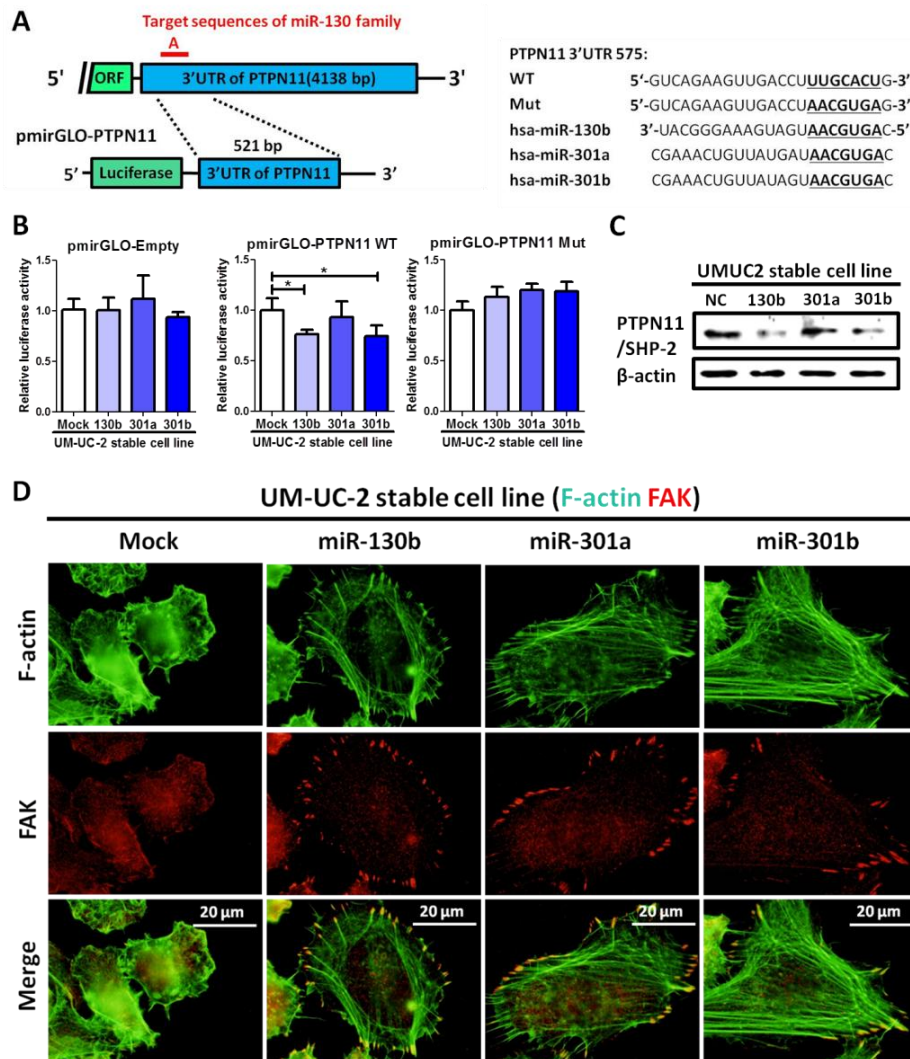


Figure. 15 PTPN11/SHP-2 is a direct target gene of miR-130b and miR-301b (A) Schematic model of 3'-UTR of *PTPN11* gene. (B) A dual luciferase reporter assay was performed with UM-UC-2 cells stably expressing the miR-130 family. The cells were transfected with a reporter plasmid containing a predicted miR-130 family binding site in the *PTPN11* 3'-UTR. (C) Western blot analysis of SHP-2 in UM-UC-2 cells stably expressing miR-130 family. (D) Focal adhesion formation was observed by FAK staining at leading edge of cell migration. Data are mean \pm S.D. of five independent experiments. * $p < 0.05$.

PTPN11/SHP-2 はその機能障害変異体の導入によりストレスファイバーの形成並びに接着斑形成の促進が報告されているが⁷⁴, miR-130 family 高発現 UM-UC-2 細胞においても細胞遊走時に接着斑の形成促進が認められた (Fig.15 D). 以上の結果から膀胱癌においても miR-130 family の制御下で細胞骨格再編成に寄与している可能性が示唆された.

第4節 膀胱癌臨床検体における PTEN と PTPN11/SHP-2 の免疫組織化学

ここまでの *in vitro* 機能解析結果が臨床的に意義のあるものか判断するために, 膀胱癌臨床検体を用いて PTEN 並びに PTPN11/SHP-2 の免疫組織化学を行った. 12 例の膀胱癌臨床検体の miR-130 family 発現量を RT-PCR により測定し, 高低 3 例ずつを選出した (Fig. 16 A, B). 免疫染色の結果, 両因子共に miR-130 family 低発現群で茶色に染色されたタンパク質が観察でき, 逆に高発現検体ではその染色像が減弱していた. 両タンパク質共に miR-130 family 発現量が最も低い Patient①ではその傾向は特に顕著であり (Fig. 16 C), 臨床レベルにおいても *in vitro* 機能解析の結果を支持する結果となった.

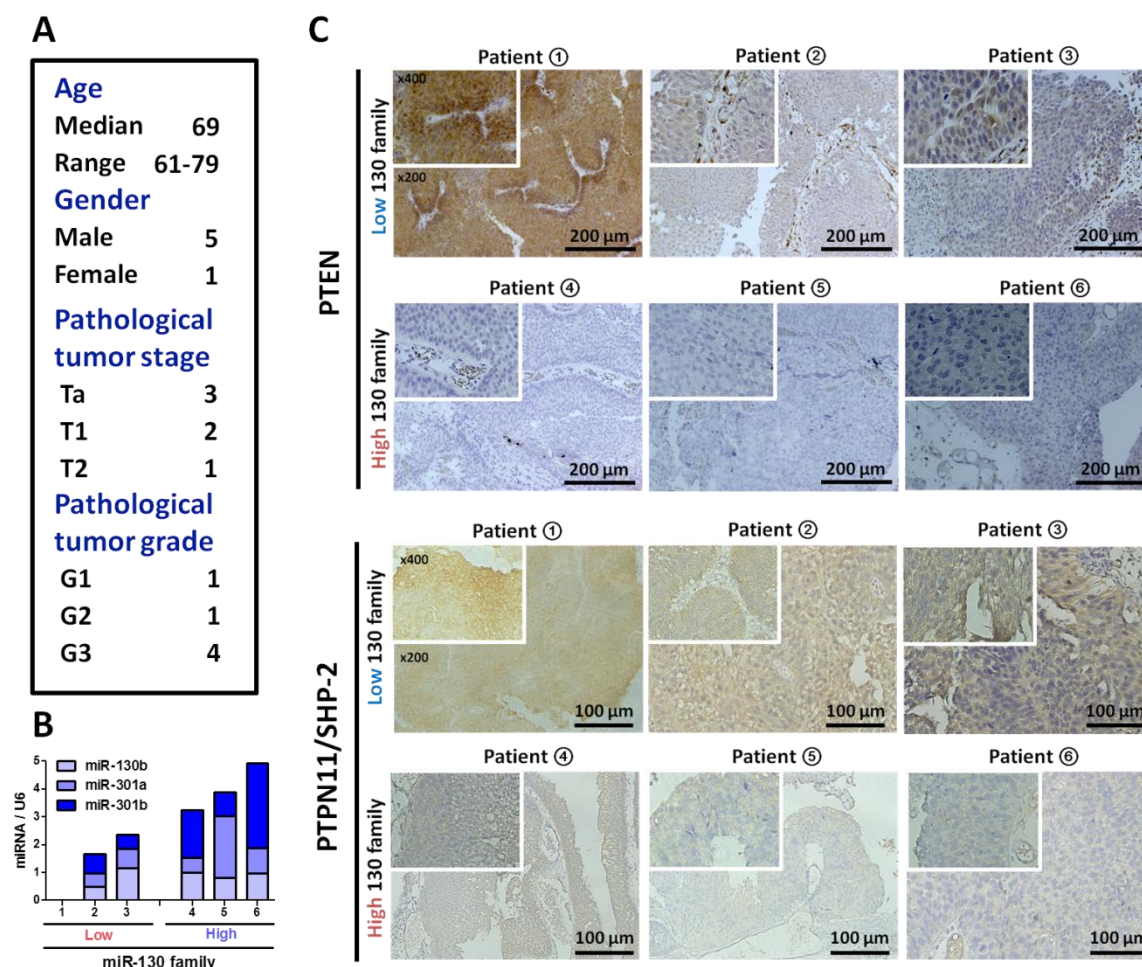


Figure. 16 Immunohistochemistry of PTEN and PTPN11/SHP-2 in bladder cancer clinical samples.

