

令和元年6月12日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08724

研究課題名(和文)腎細胞がんにおけるmiRNA発現の網羅的解析を主体とする多層的オミックス統合解析

研究課題名(英文)Comprehensive exploration of microRNA expression in renal cell carcinomas by microarray analysis with omics data

研究代表者

後藤 政広 (Gotoh, Masahiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：00291138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞がん95症例におけるmiRNA異常を網羅的に解析した。がん組織で発現異常を示した191分子を同定し、パスウェイ解析により4つの分子経路が判明した。最も有意だった上皮間葉移行(EMT)分子経路にはmiR-200ファミリーの5分子が含まれており、また、腎がん細胞株を用いた解析においてmiR-200ファミリーの発現レベルがEMT制御に關与することを証明した。さらに、miR-200ファミリーおよび標的遺伝子CDH1の発現レベルは腎細胞がんの悪性進展や症例の予後に有意に逆相関していることが判明し、miR-200ファミリーの発現低下が腎細胞がんの悪性進展、特にEMT等に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は多数の腎細胞がん症例より得られた質の高いがんおよび対照非がん腎組織検体を用いてmiRNA発現の網羅的解析を行い、腎細胞がんの臨床病理学的悪性度と症例の予後を規定するmiRNAを同定し、腎がんにおけるmiRNA発現異常の意義を明らかにした。今後、本研究成果を新規治療標的候補やコンパニオン診断マーカーに応用し、腎細胞がんの個別化医療を目指しており、十分に学術的・社会的意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis revealed that 191 miRNAs showed significantly elevated or reduced expression in tumorous tissues of 95 renal cell carcinoma (RCC) cases. Expression alterations of 191 such miRNAs were significantly accumulated in four pathways, which included epithelial-mesenchymal transition (EMT) by MetaCore pathway analysis. Expression levels of 5 EMT-related miRNAs, known as the miR-200 family, were frequently reduced in tumorous tissues. Transfection assay of RCC cell lines also demonstrated that expression levels of the miR-200 family were related to regulation of EMT. Reduced expression of the miR-200 family and/or their target CDH1 mRNA in tumorous tissues was significantly correlated with clinicopathological parameters reflecting tumor aggressiveness, and inversely correlated with the survival rates of patients with RCCs. These data suggest that reduced expression of the miR-200 family may participate in the malignant progression of RCCs resulting in poorer patient outcome.

研究分野：がんの分子病理学

キーワード：マイクロRNA 腎細胞がん miR-200 EMT

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 最も頻度の高い成人腎腫瘍である腎淡明細胞がんでは、p53 等他の成人固形腫瘍で頻発する遺伝子変異の頻度が概して低く、ドライバー変異とされる VHL あるいは PBRM1 遺伝子変異も全症例には検出されず、発がんの分子経路について不明な点が多い (Maher ER. *Semin Cancer Biol* 2013;23:10)。このため治療戦略が定まらず、腎摘除術後の転移・再発症例の予後は極めて不良である。免疫療法等が行われるが、サイトカイン治療の奏効率は 20%程度にとどまっている。期待された VEGF チロシンキナーゼ阻害剤についても全生存の改善は顕著でなく、適切なコンパニオン診断マーカーを伴った新規の有効な治療標的の同定が現在も強く求められている (Logan JE, et al. *Rev Urol* 2012;14:65)。

