

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16099

研究課題名(和文) 副甲状腺機能亢進症における腫瘍化関連microRNA同定と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of tumor-associated microRNAs in hyperparathyroidism

研究代表者

金井 厳太 (KANAI, Genta)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00535221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、副甲状腺受容体を介して機能を制御するmiRNAを同定するため、腫瘍化や機能制御に関連するmiRNAがSHPTの進展予測および治療抵抗性のマーカーとして機能するかを検証した。二次性副甲状腺機能亢進症患者から摘出した副甲状腺の最大腺および最小腺より抽出したRNAを用いてNGS RNAシーケンサーを使用しmiRNAの網羅的解析を行った。代表的な20配列中で既知の機能を持つmiRNAの他に新たに4つの配列で有意差が認められた。In vitroでこれらの配列が3' UTR領域における相補配列を有する標的mRNAに対する機能を検討したところ、p21/27に関連する作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって副甲状腺の段階的腫瘍化仮説における遺伝子発現調節機序の一端が解明されることで、難治性の二次性副甲状腺機能亢進症における進展メカニズムを理解する一助となり、患者の生命予後にかかわる慢性腎臓病における骨ミネラル代謝異常の治療戦略における新たな基礎的知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to identify miRNAs that regulate function through parathyroid receptors, we examined whether miRNAs associated with tumorigenesis and functional regulation could serve as predictors of SHPT progression and markers of treatment resistance. RNA extracted from the maximal and minimal glands of the parathyroid gland from a patient with secondary hyperparathyroidism was used for comprehensive analysis of miRNAs using NGS RNA sequencing.

In addition to miRNAs with known functions among 20 representative sequences, four new sequences showed significant differences in function. In vitro, these sequences were examined for function against target mRNAs with complementary sequences in the 3'UTR region, and an action associated with p21/27 was observed.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：副甲状腺機能亢進症 microRNA 次世代シーケンサー 慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)における二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)は心血管疾患の合併により、生命予後を脅かす重大な疾患である。発生メカニズムが不明のため、既存治療に抵抗性を示すSHPTの予測や原因同定が困難となっている。

SHPTではVDR・CaSR発現が低下することで反応性を喪失し(Ho C et al. Nat Genet, 1995)副甲状腺ホルモン(PTH)分泌調節機構を破綻させ副甲状腺腫瘍化を誘導する。我々はPTH分泌調節機構にRNAiが関与していることを報告してきたが(Kanai G et al. Kidney Int, 2009)副甲状腺の増殖メカニズムについての関与は不明な点が多い。

miRNAは18-26塩基のno-coding RNAで、mRNAに結合することにより細胞増殖、アポトーシス、代謝などに関連する多くの遺伝子やタンパク質の発現を制御している。miRNAは正常組織と腫瘍組織では発現量や種類が異なり、血液や尿などに分泌されるmiRNAは新たなバイオマーカーとして期待されている。miRNAの細胞機能制御に注目した創薬研究も盛んである。しかしながら副甲状腺のmiRNAはまだSHPTの特徴を明らかにできておらず、VDR・CaSRの発現や機能を制御するmiRNAについても十分な検討が行われていない。

私たちこれまでに、ヒト副甲状腺培養系を作成しsiRNAを用いてPTH産生および分泌を抑制することで、副甲状腺におけるRNAiを利用した機能制御の可能性を明らかにした。しかし、現在まで副甲状腺におけるmiRNA解析報告では癌や腺腫に比較して過形成腫瘍に特徴的なmiRNAの発現は報告されておらず、CKDに伴うSHPTに関するmiRNAの詳細な検証はこれまで行われていない。近年、副甲状腺におけるDicer knockoutモデルによってCaSRを介したPTH分泌機構にmiRNAが関与していることが明らかとなった(Shilo V et al. FASEB J, 2015)。また、SHPTでは副甲状腺サイズの増大に伴ってVDR・CaSRの発現低下が認められることから、これらの分子が腫瘍化に関連することが示唆されている(Arcidiacono MV et al. J Am Soc Nephrol, 2008)。

