

令和元年5月24日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05464

研究課題名(和文) 治療抵抗性腎癌における機能性RNA分子ネットワークの探索と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Exploring molecular network of functional nucleic acid and developing therapeutic innovations in drug-resistant renal cell carcinoma

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：治療抵抗性腎癌のmiRNA発現プロファイルにおいて、miR-210-3pは発現が低下しTWIST1を標的とした癌抑制的作用を有した。miR-1274aは発現が亢進し癌抑制的作用を有するBMPR1Bを直接制御した。またHIF2 阻害薬の耐性獲得腎癌においてはPHGDH遺伝子の発現亢進によるセリン合成経路が活性化されPHGDHの阻害薬が耐性克服に有効であることを突き止めた。スニチニブ耐性腎細胞癌ではmiR-99a-3pの発現抑制が認められDNAの重合および修復に必要なRRM2を標的遺伝子とした。一連の研究で治療抵抗性腎癌の新規分子ネットワークの一端が解明され新規治療法の開発に繋がると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で使用した分子標的薬治療後の剖検検体を用いたマイクロRNAプロファイルは、世界的に殆ど報告が無く、研究を進める上で大きなアドバンテージとなった。miR-210-3p, miR-1271a, miR-99a-3pの解析を基点として、治療標的となる重要な分子の同定に成功した。またHIF2 阻害薬の耐性獲得腎癌においてはPHGDH遺伝子の発現亢進によるセリン合成経路の活性化を発見しPHGDHの阻害薬が耐性克服に有効であることを突き止めた。現在、有効な治療法が乏しい治療抵抗性腎癌に対する新たな治療戦略を見出した事は、臨床的に非常に重要な情報をもたらしたと考える。

研究成果の概要(英文)：Based on microRNA expression profile of drug-resistant renal cell carcinoma (RCC), miR-210-3p was downregulated and had tumor suppressive function via targeting TWIST1. miR-1271a was upregulated and had oncogenic function via targeting tumor suppressive BMPR1B. On the other hand, based on the gene expression profile in RCC with drug-resistant to HIF2 inhibitors, serine synthesis pathway was activated through PHGDH gene up-regulation. We found out PHGDH inhibitors as was useful for overcoming drug-resistance to HIF2 inhibitors. In terms of sunitinib-resistant RCC, miR-99a-3p was downregulated and had tumor suppressive function via targeting RRM2 gene having DNA polymerization and repair. These studies explored novel molecular network of drug-resistant renal cell carcinoma and will probably lead to seem to develop therapeutic innovations.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：マイクロRNA 腎癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎に発生する原発性腫瘍の中で、腎細胞癌は約 90% を占めている。またすべての癌の約 2% を占める。泌尿器科系悪性腫瘍の中では膀胱癌、前立腺癌について多い腫瘍である。進行癌の予後は不良であり、5 年生存率は 5%-10% である。生存率の低さは、再発や遠隔転移に起因しており、再発・転移の制御が腎癌の治療の重要課題である。近年、血管新生受容体や増殖シグナル受容体を標的とした分子標的治療薬が開発され、進行腎癌症例に対して、1st line または 2nd line の治療として一定の治療効果を上げている。しかしながら、腎癌の多くは分子標的治療薬に治療抵抗性を獲得し、再発・転移に至る。治療抵抗性を獲得した腎癌に対する有効な治療法はほとんどなく、この状態に至った患者の予後は極めて悪い。新規治療法の開発には、治療抵抗性を獲得した腎癌細胞を対処とした、最新のゲノム解析研究が不可欠であるが、治療抵抗性腎癌細胞を得る事が困難である事から殆ど行われていなかった。

ヒトゲノム解析研究の大きな成果として、ゲノム中には蛋白をコードしない RNA が多数存在する事が判明している。その中で、僅か 19 塩基~22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子はマイクロ RNA と呼ばれる。ヒト癌においては、癌細胞で発現変化を認めるマイクロ RNA の解析から、癌抑制遺伝子または癌遺伝子として機能するマイクロ RNA の報告が相次ぎ、癌研究分野においてマイクロ RNA は一躍注目された。1 つのマイクロ RNA は、配列依存的に、数百~数千種の機能性 RNA (蛋白コード・非コード遺伝子) の発現を制御する事が報告されている。そのため、マイクロ RNA の発現異常が、癌を含むヒト疾患に深く関わっている事が明らかとなってきた。この事は、基点となるマイクロ RNA を見出し、マイクロ RNA が制御する遺伝子群を網羅的に解析する事で、癌に特徴的な機能性 RNA 分子ネットワークが見出せる可能性を示唆している。申請者は、これまでに、腎癌臨床検体を用いた「マイクロ RNA 発現プロファイル」を独自に作成し、このプロファイルを基に、「腎癌・癌抑制型マイクロ RNA」の探索と、「癌抑制型マイクロ RNA」が制御する分子ネットワークを明らかにしてきた実績を有する。