(A) Clinical information of bladder cancer specimens for immunohistochemistry. mRNA expression of miR-130 family determined by RT-PCR (B) and the protein expression of PTEN or PTPN11/SHP-2 determined by immunohistochemical staining (C) in bladder cancer clinical samples are shown.

第5節 小括

本章では膀胱癌における miR-130 family の標的遺伝子を探索し、PTEN と PTPN11/SHP-2 という 2 つのホスファターゼを同定するに至った。興味深いことに、これらのホスファターゼは協調的に機能しているという報告もいくつか存在する。例えば前立腺特異的 PTEN ノックアウトマウスにおいては PTPN11 発現低下が観察されており、前立腺癌症例においても、PTEN と PTPN11/SHP-2 両方の低発現症例は高発現症例と比較して予後不良であることが示されている。これは PTEN/PTPN11 発現低下によって誘導された SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) に起因すると考えられている⁷⁵。他にも骨肉腫細胞株においてこれらのホスファターゼが Rb/E2F 依存的なアポトーシスを促進することも報告されており⁷⁶、miR-130 family が PTEN と PTPN11/SHP-2 を同時に標的とすることは、膀胱癌進展においても何らかの生理学的意義を持つことが推測される。

第2節において miR-130 family が PTEN のリン酸化を介して膜局在を調節するという結果を得たが、PTEN の Ser³⁸⁰ を標的とするリン酸化酵素は PICT-1 と ROCK1/2 であることが報告されている⁶⁴。このうち ROCK1/2 は RhoA により活性化されるが、PTPN11/SHP-2 は RhoA を抑制できることが示されている⁷⁷。つまり miR-130 family が PTPN11/SHP-2 の翻訳阻害を介して ROCK1/2 を活性化し、PTEN の Ser³⁸⁰ リン酸化が亢進したと推測される。実際に、miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞における PTEN のリン酸化亢進と膜局在性の低下は miR-130b と miR-301b とで特に顕著であり (Fig. 11)、これらは PTPN11/SHP-2 を直接翻訳阻害する miRNA である。先述した知見のように、膀胱癌においても PTEN と PTPN11/SHP-2 が協調的に機能することで、膀胱癌悪性化に寄与している可能性は高い。

第4章 miR-130 family の seed-targeting LNA 創製と機能解析

ここまでの解析から, miR-130 family を構成する miRNA いずれもが oncomiR として機能することが示された. 従って膀胱癌の新規治療標的として適切な分子であると考えられるが, 臨床応用にはそれぞれの miR-130 family 分子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド3種類の併用が必要である. このため投与量の増加とそれに伴う副作用が懸念され, 医療経済の観点からも薬価の上昇はデメリットとなる. そこで miR-130 family が共通した配列を有するという特徴を利用し, miR-130 family を単独の核酸分子で同時に阻害できないかとの着想に至った. ヒトで保存されている miRNA-family の約半数が2種以上の miRNA から構成されており²⁰, その seed 配列を標的とすることで機能的に重複している miRNA 群を同時に阻害できる可能性は, 以前から指摘されていた. このコンセプトは Kauppinen らによって最初に立証され⁷⁸, miRNA の seed 配列に相補的な 7-8 塩基長の LNA (Locked Nucleic Acid)を用いて miR-221/222, let-7 family の包括的抑制を達成している. このような "seed-targeting LNA" の有効性は miR-34¹⁹, miR-15⁷⁹, miR-33⁸⁰ といった他の miRNA-family においても示されており, 単独の阻害剤よりも高い薬効を示している. 以上の知見から miR-130 family に対しても seed-targeting LNA を作製し, 膀胱癌細胞に対する新規核酸医薬品としての可能性を *in vitro* / *in vivo* 両面から評価した.

第1節 実験材料・実験方法

LNA (Locked Nucleic Acid)の合成

使用した Control/miR-130 family seed-targeting LNA は 8-mer すべてが LNA 骨格であり, ホスホジエステル (PO)結合をホスホロチオエート (PS)結合に置換したアンチセンスオリゴヌクレオチドとしてジーンデザインに合成委託した.

Locked Nucleic Acid	Sequence
Control	TCATACTA
miR-130 family seed-targeting LNA	ATTGCACT

Primer

Target gene	Sequence
Human PTEN Sense	5'-CTAGCGGCCGCTAGTTGGTTCACATCCTACCCCTTTGCACTTG-3'
Entire 3'UTR Antisense	5'-TCGACAAGTGCAAAGGGGTAGGATGTGAACCAACTAGCGGCCGCTAGAGCT-3'
hsa-miR-130a-3p	5'-CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT-3'
hsa-miR-454-3p	5'-TAGTGCAATATTGCTTATAGGGT-3'

Plasmid作製, トランスフェクション, Dual-luciferase reporter assay, Wound healing assay, 細胞免疫染色

第2章と同様の手法で行った. LNAは終濃度50 nMでフォワード法で導入した. またPTEN Entire 3'-UTRのクローニングには, 機能阻害実験にも使用した細胞株である5637細胞の cDNAを用いた.

In vivo xenograft model

miR-130 family seed-targeting LNA が機能することが確認されている 5637 細胞を用いて皮下腫瘍を作製した. 5637 細胞 (1×10^7 cells / mouse) を等量の serum free RPMI-1640 に懸濁し, これを Matrigel® Matrix High Concentration (Corning®) と 1:1 となるように混合したものを 8 週齢雌の BALB/c nu-nu マウス 20 匹に対して皮下移植した. 約 1 か月後に腫瘍増大を観察したマウスのから腫瘍体積上位 10 匹のマウスを選別, 平均腫瘍体積が同等になるように 2 つのグループ (n=5) に分類した. LNA の優れた安定性とヌクレアーゼ耐性を考慮し, 投与は週 1 回 (Day 1, 7, 14, 21) 実施した. 投与担体には AteloGene® Local Use (KOKEN) を使用し, 2 nmol / mouse となるように調整した *in vivo* グレードの LNA (HPLC 精製, ジーンデザイン社より購入) を使用した. AteloGene® Local Use : LNA 混合液 200 μ L を 100 μ L ずつ 2 か所から腫瘍周囲にラッピング法により投与した.

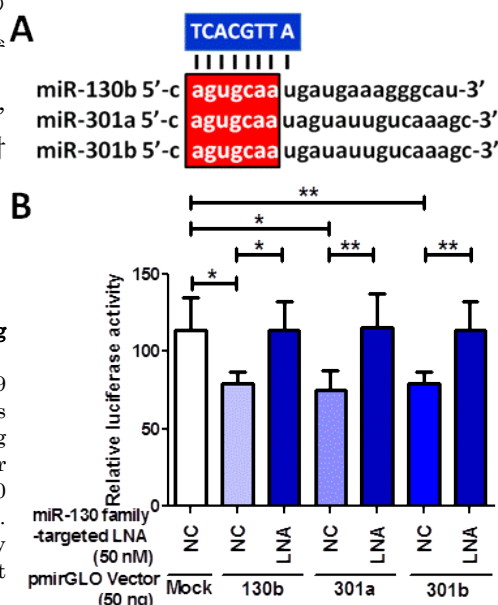
第 2 節 miR-130 family seed-targeting LNA のデザインと作用評価

過去の報告から, seed-targeting LNA のデザインにおいては標的 miRNA の 2-9 塩基目に相補的な配列が, 最も効率的に標的 miRNA を機能阻害することが明らかとなっている^{17, 39}. miRNA は標的 mRNA との完全相補でなくとも翻訳阻害を行うことが可能であるが, seed 配列のみはパーフェクトマッチが要求される. Target scan や miRDB などの標的予測アルゴリズムも, miRNA の seed 配列と標的 mRNA とのパーフェクトマッチを必須条件としている. この条件設定により標的探索の擬陽性が大幅に低下することが知られており¹¹, レポーターアッセイでも seed 配列を含まない LNA は miRNA の阻害効率が著しく低下する⁷⁸. また過去の LNA スクリーニングの報告においても, 最も効率的に miRNA-family を包括的に抑制した領域は miRNA の 2-9 塩基までであったため⁸⁰, 本研究においても miR-130 family の 2-9 塩基に相補的な LNA を設計した (Fig.17 A).

Dual-luciferase reporter assay によってこの LNA が 5637 細胞の内在性 miR-130 family のいずれもを阻害することが確認されたので (Fig.17 B), 第 3 節以降ではこの LNA を用いて膀胱癌細胞に対する機能解析を実施することとした.

Figure. 17 Design and functional verification of seed-targeting LNA in 5637 bladder cancer cells.