(2) 近年、microRNA (miRNA)が多数の標的 mRNA からの翻訳開始を阻害し、あるいは標的 mRNA の分解を誘導することによって、発生・分化・増殖等に関わることが知られるようになった (Front Genet 2014;5:283 [review]等)。miRNA 自体の発現調節機構については、DNA メチル化異常等のエピジェネティック機構も想定されている (Cancer Cell 2012;22:9)。すなわち miRNA は、ゲノム・エピゲノム情報と mRNA・タンパク質発現をつなぐ鍵として細胞の遺伝子発現プロファイルの決定に不可欠な寄与をなし、多様な生命現象を司ると理解される。それぞれ発がん促進的・抑制的に働く oncogenic miRNA と tumor suppressive miRNA の双方が知られ、miRNA の発がん過程への寄与は諸臓器において多様であることから、多数の質の高いがんと対照の臨床試料を用いて実際に網羅的解析を行い miRNA 異常の全容を明らかにすることが望まれる。しかしながら腎細胞がんにおいては、従来、oncogenic あるいは tumor suppressive な機能がよく知られた少数の miRNA に絞って発現等を報告する文献が多く (J Exp Clin Cancer Res 2015;34:107, Oncotarget 2015;6:32545, Cell Prolif 2015;48:593 等)、miRNA 発現の網羅的解析結果の報告は少ない。さらに、ゲノム・エピゲノム情報と mRNA・タンパク質発現プロファイルをつなぐ (多層のオミックス情報を有機的に連結させる) miRNA を核にしたビッグデータ解析の試みは、腎細胞がんにおいて充分になされているとは言えない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は多数の腎細胞がん症例より得られた質の高いがん組織検体と対照非がん腎組織検体を用いて miRNA 発現の網羅的解析を行い、腎発がんにおける miRNA 異常の意義を明らかにすることを第 1 の目的とする。DNA メチル化異常等によりそれ自身が発現制御され、細胞生存能・増殖能・アポトーシス・接着能・運動能・浸潤能に関わる標的機能分子の発現を制御し、腎細胞がんの臨床病理学的悪性度と症例の予後を規定する miRNA を網羅的に同定する。

(2) さらに miRNA 発現プロファイルを同一検体のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム情報とともにビッグデータ解析に供し、腎発がん分子機構全容の理解を進め、腎細胞がんの新規治療標的候補を同定することを第 2 の目的とする。これにより miRNA 発現異常等をコンパニオン診断マーカーとする腎細胞がん個別化医療のブレイクスルーに繋げることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 腎発がんにおける miRNA 異常の意義を明らかにするため、国立がん研究センター中央病院において手術により切除された腎淡明細胞がん 95 症例のがん組織 (T)および非がん腎皮質組織 (N)の余剰検体から抽出した RNA 試料を用いて miRNA 発現アレイによる網羅的解析を行った。次に、腎細胞がんにおいて発現異常を示す miRNA を用いて MetaCore パスウェイ解析を行い、腎細胞がんの臨床病理学的悪性度と症例の予後を規定する miRNA の同定を行った。

(2) miRNA 発現アレイ解析の結果を検証するため、RNA 試料の再利用可能であった腎細胞がん 92 症例の T および N を用いて定量 RT-PCR 法を行った。

(3) 腎細胞がんにおける miR-200 ファミリーの作用機序を検証するため、腎細胞がん株を用いて、miR-200 ファミリーの miRNA ミミックおよび miRNA インヒビターを細胞導入して 48 時間培養した後、定量 RT-PCR 法を行った。また、導入細胞において Transwell を用いたインベーションアッセイを行った。

(4) miR-200 ファミリーの発現調節機構を明らかにするため、腎細胞がん 92 症例のエピゲノムデータを用いて DNA メチル化状態を評価し、腎細胞がん株に脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine を処理後、定量 RT-PCR 法を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 腎細胞がん 95 症例の miRNA 発現アレイ解析の結果、T における発現が N に比べて有意に変化した miRNA のうち、2 倍以上発現亢進していた 39 分子および 1/2 未満に発現低下していた 152 分子、合わせて 191 分子の miRNA を同定した。次に、腎細胞がんにおいて発現異常を示す miRNA 191 分子を用いて MetaCore パスウェイ解析を行ない、これらの miRNA が 4 つの分子経路に有意に集積することを突き止めた (表 1)。この内、最も有意だった上皮間葉移行 (EMT) に関わる分子経路では miR-200 ファミリーとして知られる miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429 が関わっていた。

Pathways	P value	Involved miRNA	Expression
Development miRNA-dependent inhibition of EMT	$8.70 \times 10^{-15}$	miR-141 miR-200a miR-200b miR-200c miR-429	T<N T<N T<N T<N T<N
Hyaluronic acid/ CD44 signaling in cancer	$2.44 \times 10^{-6}$	miR-21 miR-10b*	T>N T<N
Development regulation of lung epithelial progenitor cell differentiation	$2.23 \times 10^{-3}$	miR-17* miR-20a*	T<N T<N
Immune response IL-10 signaling pathway	$5.04 \times 10^{-3}$	miR-155	T>N