2. 研究の目的

近年、腎癌の治療薬として、癌細胞の増殖シグナルや血管新生シグナルを特異的に遮断する「分子標的治療薬」が登場し、一定の効果を挙げている。しかしながら、「分子標的治療薬」は癌細胞の増殖を抑制する効果はあるものの、癌細胞を殺傷する効果は低い事が知られている。そのため、「分子標的治療薬」の継続的使用により、癌細胞は、サルベージ経路を活性化させ、「分子標的治療薬」に対する抵抗性を獲得する。現在、「分子標的治療薬」治療に抵抗性を獲得した腎癌に対する有効な治療法は無く、その予後は不良である。この背景には、治療抵抗性腎癌細胞において、どのようなサルベージ経路が活性されているか、これまで研究されていない事が挙げられる。申請者は、治療に抵抗性腎癌に対するマイクロ RNA 解析から、治療抵抗性腎癌細胞の活性化経路を見出す事が可能であると考え、本研究申請に至った。この活性化経路が明らかになれば、その遮断法による新規治療法の開発が望めると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、腎癌の再発や治療抵抗性腎癌の分子メカニズムを、マイクロ RNA を基点として明らかにし、更にその活性化経路を遮断する事により、治療抵抗性腎癌の増殖や転移を抑制する戦略を考案する提案である。概に申請者は「治療抵抗性腎癌マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成し、解析候補となるマイクロ RNA の選別が終了している。これらマイクロ RNA を起点とした解析を行い、以下の研究項目について順次明らかにする定である。

(1) 「治療抵抗性腎癌マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づき、腎癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA について機能解析を施行し、「腎癌・癌抑制型マイクロ RNA」を探索する。

(2) 「癌抑制型マイクロ RNA」が制御する機能性 RNA ネットワークを探索し、治療抵抗性腎癌で活性化している分子経路を見出す。

(3) 治療抵抗性腎癌で活性化している分子経路を遮断する戦略を考案し、in vitro/in vivo における検証を行う。

4. 研究成果

2016年度は「治療抵抗性腎癌マイクロ RNA 発現プロファイル」に基づき、腎癌組織で発現が抑制されているマイクロ RNA について機能解析を施行し、「腎癌・癌抑制型マイクロ RNA」の探索を行った。腎癌において発現が亢進している miRNA をノックアウトすることを試みた。はじめに、腎癌において発現が亢進している miRNA のプロファイリングを行い、リストの中で、細胞内で十分な発現値を示す上位の miRNA に注目した。まずは microRNA-210-3p に着目して、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 を用いたノックアウトを行った。そして、レンチウイルスにより Cas9 および guideRNA を発現させる CRISPR / Cas9 システムを用いて、腎癌細胞株で miRNA のノックアウトを行った。guideRNA は Web デザインツールで選択し、また、オフターゲット効果の可能性を最小にするため、いずれの miRNA に対しても guideRNA は 2 種類以上作成した。CRISPR/Cas9 を導入したいずれの細胞株においても 100%に近い発現抑制を得ることができた。microRNA-210-3 は腎癌においては正常腎組織と比べて、その発現が上昇していたが、進行癌においては逆にその発現は低下しており、癌抑制的作用を有することが明らかになった。その標的電子の一つとして癌遺伝子的作用を有する TWIST1 が挙げられ、 Kaplan-Meier 解析では予後予測因子であることが判明した。

2017年度は、腎癌で発現が亢進していた miR-1274a に着目し、anti-miR を用いた発現抑制による機能解析を行った。その結果、anti-miR 投与群で細胞増殖・浸潤・遊走能が著明に抑制された。miR-1274a は腎癌臨床検体においては正常腎組織と比べて、その発現が上昇していた。その標的電子の一つとして癌抑制的作用を有する bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPRI1B) がピックアップされた。癌抑制的作用を有する BMPRI1B は癌遺伝子的 miR-1274a により直接制御されることがルシフェラーゼアッセイで明らかになった。TCGA のデータベース解析により、BMPRI1B 低発現は生命予後不良因子であることが確認された。また、腎癌における HIF2 阻害薬の耐性獲得機序において PHGDH 遺伝子の発現が亢進しており、セリン合成経路を活性化していることを突き止め、PHGDH の阻害薬が耐性克服に有効であることが示唆された。

最終年度はスニチニブ耐性腎細胞癌におけるマイクロ RNA 発現プロファイルにおいて発現低下を認めた miR-99a-3p に着目し、miR-99a-3p を起点とするスニチニブ耐性獲得の機序と、miR-99a-3p が制御する分子ネットワークの探索を行った。転移性腎細胞癌においてスニチニブは最も一般的な一次分子標的薬であるが、スニチニブ耐性の分子機構は曖昧なままである。本研究では当科で樹立したスニチニブ耐性腎細胞癌細胞株 (SU-R-786-o) に miR-99a-3p を核酸導入し、細胞の増殖・細胞周期・細胞死誘導について機能解析を施行した。SU-R-786-o を用いた RNA シークエンス発現解析と in silico 解析により、標的遺伝子群の探索を行った。標的遺伝子の機能解析は、siRNA を用いて行った。さらに The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータベースを用いて miR-99a-3p やその標的遺伝子の発現を解析した。miR-99a-3p は親細胞と比べ SU-R-786-o において発現抑制が認められた。miR-99a-3p を SU-R-786-o に核酸導入する事で、癌細胞の増殖が有意に抑制され、アポトーシスが誘導された。miR-99a-3p が制御する分子として、DNA の重合および修復に必要なデオキシヌクレオチドの合成に参与する RRM2 が挙げられた。RRM2 は SU-R-786-o で発現が亢進しており、siRNA を用いた機能解析から、SU-R-786-o においてアポトーシスを介した増殖能の抑制を認めた。また腎癌患者において RRM2 の高発現群