(A) Seed-targeting LNA complementary to nucleotides 2-9 containing a common seed region of the miR-130 family was designed. (B) MiR-130 family reporter vectors containing perfectly matched target sites of miR-130b, miR-301a or miR-301b (50 ng) were cotransfected with 50 nM miR-130 family-targeted LNA or negative control LNA into 5637 cells. Luciferase activity was determined using a Dual reporter assay system. Data are mean \pm S.D. of more than three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01.



第3節 miR-130 family seed-targeting LNA の表現型解析

第2章と同様に 5637 細胞における LNA の表現型解析を実施した結果、正常様膀胱細胞株 SV-HUC-1 細胞の細胞増殖能に対しては影響を与えずに (Fig.18 A), 5637 細胞の細胞増殖能 (Fig.18 B), 細胞遊走能 (Fig.18 C), 細胞浸潤能 (Fig.18 D)をいずれも顕著に抑制した. 特に単独阻害剤では 40%程度しか抑制されなかった細胞浸潤能に関しては (Fig.4 B), miR-130 family seed-targeting LNA により 80%近くまで抑制されていた (Fig.18 D).

増殖能が低下した理由は定かではないが, miR-130 family には seed 配列が共通した miR-130a と miR-454 が存在している (Fig.19 A). これらの miRNA はいずれも oncomiR として細胞増殖亢進に寄与することが知られており^{42, 43}, 5637 細胞でもその発現が認められる (Fig.19 B). 特に 5637 細胞における miR-454 の SV-HUC-1 細胞に対する相対発現量は最も高く, seed 領域以外の配列もユニークである. このため他の family member とは異なる標的遺伝子セットを有している可能性が高く, seed-targeting によって miR-454 も標的とされたことで, 増殖抑制作用を示した可能性が考えられる.

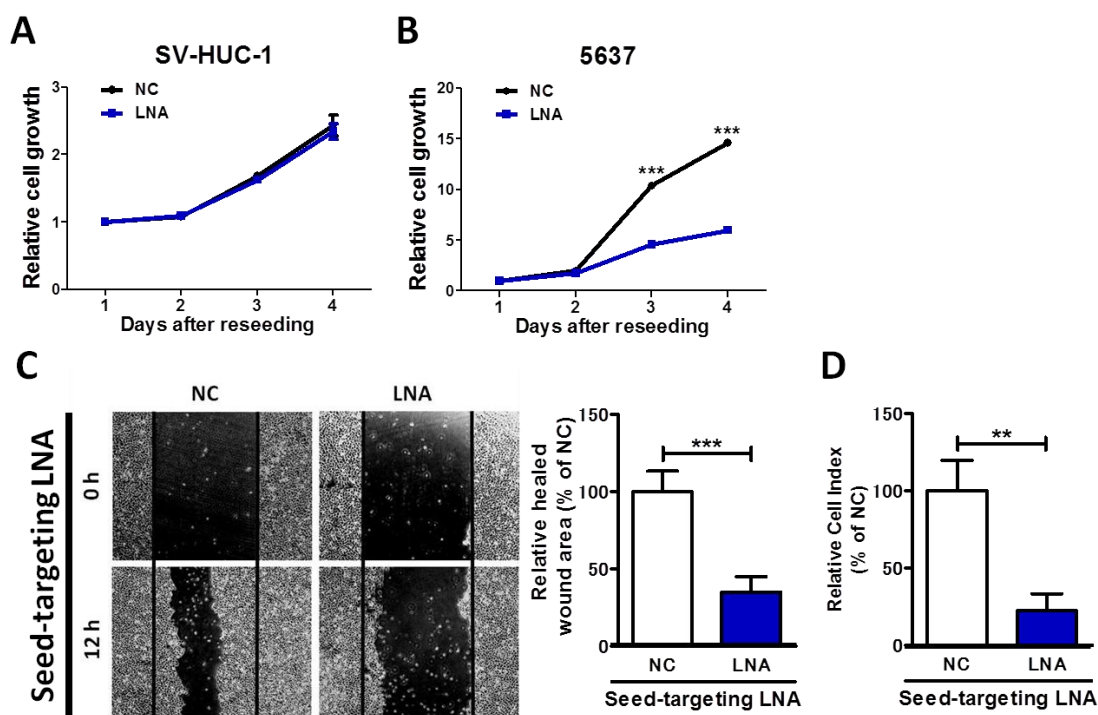


Figure. 18 miR-130 family-targeted LNA suppresses 5637 cell growth, migration, and invasion The effect of miR-130 family-targeted LNA on SV-HUC-1 (A) or 5637 (B) cell growth was measured by a WST-1 assay. (C) Cell migration was determined using a wound healing assay. The wound was formed by scraping at 60 h after transfection and then relative cell migration was measured after 12 h. (D) The invasion assay was performed using the xCELLigence real-time cell monitoring system at 72 h after transfection. In all experiments, 50 nM miR-130 family-targeted LNA was transfected. Data are mean \pm S.D. of four (A), nine (B), or three (C) independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

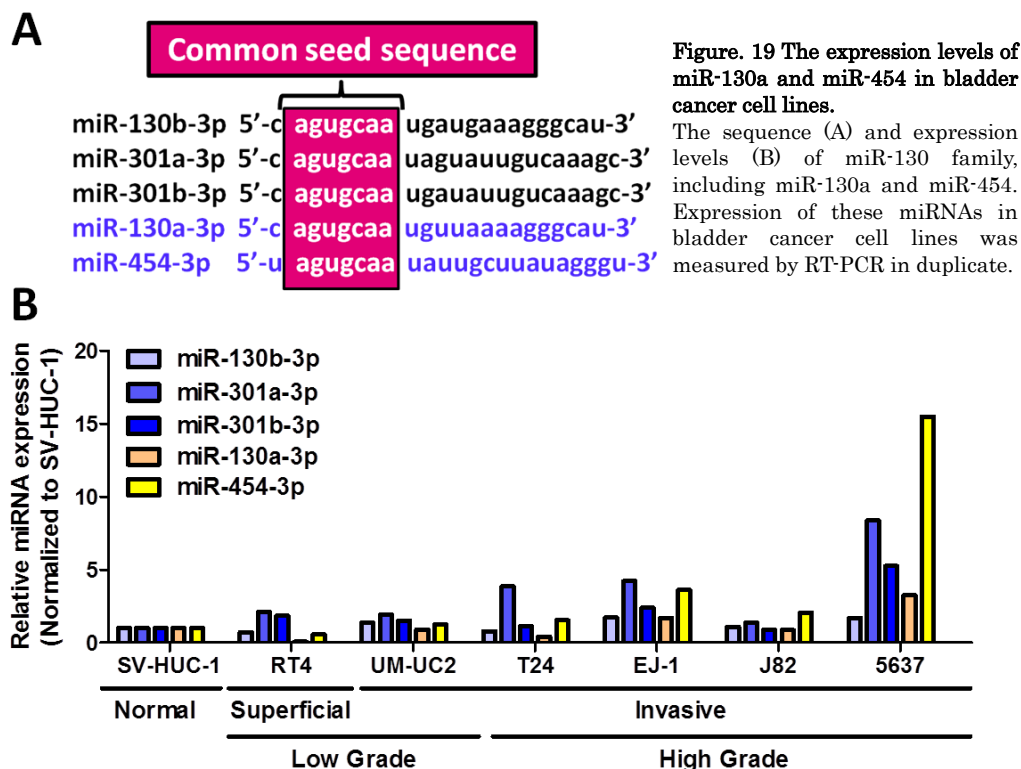


Figure. 19 The expression levels of miR-130a and miR-454 in bladder cancer cell lines.

The sequence (A) and expression levels (B) of miR-130 family, including miR-130a and miR-454. Expression of these miRNAs in bladder cancer cell lines was measured by RT-PCR in duplicate.