表 1. miRNA 191 分子を用いた MetaCore パスウェイ解析の結果

miRNA	Case	Frequency (%)
Has-miR-141	47	49.5
Has-miR-200a	76	80.0
Has-miR-200b	79	83.2
Has-miR-200c	93	97.9
Has-miR-429	87	91.6

表 2. 腎細胞がん 95 症例における miR-200 ファミリーの発現低下

腎細胞がん 95 症例の miRNA 発現アレイ解析の結果から、miR-200 ファミリーの 5 つの miRNA 発現は T において高頻度に低下しており、特に miR-200c 発現は 95 症例中 93 症例 (97.9%) で低下が認められた (表 2)。

(2) 腎細胞がん 92 症例の定量 RT-PCR 法を行い、miR-200 ファミリーの 5 つのメンバーとターゲット遺伝子 *ZEB1*、*ZEB2*、さらに下流のターゲット遺伝子 *CDH1* の発現を調べると、T における *ZEB1*、*ZEB2* の発現は有意に亢進し、*CDH1* の発現は有意に低下していた。さらに miR-200 ファミリーおよび *CDH1* の発現レベルは腎細胞がんの悪性進展や症例の予後に有意に逆相関しており (図 1)、miR-200 ファミリーの発現低下が腎細胞がんの悪性進展、特に EMT 等に寄与する可能性が示唆された。

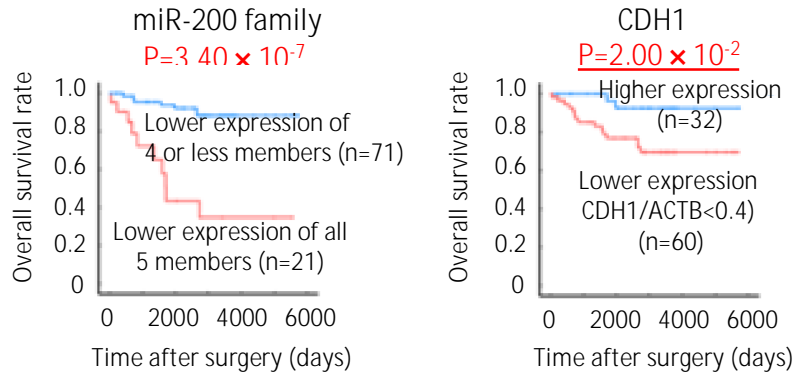


図 1. miR-200 ファミリーおよび *CDH1* の発現レベル別の全生存曲線

(3) 通常培養下で miR-141 および miR-200c の発現が低い腎細胞がん株 786-O 細胞に miR-141 または miR-200c の miRNA ミミックを導入したところ、miR-200 ファミリーのターゲット遺伝子である *ZEB1*、*ZEB2* の mRNA 発現はコントロールに比して有意に低下し、さらに下流の *CDH1* の mRNA 発現は有意に亢進した。一方、通常培養下で miR-200 ファミリーの miRNA 発現が比較的高い腎細胞がん細胞株 ACHN 細胞に 5 つの miRNA インヒビター (miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429) を混合導入したところ、*ZEB1* の mRNA 発現はコントロールに比して有意に亢進し、*CDH1* の mRNA 発現は有意に低下した。また、細胞浸潤における miRNA-200 ファミリーの影響を確認するため、腎細胞がん細胞株 786-O 細胞に miR-200c の miRNA ミミックを細胞導入し 24 時間培養した後、Transwell を用いたインベー