これまでの報告よりmiRNAの網羅的解析により、SHPTにおけるVDR・CaSRを介して機能を制御するmiRNAを明らかにする必要があると考えた。組織中のmiRNA発現量は制御するタンパク質の発現量と反比例することから、VDR・CaSRの発現制御に関わるmiRNAもVDR・CaSRの発現低下と反比例して発現量が増幅すると推測される。そこで、組織中の増幅したVDR・CaSR関連miRNAの発現量を測定することで、VDR・CaSR関連miRNAがSHPTの進展予測および治療抵抗性のマーカーとなりえるのではないかと考え、さらに、SHPTの進展に関わるVDR・CaSR関連miRNAを制御することで、既存治療薬の効果増強やVDR・CaSR関連miRNAに対する新たな分子標的治療の開発が望めるのではないかと着想した。このような背景から本研究ではVDR・CaSRの発現を制御するmiRNAを明らかにし、VDR・CaSR関連miRNAを対象とした新規バイオマーカーや治療法の開発における基盤研究を行うことを計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の特色・独自性のある点は、これまで検討されていないVDR・CaSRを制御する未知のmiRNAを網羅的解析により明らかにすることである。これによりSHPT進展に関与するVDR・CaSRの発現制御機構の解明が期待される。

### (1) VDR・CaSRの発現を制御する未知のmiRNAを明らかにする

透析患者から摘出された副甲状腺を対象として、次世代シーケンシングを用い網羅的に解析する。これによりVDR・CaSRの発現に関連するmiRNAを明らかにする。摘出された副甲状腺では受容体発現低下のある最大腺と正常に近い最小腺との間で比較、副甲状腺培養細胞を用いてVDR・CaSR knockdown細胞を作成しnegative control細胞の間で比較することによりVDR・CaSR関連miRNAを明らかにする。

### (2) VDR・CaSR関連miRNAがSHPTのバイオマーカーとなりえるかを明らかにする

Real-time PCR(RT-PCR)およびin situ hybridization(ISH)を用いて、1)で明らかにしたVDR・CaSR関連miRNAが摘出標本および組織切片上で検出可能か明らかにする。またVDR・CaSR関連miRNAが血液・尿から検出可能か検討し、摘出標本および組織切片のVDR・CaSR関連miRNAの発現量と比較する。さらに、CKD軽症・重症患者、SHPT術前・術後でVDR・CaSR関連miRNAの発現を比較することで、SHPTのバイオマーカーとして利用可能か明らかにする。

### (3) VDR・CaSR関連miRNAを用いた分子標的療法がSHPTに有効かどうかを明らかにする

VDR・CaSR関連miRNAをknockdownすることによりVDR・CaSR関連miRNAの単独knockdownで細胞増殖の抑制あるいはアポトーシス誘導作用があるか明らかにする。

## 3. 研究の方法

#### (1) VDR・CaSR 関連 miRNA の解明

NGS RNA シーケンサー (illumina) を用いて VDR・CaSR 関連 miRNA を網羅的に探索する。検出した VDR・CaSR 関連 miRNA を knockdown し VDR・CaSR の発現変動を検証する。

摘出標本および副甲状腺培養細胞を用いた網羅的 miRNA 解析

SHPT 患者から摘出した副甲状腺の重量を計測し最大腺および最小腺より、また副甲状腺培養細胞における VDR・CaSR knockdown および negative control 細胞より miRNeasy kit を用い miRNA を含む全 RNA を抽出精製する。得られた RNA を用いて NGS RNA シーケンサー (illumina) を使用し miRNA を網羅的に解析する。摘出標本はホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い VDR・CaSR の免疫組織化学を施行する。組織切片上で受容体発現低下がある単結節部分と正常組織を含むびまん性結節部分をそれぞれ選択的に回収後、全 RNA を抽出する。得られた RNA を用いて miRNA を網羅的に解析する。VDR・CaSR 陰性細胞と VDR・CaSR 陽性細胞間での miRNA の発現量を比較し、VDR・CaSR の発現制御に関連すると想定される miRNA を絞り込む。

RNAi による VDR・CaSR knockdown

副甲状腺培養細胞の VDR 遺伝子および CaSR 遺伝子発現をそれぞれ RNAi (siRNA または shRNA) により knockdown し、RT-PCR および Western blotting で VDR・CaSR の knockdown 効率を確認する。対照として、negative control RNAi をトランスフェクションした副甲状腺培養細胞を用いる。

VDR・CaSR を制御する miRNA の検証

上記で見出した VDR・CaSR 発現制御に関連すると想定される候補 miRNA を対象に、副甲状腺培養細胞で miRNA inhibitor および mimic を用いて調整した後、VDR・CaSR 発現量および細胞増殖関連因子が変動するか RT-PCR および Western blotting で検証する。

#### (2) 組織中の VDR・CaSR 関連 miRNA の検出とその意義の解明

摘出組織で RT-PCR および ISH を行い、VDR・CaSR 関連 miRNA を検出し組織内での発現を比較する。

摘出標本での VDR・CaSR 関連 miRNA 発現検証

前年度の研究で得られた結果を元に VDR・CaSR 関連 miRNA を対象としてプローブをデザインし、摘出標本を用いて RT-PCR を行う。病理組織切片を用いて ISH を行い、これらの発現結果と VDR・CaSR の免疫組織学の発現を比較し相関関係を検討する。また、RT-PCR、in situ hybridization の結果と臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析する。