表現型に加えてこれまでに観察されたストレスファイバー形成や FAK と Akt リン酸化レベルの低下も観察でき (Fig.20), 微弱ではあるが LNA 単独で PTEN と PTPN11/SHP-2 に対する翻訳阻害の抑制 (Fig.21 A, B)と, タンパク質発現の回復も観察できた (Fig.21 C, D Left panel). miRIDIAN Hairpin Inhibitor を 3 種類同時に導入した場合でもこれらのタンパク質の発現回復が観察されていることから (Fig.21 C, D Right panel), seed-targeting LNA は単独で miR-130 family の同時阻害と同等の作用を有していることが示唆された。

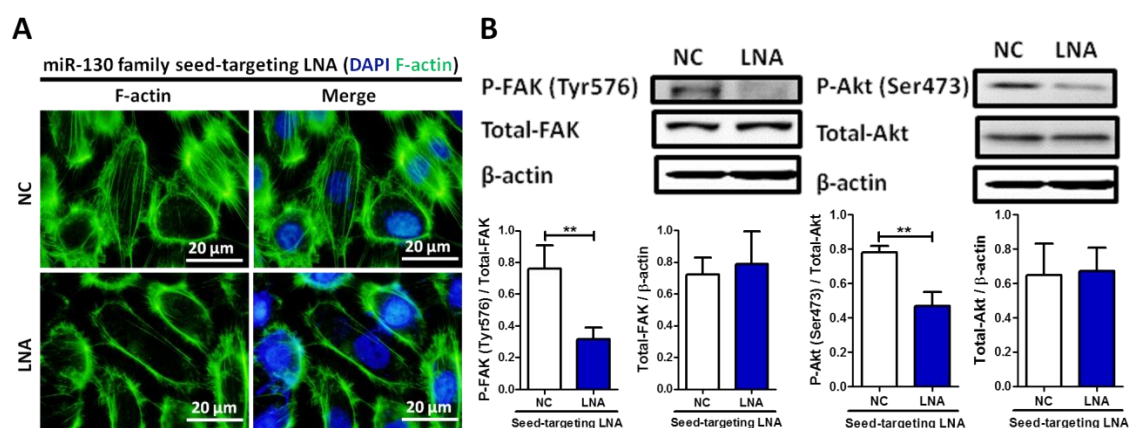


Figure. 20 Effect of miR-130 family-targeted LNA on stress fiber formation and phosphorylation of FAK and Akt in 5637 cells (A) Stress fiber formation was observed by F-actin staining with phalloidin. (B) Phosphorylation of FAK at Tyr⁵⁷⁶ and Akt at Ser⁴⁷³ was examined by western blot analysis and these graph showed the relative protein expression levels. Densitometry of each proteins were nomalized to β -actin or dephosphorylated proteins. Data are mean \pm S.D. of three (B) independent experiments. **p<0.01.

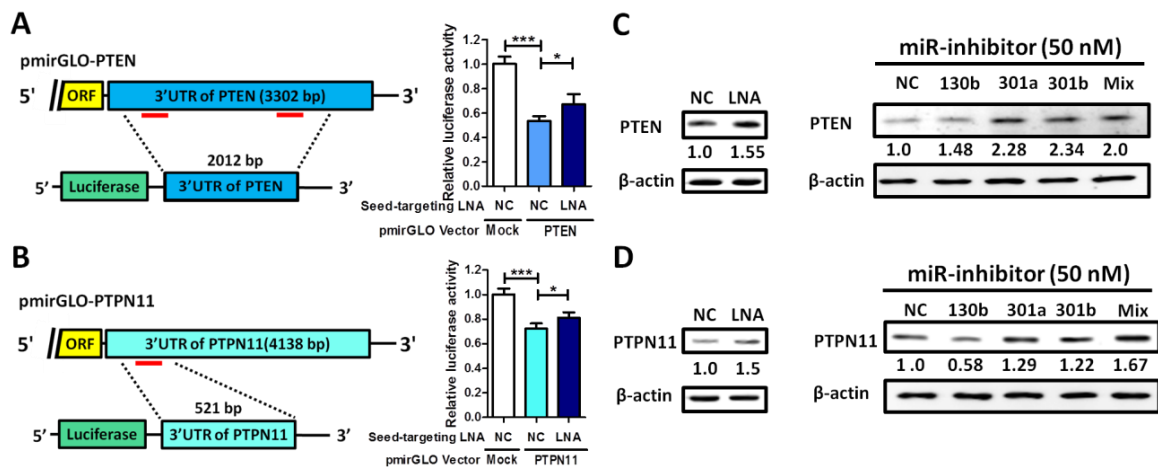


Figure. 21 The miR-130 family seed-targeting LNA can de-repress both PTEN and PTPN11/SHP-2 A dual luciferase reporter assay was performed in 5637 cells. The cells were co-transfected with LNA and reporter plasmid containing the predicted miR-130 family binding site in the *PTEN* (A) or *PTPN11* (B) 3'-UTR. Protein expression levels of both PTEN (C) and PTPN11(D) were evaluated by western blot analysis using seed-targeting LNA or miRIDIAN Hairpin Inhibitor-transfected 5637 cell lysate. Data are mean \pm S.D. of six (A) and twelve(B) independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

第3節 miR-130 family seed-targeting LNA の抗腫瘍作用の評価

最後に miR-130 family seed-targeting LNA が抗腫瘍作用を示すかどうか *in vivo* xenograft モデルを用いて検討を行った (Fig.22 A). 5637 細胞由来の腫瘍に対して, control LNA もしくは seed-targeting LNA をアテロコラーゲンを担体として週 1 回投与した.

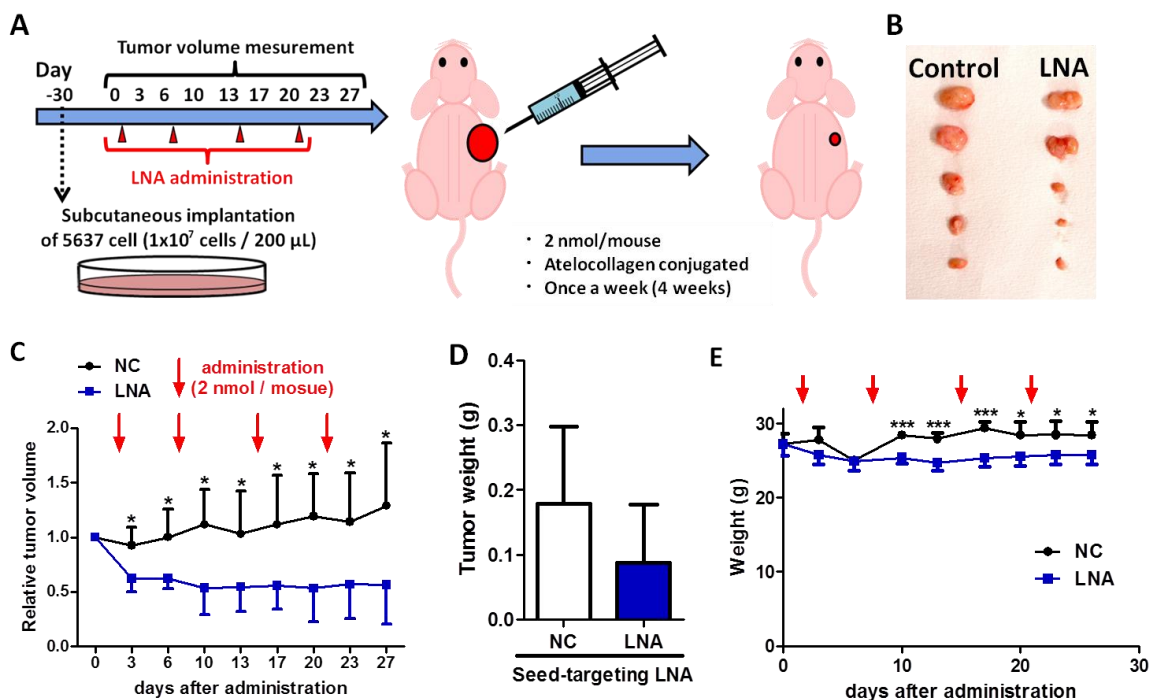


Figure. 22 The miR-130 family seed-targeting LNA suppresses tumor growth *in vivo*. (A) A schematic diagram of experiment schedule. The control or miR-130 family seed-targeting LNA were subcutaneously injected around 5637 cell-driven tumor. Resected tumor image (B) and tumor weight (D) after the LNA administration experiment. (C) Relative tumor volumes are shown in this graph. Tumor volume was calculated by the following formula: tumor volume [mm^3] = (major axis [mm]) \times (minor axis [mm])² \times 0.5. (E) Mice weight was measured at the same day as LNA administration. Data are mean \pm S.D. of five independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

その結果、相対腫瘍体積の有意な低下が観察され (Fig.22 B), 摘出腫瘍重量の低下傾向も認められた (Fig.22 C). Seed-targeting LNA 投与群において若干の体重低下を認めたが (Fig.22 E), 臨床応用に際しては経尿道的投与を想定している. SV-HUC-1 細胞に対して増殖抑制作用を示さないことから (Fig.18 A), この投与方式であれば副作用は誘導されないと考えられる. しかしながら血中投与された核酸医薬は肝臓と腎臓へ集積する性質がある. このため尿管を経由して腎臓に移行する可能性は考慮されるべきであり, 標的とする miRNA の取捨選択が必要かもしれない. Genecards に示される RNA-Seq のデータでは, miR-130b のみは正常腎臓においても発現が認められる. miR-130b の膀胱癌細胞における表現型は他の miR-130 family member に比較すると微弱であるため, これを除外した miR-301a/b targeting LNA の設計が解決策の一つと考えられる.