は予後不良因子である事が示された。miR-99a-3p は、スニチニブ抵抗性腎癌細胞において癌抑制的作用を有することが示唆された。miR-99a-3p の機能解析を通じてスニチニブ耐性腎細胞癌の新規分子ネットワークの一端が明らかとなった

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Osako Y, Yoshino H, Sakaguchi T, Sugita S, Yonemori M, Nakagawa M, Enokida H. Potential tumor-suppressive role of microRNA-99a-3p in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells through the regulation of RRM2. *Int J Oncol*. 査読有, 2019;54:1759-1770.
DOI:10.3892/ijo.2019.4736
2. Sakaguchi T, Yoshino H, Sugita S, Miyamoto K, Yonemori M, Osako Y, Meguro-Horike M, Horike SI, Nakagawa M, Enokida H. Bromodomain protein BRD4 inhibitor JQ1 regulates potential prognostic molecules in advanced renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 査読有,2018;9:23003-23017.
DOI:10.18632/oncotarget.25190
3. Yoshino H, Yonezawa T, Yonemori M, Miyamoto K, Sakaguchi T, Sugita S, Osako Y, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H. Downregulation of microRNA-1274a induces cell apoptosis through regulation of BMPR1B in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 査読有,2018;39:173-181.
DOI: 10.3892/or.2017.6098.
4. Yoshino H, Nohata N, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Sugita S, Itesako T, Kofuji S, Nakagawa M, Dahiya R, Enokida H. PHGDH as a Key Enzyme for Serine Biosynthesis in HIF2⁻-Targeting Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 査読有, 2017;77:6321-6329.
DOI: 0.1158/0008-5472.CAN-17-1589.
5. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, Nakagawa M, Enokida H. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 査読有, 2017;8:20881-20894.
DOI: 10.18632/oncotarget.14930.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Suppression of oncogenic microRNA-1274a suppression induces cell apoptosis through BMPR1B acceleration in renal cell carcinoma.
Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Masayuki Nakagawa.
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
2. The dual-stranded microRNA-199 family members have tumor-suppressive function via directly targeting integrin & 3(ITGA3) as a potential therapeutic target in bladder cancer.
Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Masayuki Nakagawa.

- 2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
3. The tumor suppressor microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer.
Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
 4. Metabolism re-programming as a therapeutic target for drug resistant renal cell carcinoma.
Hirofumi Yoshino, Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
 5. Bromodomain protein BRD4 as a potential therapeutic target in sunitinib-resistant renal cell carcinoma.
Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
 6. Osako Y. Targeting Sunitinib Resistant cells by tumor suppressive miRNA-99a-3p through ribonucleotide reductase regulation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.
Osako, Youichi, Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
 7. Tumor-suppressive microRNA-26a-5p/-26b-5p inhibit cancer cell migration and invasion through targeting PLOD2 that is a potential prognostic marker in bladder cancer.
Kazutaka Miyamoto, Naohiko Seki, Ryosuke Matsushita, Masaya Yonemori, Hirofumi Yoshino, Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa.
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston USA).
 8. The dual-stranded microRNA-199 family members (miR-199a-3p/-5p and miR-199b-3p/-5p) are potential prognostic markers and have tumorsuppressive function via directly targeting integrin $\alpha 3$ (ITGA3) in bladder cancer.
Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Hideki Enokida.
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston USA).
 9. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cell aggressiveness by regulating WDR62 in bladder cancer.
Satoshi Sugita, Hirofumi Yoshino, Kazutaka Miyamoto, Masaya Yonemori, Takashi Sakaguchi, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Hideki Enokida.
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston USA).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~urology/index.php

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榎田 英樹
ローマ字氏名：Enokida Hideki
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学総合研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80347103

研究分担者氏名：関 直彦
ローマ字氏名：Seki Naohiko
所属研究機関名：千葉大学
部局名：大学院医学研究院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50345013

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉野 裕史
ローマ字氏名：Yoshino Hirofumi

研究協力者氏名：松下 良介
ローマ字氏名：Matsushita Ryouzuke

研究協力者氏名：宮元 一隆
ローマ字氏名：Miyamoto Kazutaka

研究協力者氏名：米森 雅也
ローマ字氏名：Yonemori Masaya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。