#### (3) VDR・CaSR 関連 miRNA を対象とした分子標的治療の検討

VDR・CaSR 関連 miRNA knockdown 細胞で既存治療薬に対する影響と細胞増殖抑制効果を明らかにする。

VDR・CaSR 関連 miRNA の knockdown による機能制御と増殖抑制効果の検討

副甲状腺培養細胞を用いて VDR・CaSR 関連 miRNA を knockdown し、培養上清 PTH を ELISA にて測定し cell proliferation assay にて分泌能と増殖能を検討する。

### 4. 研究成果

摘出標本を用いた網羅的 miRNA 解析では、二次性副甲状腺機能亢進症患者から摘出した副甲状腺の重量を計測し最大腺および最小腺より、得られた RNA を用いて NGS RNA シーケンサー (illumina) を使用し miRNA を網羅的に解析した。最大腺 (受容体発現陰性細胞) と最小腺 (受容体発現陽性細胞) 間での miRNA の発現量を比較し、受容体分子の発現制御に関連すると想定される miRNA を絞り込み、副甲状腺組織から抽出した total RNA から MiSeq を用いて small RNA sequencing を実施した。Small non-coding RNA 配列マッピングには human miRNA database(miRBase)を利用した。

(1) 抽出された配列の 21.67% が database に一致した。上位 50 の配列において miR-27b の発現が最も多く、最小腺に比較して miR-10 は 4.5 倍の発現を認めた。最大腺および最小腺に特異な 18 配列では miR-134 と miR-211 が特徴的な発現を示した。代表的な 20 配列中で既知の機能を持つ miRNA の他に新たに 4 つの配列で有意差が認められた。未知の Small non-coding RNA においてもいくつかの配列で有意差が認められた。副甲状腺重量で異なるこれら miRNA が副甲状腺の増殖・分泌に関わる転写後調節に影響する可能性が示唆された。

(2) 既存の発現分子との関連を調べるため、副甲状腺のホルマリン固定パラフィン包埋標本からの遺伝子発現解析を試みた。副甲状腺に発現する PTH、CASR、VDR、FGFR1、KL、MKI67 を対象として RT-PCR にて mRNA の発現を測定した。相関分析では miR148a は CASR、FGFR1、PTH において中程度の負の相関を認めた。副甲状腺内に存在する複数の結節毎の発現を比較したところ、プロファイルに差異を認めたことから SHPT の進行過程における増殖背景に miRNA が寄与する可能性が考えられた。SHPT の進行過程におけるモノクローナル増殖の背景には遺伝的変異が関与することが知られており、今回、私たちはここに miRNA の関与があるという仮

説を立証するため、副甲状腺内における段階的な腫瘍化モデルとして、各組織の単結節およびびまん性結節部位で遺伝子発現が異なるという命題を立てた。そこで、摘出された副甲状腺のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、miR-148 について ISH を行った結果、結節毎に発現強度が異なることが明らかになった。これらのことから、副甲状腺の段階的腫瘍化仮説における遺伝子発現調節に特定の miRNA が関連する可能性が考えられた。

(3) In vitro では新たな 4 配列において TargetScan によって 3'UTR 領域における相補配列を含む特性から標的 mRNA に対する機能を検証したところ、p21/27 に関連する作用が認められた。特定された一部の配列に対する miRNA inhibitor と miRNA mimic を培養細胞へ導入すると、miRNA mimic で調整した細胞では観察期間中に明らかな増殖が認められ、RT-PCR においても細胞増殖分子の増加が認められた。この配列は TGFA と CDKN1B を標的としており、線維芽細胞の抑制因子並びに副甲状腺細胞における増殖因子と考えられた。この結果は、腫瘍化の進行した副甲状腺において遺伝子発現プロファイルが異なることを示唆しており、SHPT の進行過程において機能性 RNA の発現と受容体および細胞周期に関連する分子が同時に変化している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>金井 厳太                      |
| 2. 発表標題<br>二次性副甲状腺機能亢進症におけるmicroRNA解析 |
| 3. 学会等名<br>日本腎臓学会                     |
| 4. 発表年<br>2018年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Genta Kanai  |
| 2. 発表標題<br>MicroRNA Analysis in Secondary Hyperparathyroidism |
| 3. 学会等名<br>American Society of Nephrology (国際学会)              |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 澤田 佳一郎<br><br>(SAWADA Kaichiro)<br><br>(10420952) |                       |    |