第 4 節 小括

本章では miR-130 family 同時阻害を目的に seed-targeting LNA をデザインし, その miR-130 family の阻害効率の評価と膀胱癌細胞に対する表現型解析を行った. その結果 miR-130 family member 全てを単独で阻害し, 個々の miR-130 family member 阻害時に観察された表現型を単独で誘導できることも示された. 加えて本研究で同定された miR-130 family の膀胱癌における標的遺伝子である PTEN, 並びに PTPN11/SHP-2 の両方の翻訳阻害を回復させることも示された. miR-130 family を治療標的とする場合, LNA による Loss-of-function 以外にも転写レベルで制御する戦略も考えられる. しかしながら第 1 章の小括で述べたように, miR-130 family はそれぞれ固有の発現誘導機構を有すると推測される. Genomic localization が miR-301a と miR-130b/301b とで異なっていること (Fig.2 B) も, この仮説を支持している. つまり family 分子を同時に抑えるには転写を調節するよりも生成後に LNA で capture する戦略の方が適していると考えられ, seed-targeting LNA が family 分子全体を阻害できる点は極めて好ましい結果である. 以上の結果から, 膀胱癌においても seed-targeting という概念を適用することで, miRNA 阻害効果を増強できる可能性が示唆された.

8-mer という短鎖長 LNA (tiny LNA) ではその配列のバリエーションは理論上 $4^8 = 65,536$ 種となるが, この数ではヒトゲノムの 30 億塩基対を上回ることができないため, off-target 効果が懸念される. しかし配列内に DNA を有する LNA gapmer や siRNA と異なり, 全塩基が LNA 骨格で構成される tiny LNA は標的 mRNA に対して切断活性を示さない³⁹. Obad らは Luciferase 遺伝子を標的とする LNA gapmer, siRNA, tiny LNA を用いた Dual luciferase reporter assay を行い, tiny LNA が Luciferase activity を低下させないことを示している. 加えて iTRAQ による網羅的解析により, tiny LNA 結合配列を有する mRNA に対しては翻訳阻害を誘導しないことも確認している. 以上の報告から, 理論上は tiny LNA の off-target 効果は十分に無視できるレベルだと考えられている. しかし本研究においては, 増殖抑制作用など miR-130 family seed-targeting LNA のみで観察された表現型もあるた

め、非特異作用を *in silico* で検討した。まず seed-targeting LNA の相補配列である "AGTGCAAT" を有する 1417 個の mRNA を、統合遺伝子検索プログラム GGRNA (<https://ggrna.dbcls.jp/ja/>) を用いて抽出した。Seed-targeting LNA が非特異的に結合するこの遺伝子セットが、どのようなシグナル伝達経路に属するのかを DAVID を用いて推定した。KEGG pathway 解析の結果、" Pathways in cancer " や Cell cycle" といった腫瘍関連シグナル伝達経路が浮上しており、seed-targeting LNA のみで観察された細胞増殖抑制作用はこういった off-target に起因する可能性は否定できない。

この問題に関しては前述した miR-301a/b targeting LNA の創製が打開策となると考えている。アルゴリズム (Exiqon 社 : LNA™ Oligo Tm Prediction, <https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx>) による推定値ではあるが、本研究で用いた 8-mer seed-targeting LNA の RNA に対する Tm 値は 55℃ であり、標的に対する親和性は決して高くない。これは miR-130 family の seed 配列が AT リッチであることに起因するが、配列を延長した miR-301a/b targeting LNA をデザインすることで、off-target 効果の低下と on-target 効果の向上を同時に達成できる可能性がある。核酸塩基長と細胞への取り込み効率はトレードオフの関係にあるため、塩基長が長すぎると DDS 効率に問題が生じる。GGRNA によって off-target 効果を推定すると、16-mer であれば非特異的に結合する遺伝子数は 0 個となることが分かった。16-mer への延長によって Tm 値の推定値も 80℃ まで上昇することから、標的特異性は多分に向上することが期待される。HCV 治療薬として臨床試験が進行中の antimiR-122 (Miravirsen)⁸³ が 15-mer であることから、*in vivo* で薬効を示すのに問題がない塩基長だと考える。本研究において miR-130 family seed-targeting LNA の膀胱癌治療薬としてのポテンシャルを示すことができた。今後は本項で述べたような標的配列のスクリーニングや核酸修飾の最適化といった、核酸医薬としてのブラッシュアップが重要な課題となってくるだろう。

総括

本研究により miR-130 family が膀胱癌細胞株において、PTEN と PTPN11/SHP-2 という 2 種類のホスファターゼを標的とすることが解明された。PTPN11/SHP-2 の膀胱癌における機能はほとんど解明されていないが、肝臓癌や前立腺癌での癌抑制的な機能を考慮すると、膀胱癌においても癌抑制遺伝子として機能している可能性は十分考えられる⁷²。また PTEN は膀胱癌悪性化と密接に関与していることが知られている。浸潤性膀胱癌においては PTEN が抑制する PI3K/Akt シグナル伝達経路の恒常的活性化が全体の 72% で観察されているほか⁸⁴、膀胱癌の Two-pathway モデルにおいても PTEN 不活性化が pT1 から浸潤性膀胱癌 (≥pT2) へのトリガーとなることが示されている⁶。これは miR-130 family が浸潤度あるいは異形度の上昇に伴い発現上昇が見られた点と符合しており、PTEN を抑制することで膀胱癌悪性化に寄与していると推測される。膀胱癌においてメチル化による PTEN のサイレンシングは検出されておらず⁸⁵、LOH も膀胱癌全体で 16% 程度に過ぎない⁸⁶。つまり miRNA によって抑制されている PTEN も十分存在すると考えられ、miR-130 family 阻害による発現回復も十分期待できる。

一方で PTEN と PTPN11/SHP-2 も miR-130 family 標的遺伝子の一部に過ぎず、他にも Rac1 抑制を介してストレスファイバー形成並びに遊走能を阻害する TSC1⁸⁷、EMT を抑制する Smad4⁸⁸ 並びに RUNX3⁸⁹ など、本研究で得られた表現型を制御しうる miR-130 family 標的候補遺伝子は多数存在する。本研究では新規性の観点から細胞骨格に焦点を当てて解析を進めたが、miR-130 family が EMT を制御する可能性も十分に考えられる。miR-130 family の標的候補遺伝子上位 600 位を用いた KEGG pathway 解析において、いずれの miRNA においても TGF-β/Wnt/Gap junction といった EMT 関連のシグナル伝達経路もピックアップされている。前述した EMT 関連の標的候補遺伝子の解析を進めることで、より詳細な miR-130 family の運動性亢進メカニズムが解明されるだろう。このように miRNA は多様な標的遺伝子を有するため、miRNA のシグナル伝達解析は非常に複雑なものになる。こうした複雑性にアプローチするために Ago2 免疫沈降と Gene array 解析を組み合わせた網羅的遺伝子発現解析を実施、新規標的遺伝子として PTPN11/SHP-2 を同定するに至った。近年の miRNA 研究においては個別標的遺伝子だけでなく、網羅的視点から多数の標的遺伝子群にも焦点を当てて議論することが常識となりつつある⁹⁰。標的候補遺伝子の mRNA のみを抽出するトランスクリプトーム解析手法を構築できたことも、本研究の大きな成果だと考えている。今後は SILAC や iTRAQ によるプロテオーム解析も行い、トランスクリプトーム解析と統合したマクロな視点から結果を解釈すべきだろう。こうした網羅的解析結果から miR-130 family の標的遺伝子群を抽出、発現変動を全遺伝子群と比較するといったバイオインフォマティクスの解析手法を駆使することで、より高精度に miR-130 family の機能の全体像にアプローチできることが期待される。

これまでの膀胱癌における miRNA-family の研究は miR-200 family の発現低下が EMT

を引き起こすという tumor suppressor miRNA の報告のみであり¹⁷, oncomiR-family としての報告は miR-130 family が世界初となる. miR-200 family の臨床応用を考えた場合, miRNA の mimic を補充する戦略となるが, 2 本鎖 miRNA mimic は非特異的なインターフェロン応答を引き起こすという問題点がある⁹¹. この問題は近年開発された pH 応答性リポソームの一種である neutral lipid emulsion (NLE) を利用し, 癌周辺の低 pH 環境での細胞取り込みを促進させることで回避できる⁹². NLE は pH7~7.5 である生体内では負電荷を帯びるため細胞膜との融合が起こらないが, 酸性条件下では正電荷へと変化することで効率的に細胞に取り込まれる. NLE を DDS キャリアとすることで, 非特異的なインターフェロン応答を誘導せずに miRNA mimic の腫瘍部位への送達が可能となる⁹³. しかしながら生理的条件下と乖離した過剰量の miRNA を誘導してしまう可能性は依然として排除できず⁹⁴, 本来標的でない遺伝子まで翻訳阻害してしまうリスクを考慮すると⁹⁵, 発現上昇している oncomiR をアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑制する Loss-of-function の方が優れた治療戦略だと考えられる. 何よりも Gain-of-function で miRNA-family を補充する場合, それぞれの miRNA mimic を別個に導入する必要があるため, 配列相同性と機能的重複を有するといった miRNA-family の利点が活かせない. こうした事実からも, 膀胱癌で発現上昇する miR-130 family いずれもが oncomiR として機能することは, 治療標的として極めて重要なアドバンテージと言えるだろう.