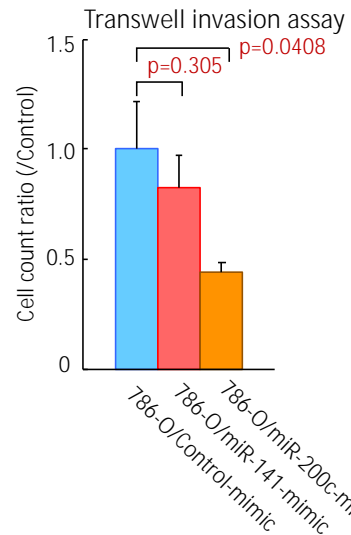


図 2. miRNA ミミック導入による浸潤能の変化

ジョンアッセイを行ったところ、導入細胞の浸潤能はコントロールに比して有意に低下した (図 2)。

(4) 腎細胞がん 92 症例のエピゲノムデータを用いて DNA メチル化状態を評価し、T における 12 番染色体上 miR-200 (miR-141/miR-200c) クラスター転写調節領域の DNA メチル化が、N に比して有意に亢進しているのを認めた。さらに、腎細胞がん株 (Caki-1、Caki-2、A-498、786-O) に脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine を処理すると、miR-141 および miR-200c の発現が回復することを確認した (図 3)。このことより、miR-200 ファミリーの miRNA 発現は DNA メチル化によって抑制されている可能性が示唆された。

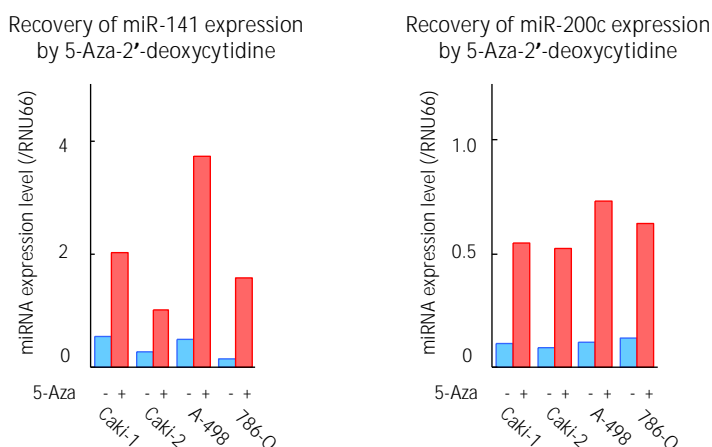


図 3. 脱メチル化剤処理による miR-141 および miR-200c の発現変化

(5) 以上、本研究において腎細胞がんの臨床病理学的悪性度と症例の予後を規定する重要な miRNA である miR-200 ファミリーを同定した。近年、がんにおいて DNA メチル化等のエピジェネティック機構に基づいた治療法が開発されるようになり (引用文献)、また、肺がんや乳がんを接種したマウスモデルにおいて miR-200 ファミリーを含むリポソームナノ粒子投与実験で腫瘍が縮小した報告 (引用文献) 等もあることから、今後は腎細胞がんの新規治療法やコンパニオン診断マーカーへの応用を視野に入れた検討を行なおうと考えている。

#### <引用文献>

Sato T, Issa JJ, Kropf P. DNA Hypomethylating Drugs in Cancer Therapy. Cold Spring Harb Perspect Med 7: doi: 10.1101/cshperspect.a026948, 2017

Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, Wu S, Han HD, Shah MY, Rodriguez-Aguayo C, Bottsford-Miller J, Liu Y, Kim SB, Unruh A, Gonzalez-Villasana V, Huang L, Zand B, Moreno-Smith M, Mangala LS, Taylor M, Dalton HJ, Sehgal V, Wen Y, Kang Y, Baggerly KA, Lee JS, Ram PT, Ravoori MK, Kundra V, Zhang X, Ali-Fehmi R, Gonzalez-Angulo AM, Massion PP, Calin GA, Lopez-Berestein G, Zhang W, Sood AK. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. Nat Commun 4:2427, 2013

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

後藤 政広、新井 恵吏 他、The functional analysis of miR-200 family in renal cell carcinoma. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年

後藤 政広、新井 恵吏 他、マイクロ RNA-200 ファミリーの発現低下は腎臓明細胞がんの悪性進展に関与する、第 105 回日本病理学会総会, 2016 年

GOTOH Masahiro, ARAI Eri, et al. Reduced expression of microRNA-200 family associated with aggressiveness and poorer patient outcome of clear cell renal cell carcinomas. AACR Annual Meeting, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名: 新井 恵吏

ローマ字氏名: (ARAI Eri)

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 40446547