現在臨床試験段階にある膀胱癌治療薬は PI3K/Akt 並びに mTOR シグナルを標的とする低分子化合物が多く⁹⁶, miR-130 family seed-targeting LNA が同シグナルを抑制できる点は好ましい. 近年では PI3K/mTOR (NVP-BEZ235)⁹⁷ や mTORC1/mTORC2 (MLN0128)⁹⁸ といった Dual targeting inhibitor の有効性も示されている. また浸潤性膀胱癌の 10-15% 程度では PI3K/Akt シグナルのみならず Ras 変異依存的な MEK シグナルの活性化も検出されるが, PI3K/mTOR 阻害剤 (PF-04691502) と MEK 阻害剤 (PD-0325901) の共処理により, PDX モデルに対して顕著な抗腫瘍作用を示したという報告も存在する⁹⁹. このように浸潤性膀胱癌の治療においては, 単一分子あるいはシグナル伝達経路を標的とするのではなく, 複数のシグナルを同時に標的とする治療戦略の有効性が蓄積されつつある. これは多様な標的遺伝子あるいはシグナル伝達経路を制御できる miRNA の特徴と合致するものであり, 膀胱癌治療標的としての miR-130 family の優位性に繋がると考える.

このように miR-130 family は治療標的として魅力的な分子ではあるが, 解決すべき課題も残されている. 本解析により得られた知見は RNA 骨格の阻害剤である miRIDIAN Hairpin Inhibitor と LNA 骨格でデザインされた seed-targeting LNA とを比較した解析結果である. 阻害剤自体の安定性並びにヌクレアーゼ耐性が異なっているため, その強力な運動能抑制作用や抗腫瘍作用は単に LNA の有する高い安定性と結合力に起因している可能性は否定できない. 今後は PS 修飾された LNA 骨格を有する antimiR-130b, -301a, -301b を作製し, seed-targeting LNA と比較検討する実験が必要であろう. また miR-130 family の機能の本質は運動性亢進であることから, *in vivo* 薬効評価は転移モデルで実施すべき

である。しかしながら 5637 細胞での転移モデルの報告は癌細胞の尾静脈注射による肺転移モデル 1 例のみであり¹⁰⁰, ノードマウスへの転移巣形成能力は乏しい。また本モデルは癌細胞が血管外遊出した後, つまり癌転移の後期段階に対する評価系であり, 癌細胞が膀胱周囲に浸潤していく転移の初期段階を観察する評価系としては不適當である。事実, miR-130 family 過剰発現 UM-UC-2 細胞を用いて尾静脈注射による肺転移モデルでの転移能評価を行ったが, miR-130 family 過剰発現による転移巣数の上昇は観察できなかった (Data not shown)。以上の知見を考慮すると, 膀胱癌細胞の同所性移植モデルを利用して, 原発巣から膀胱周囲へ浸潤していく様子を再現可能な *in vivo* 浸潤モデルの樹立が必要である。しかし膀胱への良好な生着率を示す UM-UC-3 細胞においては内在性 miR-130 family を高発現するものの, レポーターアッセイでその翻訳阻害が確認できていないため (Data not shown), miR-130 family seed-targeting LNA の機能評価には利用できない。膀胱に生着可能かつ内在性 miR-130 family が機能している膀胱癌細胞株の探索と, *in vivo* 浸潤評価モデルの樹立が急務である。この評価系に対して LNA 骨格を有する antimiR-130b, -301a, -301b と seed-targeting LNA 投与し, 浸潤抑制能力の比較検討がなされれば, miR-130 family を標的とした核酸創薬に繋がると考える。

本研究により膀胱癌における oncomiR-family として miR-130 family とその標的遺伝子を同定し, 更に同 family に対する seed-targeting LNA が膀胱癌においても有効である可能性が示唆された (Fig.23)。先に示した課題は残るが, 本研究が 20 余年間停滞していた膀胱癌治療の発展と一助となることを願ってやまない。

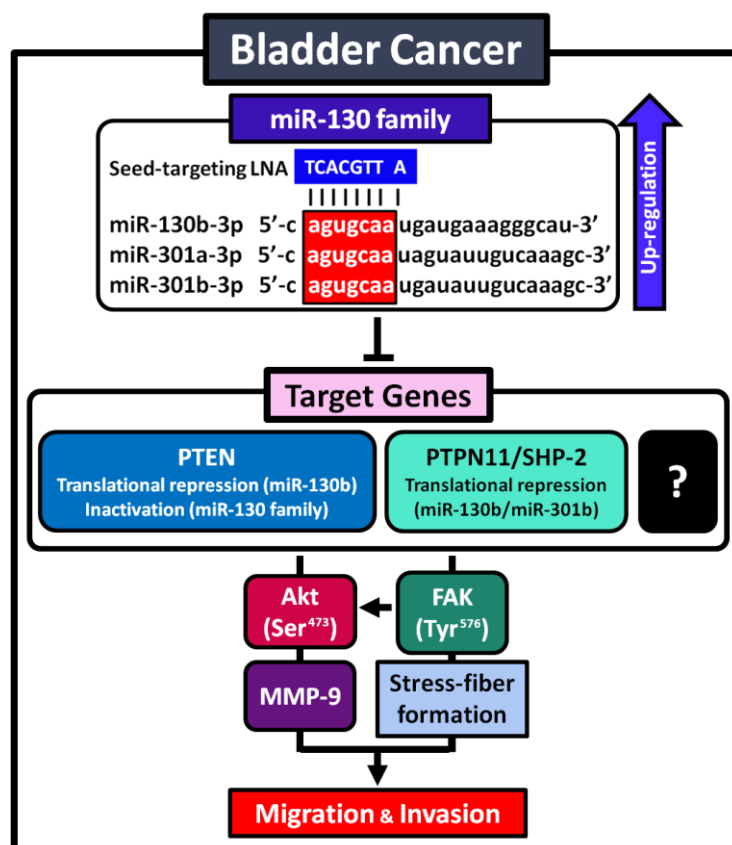


Figure. 23 Summary of the miR-130 family function as an oncomiR-family in bladder cancer.

結論

本研究により以下の結果を得た.

1. 腎盂尿管癌並びに膀胱癌臨床検体においてmiR-210と, miR-130b, miR-301a, miR-301bを含むmiR-130 familyが非癌部よりも癌部で高発現し, 更に浸潤度や異形度の進展に伴い発現上昇することが解明された. (第1章)
2. miR-130 familyは膀胱癌細胞の運動性亢進に寄与しており, ストレスファイバー形成促進やFAKとAktのリン酸化レベルの亢進, 並びにMMP-9タンパク質発現上昇がその分子メカニズムの一端であることが示された. (第2章)
3. 膀胱癌細胞株においてmiR-130bはPTENとPTPN11/SHP-2を, miR-301bはPTPN11/SHP-2を直接の標的遺伝子とすることが解明された. (第3章)
4. miR-130 family seed-targeting LNAは各miRNA個別阻害による表現型を単独で誘導し, 更に*in vivo xenograft model*に対して抗腫瘍作用を示した. (第4章)

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、辻川 和丈先生に心より謝意を表します。

本研究に当たり種々のご指導を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科特任助教、神宮 司 健太郎先生、ならびに助教、上田 裕子先生、そして北恵 郁緒里特任研究員に心より感謝致します。

膀胱癌臨床検体の御供与及び種々おご指導、叱咤激励を頂きました大阪大学医学部泌尿器科 野々村 祝夫先生、植村 元秀先生、藤田 和利先生、中田 渡先生、松崎 恭介先生、木内 利郎先生に深く感謝致します。

折に触れて鋭い指摘、また的確な助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科准教授、深田 宗一郎先生、日本たばこ産業(株)医薬総合研究所 福田 純明様に心より感謝致します。

本研究室での唯一の同期、そして友人として精神面での支えとなってくれただけでなく、研究面でも数多くの助言・助力を賜りました大塩 郁幹修士に心より感謝致します。

本研究に際し小野薬品工業(株) から奨学金を賜り、自身初となる国際学会に参加することができました。金銭的援助のみならず、研究へのアドバイスや叱咤激励を賜りました小野薬品工業(株) 小西 由高様、成田 正見様に深く陳謝いたします。

本研究の実験に多大なご協力を頂きました廣野 貴之学士、廣瀬 遼学士、中辻 由乃特別研究生に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました小林 巧明特任研究員、倉知 孟史学士、安藤 雅大学士、柏木 悠里学士、中村 美紀学士、塚田 陽平学士、松本 健太郎学士、喜多村 悠加特別実習生、星川 典子特別実習生をはじめとする大阪大学薬学研究科 細胞生理学分野の皆様心より感謝致します。

最後に公私ともに支えてくれた首都大学東京時代の友人達、また博士後期課程への進学を認めて下さり、私をここまで育て上げてくれた両親に深く感謝致します。

参考文献

- 1 Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893–2917.
- 2 Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL *et al.* Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 859–866.
- 3 Soloway MS. Bladder cancer: Lack of progress in bladder cancer--what are the obstacles? *Nat Rev Urol* 2013; 10: 5–6.
- 4 von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T *et al.* Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4602–4608.
- 5 Nagele U, Anastasiadis AG, Stenzl A, Kuczyk M. Radical cystectomy with orthotopic neobladder for invasive bladder cancer: a critical analysis of long-term oncological, functional, and quality of life results. *World J Urol* 2011; 30: 725–732.
- 6 Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer : new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Publ Gr* 2015; 15: 25–41.
- 7 Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V, Cibulskis K, Sivachenko A *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013; 499: 214–218.
- 8 Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S *et al.* A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3377–3386.
- 9 Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 849–851.
- 10 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259–269.
- 11 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215–233.
- 12 Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92–105.

- 13 Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 2014; 25: 137–147.
- 14 Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008 ; 4:455(7209):64-71.
- 15 Mu P, Han Y-C, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogdowski P *et al*. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev* 2009; 23: 2806–2811.
- 16 Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ* 2013; 20: 1603–1614.
- 17 Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A *et al*. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5060–5072.
- 18 Murphy BL, Obad S, Bihannic L, Ayrault O, Zindy F, Kauppinen S *et al*. Silencing of the miR-17~92 cluster family inhibits medulloblastoma progression. *Cancer Res* 2013; 73: 7068–7078.
- 19 Bernardo BC, Gao X-M, Winbanks CE, Boey EJH, Tham YK, Kiriazis H *et al*. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 17615–17620.
- 20 Rottiers V, Obad S, Petri A, McGarrah R, Lindholm MW, Black JC *et al*. Pharmacological Inhibition of a MicroRNA Family in Nonhuman Primates by a Seed-Targeting 8-Mer AntimiR. *Sci Transl Med* 2013; 5: 212ra162–212ra162.
- 21 Liu Y, Han Y, Zhang H, Nie L, Jiang Z, Fa P *et al*. Synthetic miRNA-mowers targeting miR-183-96-182 cluster or miR-210 inhibit growth and migration and induce apoptosis in bladder cancer cells. *PLoS One* 2012; 7: e52280.
- 22 Lin Y-H, Wu M-H, Liao C-J, Huang Y-H, Chi H-C, Wu S-M *et al*. Repression of microRNA-130b by thyroid hormone enhances cell motility. *J Hepatol* 2015; 62: 1328–1340.
- 23 Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H *et al*. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of

- the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene* 2013; 32: 3286–3295.
- 24 Zhao G, Zhang J, Shi Y, Qin Q, Liu Y, Wang B *et al.* MiR-130b Is a Prognostic Marker and Inhibits Cell Proliferation and Invasion in Pancreatic Cancer through Targeting STAT3. *PLoS One* 2013; 8: e73803.
 - 25 Chen Q, Zhao X, Zhang H, Yuan H, Zhu M, Sun Q *et al.* MiR-130b suppresses prostate cancer metastasis through down-regulation of MMP2. *Mol Carcinog* 2015; 54: 1292–1300.
 - 26 Yang C, Cai J, Wang Q, Tang H, Cao J, Wu L *et al.* Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. *Gynecol Oncol* 2012; 124: 325–334.
 - 27 Tu K, Zheng X, Dou C, Li C, Yang W, Yao Y *et al.* MicroRNA-130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 20486–20499.
 - 28 Ma S, Tang KH, Chan YP, Lee TK, Kwan PS, Castilho A *et al.* miR-130b Promotes CD133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 694–707.
 - 29 Colangelo T, Fucci A, Votino C, Sabatino L, Pancione M, Laudanna C *et al.* MicroRNA-130b promotes tumor development and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Neoplasia* 2013; 15: 1218–1231.
 - 30 Li B-L, Lu C, Lu W, Yang T, Qu J, Hong X *et al.* miR-130b is an EMT-related microRNA that targets DICER1 for aggression in endometrial cancer. *Med Oncol* 2013; 30: 484.
 - 31 Yu T, Cao R, Li S, Fu M, Ren L, Chen W *et al.* MiR-130b plays an oncogenic role by repressing PTEN expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer* 2015; 15: 29.
 - 32 Chang Y-Y, Kuo W-H, Hung J-H, Lee C-Y, Lee Y-H, Chang Y-C *et al.* Deregulated microRNAs in triple-negative breast cancer revealed by deep sequencing. *Mol Cancer* 2015; 14: 36.
 - 33 Mitra R, Edmonds MD, Sun J, Zhao M, Yu H, Eischen CM *et al.* Reproducible combinatorial regulatory networks elucidate novel oncogenic microRNAs in non-small cell lung cancer. *RNA* 2014; 20: 1356–1368.
 - 34 Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N *et al.* Roles for

- microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res* 2008; 68: 8976–8985.
- 35 Sheng X, Chen H, Wang H, Ding Z, Xu G, Zhang J *et al.* MicroRNA-130b promotes cell migration and invasion by targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human glioma. *Biomed Pharmacother* 2015; 76: 121–126.
 - 36 Sun B, Li L, Ma W, Wang S, Huang C. MiR-130b inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells via CYLD. *Tumour Biol* 2015; doi:10.1007/s13277-015-4632-3. 1-7.
 - 37 Wang M, Li C, Yu B, Su L, Li J, Ju J *et al.* Overexpressed miR-301a promotes cell proliferation and invasion by targeting RUNX3 in gastric cancer. *J Gastroenterol* 2013; 48: 1023–1033.
 - 38 Lu Y, Gao W, Zhang C, Wen S, Huangfu H, Kang J *et al.* Hsa-miR-301a-3p Acts as an Oncogene in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Target Regulation of Smad4. *J Cancer* 2015; 6: 1260–1275.
 - 39 Zhou P, Jiang W, Wu L, Chang R, Wu K, Wang Z. miR-301a Is a Candidate Oncogene that Targets the Homeobox Gene Gax in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 1171–1180.
 - 40 Zhang Y, Duan G, Feng S. MicroRNA-301a modulates doxorubicin resistance in osteosarcoma cells by targeting AMP-activated protein kinase alpha 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 459: 367–373.
 - 41 Xia X, Zhang K, Cen G, Jiang T, Cao J, Huang K *et al.* MicroRNA-301a-3p promotes pancreatic cancer progression via negative regulation of SMAD4. *Oncotarget* 2015; 6: 21046–21063.
 - 42 Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ *et al.* miR-301a as an NF-κB activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J* 2011; 30: 57–67.
 - 43 Chen Z, Chen L-Y, Dai H-Y, Wang P, Gao S, Wang K. miR-301a promotes pancreatic cancer cell proliferation by directly inhibiting Bim expression. *J Cell Biochem* 2012; 113: 3229–3235.
 - 44 Guo Y-J, Liu J-X, Guan Y-W. Hypoxia induced upregulation of miR-301a/b contributes to increased cell autophagy and viability of prostate cancer cells by targeting NDRG2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20: 101–108.

- 45 Fang Y, Sun B, Xiang J, Chen Z. MiR-301a promotes colorectal cancer cell growth and invasion by directly targeting SOCS6. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35: 227–236.
- 46 Zhang W, Zhang T, Jin R, Zhao H, Hu J, Feng B *et al.* MicroRNA-301a promotes migration and invasion by targeting TGFBR2 in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33: 780.
- 47 Liang B, Yin J-J, Zhan X-R. MiR-301a promotes cell proliferation by directly targeting TIMP2 in multiple myeloma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 9168–9174.
- 48 Ma F, Zhang J, Zhong L, Wang L, Liu Y, Wang Y *et al.* Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt/ β -catenin signaling. *Gene* 2014; 535: 191–197.
- 49 Bertero T, Lu Y, Annis S, Hale A, Bhat B, Saggar R *et al.* Systems-level regulation of microRNA networks by miR-130/301 promotes pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2014; 124: 3514–3528.
- 50 Bertero T, Cottrill KA, Lu Y, Haeger CM, Dieffenbach P, Annis S *et al.* Matrix Remodeling Promotes Pulmonary Hypertension through Feedback Mechanoactivation of the YAP/TAZ-miR-130/301 Circuit. *Cell Rep* 2015; 13: 1016–1032.
- 51 Metastatic Pattern of Bladder Cancer: Correlation With the Characteristics of the Primary Tumor. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;196(1):117-122.
- 52 Nakamura K, Yano H, Schaefer E, Sabe H. Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies. *Oncogene* 2001; 20: 2626–2635.
- 53 Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000; 19: 5606–5613.
- 54 Cheng JC-H, Chou CH, Kuo ML, Hsieh C-Y. Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* 2006; 25: 7009–7018.
- 55 Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657–672.
- 56 Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A. Molecular aspects of tumor cell migration and

- invasion. *Ann dell'Istituto Super di sanità* 2010; 46: 66–80.
- 57 Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H *et al.* Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene* 2013; 32: 3286–3295.
 - 58 Zong C, Wang J, Shi T-M. MicroRNA 130b enhances drug resistance in human ovarian cancer cells. *Tumour Biol* 2014; 35: 12151–12156.
 - 59 Sheng X, Chen H, Wang H, Ding Z, Xu G, Zhang J *et al.* MicroRNA-130b promotes cell migration and invasion by targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human glioma. *Biomed Pharmacother* 2015; 76: 121–126.
 - 60 Yu L-D, Jin R-L, Gu P-C, Ling Z-H, Lin X-J, Du J-Y. Clinical significance of microRNA-130b in osteosarcoma and in cell growth and invasion. *Asian Pac J Trop Med* 2015; 8: 752–756.
 - 61 Biton A, Bernard-Pierrot I, Lou Y, Krucker C, Chapeaublanc E, Rubio-Pérez C *et al.* Independent component analysis uncovers the landscape of the bladder tumor transcriptome and reveals insights into luminal and basal subtypes. *Cell Rep* 2014; 9: 1235–1245.
 - 62 Turner RM, Kwok CS, Chen-Turner C, Maduakor CA, Singh S, Loke YK. Thiazolidinediones and associated risk of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 78: 258–273.
 - 63 Uchino K, Takeshita F, Takahashi R, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H *et al.* Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression. *Mol Ther* 2013; 21: 610–619.
 - 64 Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci* 2007; 120: 4071–4079.
 - 65 Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, Horie Y, Natsui M, Shibata Y *et al.* Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66: 8389–8396.
 - 66 Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 20693–20703.
 - 67 Odriezola L, Singh G, Hoang T, Chan AM. Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem* 2007; 282: 23306–23315.

- 68 Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372, 786–791
- 69 Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 1995 ;15(2):954-63.
- 70 Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 509–524.
- 71 Gentile A, D'Alessandro L, Lazzari L, Martinoglio B, Bertotti A, Mira A *et al.* Met-driven invasive growth involves transcriptional regulation of Arhgap12. *Oncogene* 2008; 27: 5590–5598.
- 72 Li S, Hsu DD, Wang H, Feng G-S. Dual faces of SH2-containing protein-tyrosine phosphatase Shp2/PTPN11 in tumorigenesis. *Front Med* 2012; 6: 275–279.
- 73 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with Helicobacter pylori CagA. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 261–276.
- 74 Kodama A, Matozaki T, Fukuhara A, Kikyo M, Ichihashi M, Takai Y. Involvement of an SHP-2-Rho Small G Protein Pathway in Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-induced Cell Scattering . *Mol. Biol. Cell.* 2000; 11 2565–2575.
- 75 Toso A, Revandkar A, Di Mitri D, Guccini I, Proietti M, Sarti M *et al.* Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* 2014; 9: 75–89.
- 76 Lieman JH, Worley LA, Harbour JW. Loss of Rb-E2F repression results in caspase-8-mediated apoptosis through inactivation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2005; 280: 10484–10490.
- 77 Schoenwaelder SM, Petch LA, Williamson D, Shen R, Feng G-S, Burrridge K. The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. *Curr Biol* 2000; 10: 1523–1526.
- 78 Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C *et al.* Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet* 2011; 43: 371–378.
- 79 Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM *et al.* Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res* 2012; 110: 71–81.

- 80 Rottiers V, Obad S, Petri A, McGarrah R, Lindholm MW, Black JC *et al.* Pharmacological Inhibition of a MicroRNA Family in Nonhuman Primates by a Seed-Targeting 8-Mer AntimiR. *Sci Transl Med* 2013; 5: 212ra162–212ra162.
- 81 Liang H-L, Hu A-P, Li S-L, Xie J-P, Ma Q-Z, Liu J-Y. MiR-454 prompts cell proliferation of human colorectal cancer cells by repressing CYLD expression. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 2397–2402.
- 82 Brock M, Haider TJ, Vogel J, Gassmann M, Speich R, Trenkmann M *et al.* The hypoxia-induced microRNA-130a controls pulmonary smooth muscle cell proliferation by directly targeting CDKN1A. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 61: 129–137.
- 83 Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N Engl J Med.* 2013; 2;368(18):1685-1694.
- 84 The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014; 507: 315–322.
- 85 Kunze E, Wendt M, Schlott T. Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. *Int J Mol Med* 2006; 18: 547–557.
- 86 Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 80: 904–908.
- 87 Ohsawa M, Kobayashi T, Okura H, Igarashi T, Mizuguchi M, Hino O. TSC1 controls distribution of actin fibers through its effect on function of Rho family of small GTPases and regulates cell migration and polarity. *PLoS One* 2013; 8: e54503.
- 88 Liu L, Nie J, Chen L, Dong G, Du X, Wu X *et al.* The oncogenic role of microRNA-130a/301a/454 in human colorectal cancer via targeting Smad4 expression. *PLoS One* 2013; 8: e55532.
- 89 Lai KW, Koh KX, Loh M, Tada K, Subramaniam MM, Lim XY *et al.* MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1456–1463.
- 90 Kaller M, Liffers S-T, Oeljeklaus S, Kuhlmann K, Röh S, Hoffmann R *et al.* Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell*

Proteomics 2011; 10: M111.010462.

- 91 Peacock H, Fucini R V., Jayalath P, Ibarra-Soza JM, Haringsma HJ, Flanagan WM *et al.* Nucleobase and Ribose Modifications Control Immunostimulation by a MicroRNA-122-mimetic RNA. *J Am Chem Soc* 2011; 133: 9200–9203.
- 92 Daige CL, Wiggins JF, Priddy L, Nelligan-Davis T, Zhao J, Brown D. Systemic delivery of a miR34a mimic as a potential therapeutic for liver cancer. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 2352–2360.
- 93 Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D *et al.* Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 2010; 70: 5923–5930.
- 94 Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 2009; 460: 479–486.
- 95 van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 851–864.
- 96 Carneiro BA, Meeks JJ, Kuzel TM, Scaranti M, Abdulkadir SA, Giles FJ. Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treat Rev* 2014; 41: 170–178.
- 97 Moon DG, Lee SE, Oh MM, Lee SC, Jeong SJ, Hong SK *et al.* NVP-BEZ235, a Dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. *Int J Oncol* 2014; 45: 1027–1035.
- 98 Becker MN, Wu KJ, Marlow LA, Kreinest PA, Vonroemeling CA, Copland JA *et al.* The combination of an mTORc1/TORc2 inhibitor with lapatinib is synergistic in bladder cancer in vitro. *Urol Oncol* 2014; 32: 317–326.
- 99 Cirone P, Andresen CJ, Eswaraka JR, Lappin PB, Bagi CM. Patient-derived xenografts reveal limits to PI3K/mTOR- and MEK-mediated inhibition of bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73: 525–538.
- 100 Wei J-H, Cao J-Z, Zhang D, Liao B, Zhong W-M, Lu J *et al.* EIF5A2 predicts outcome in localised invasive bladder cancer and promotes bladder cancer cell aggressiveness in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2014; 110: 1767–1777.