

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16723

研究課題名(和文)機能性RNAネットワーク解析に基づく腎細胞癌治療抵抗性獲得機序の探索

研究課題名(英文)Identification of molecular mechanisms leading to treatment resistance in renal cell carcinoma based on functional RNA network analyses

研究代表者

新井 隆之(Arai, Takayuki)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40793055

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):我々の腎細胞癌細胞におけるマイクロRNA発現プロファイルの中で、発現が低下しているmiR-532-5p/3p(ガイド鎖/パッセンジャー鎖)に着目した。これらマイクロRNAの低発現は、臨床的に腎細胞癌患者の予後不良と有意に関連しており、その過剰発現は腎細胞癌細胞の進展性を顕著に阻害した。この2つのマイクロRNAが共に標的とする癌促進遺伝子候補としてAQP9を同定した。AQP9は腎細胞癌臨床検体組織で発現が亢進しており、knockdown assay及びrescue assayの結果から、その癌促進的機能を証明した。miR-532/AQP9軸が腎細胞癌細胞の進展に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の解析対象となるマイクロRNAは、これまで論文報告が殆ど無く、これらマイクロRNAが制御する分子経路の探索は、学術的新規性を有している。また、本研究で得られたマイクロRNAや分子は、腎細胞癌における新規予後バイオマーカーや治療標的としての可能性を秘めており、本疾患の分子機構解明に有益な情報を提供できると考える。

研究成果の概要(英文):Analyses of our previously determined microRNA (miRNA) expression signature of renal cell carcinoma (RCC) and The Cancer Genome Atlas database revealed that both strands of the pre-miR-532-duplex-miR-532-5p (the guide strand) and miR-532-3p (the passenger strand) are closely associated with poor prognosis of RCC patients. Ectopic expression of these miRNAs significantly attenuated the malignant phenotypes of RCC cells. A combination of genome-wide gene expression and in silico database analyses revealed AQP9 as a putative target oncogene regulated by miR-532-5p and miR-532-3p in RCC cells. High expression levels of AQP9 were significantly associated with poor prognosis of RCC patients, and aberrant AQP9 expression was detected in RCC clinical specimens. Knockdown of AQP9 inhibited the malignant phenotypes of RCC cells. Rescue assays of AQP9 overexpression showed that the miR-532/AQP9 axis was closely involved in RCC oncogenesis.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：マイクロRNA 癌抑制型マイクロRNA 腎細胞癌 miR-532-5p miR-532-3p AQP9

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は、成人悪性腫瘍の 2-5% を占めており、泌尿器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。初期の腎細胞癌は手術療法により根治を見込めるが、再発症例や遠隔転移を有する進行癌の 5 年生存率は 10% 未満と、予後は不良である。近年開発が相次いでいる分子標的薬治療の効果により、腎細胞癌切除不能進行症例や、治療後に遠隔転移を認めた症例の予後改善が認められている。しかしながら、多くの症例で腎癌細胞は、治療経過中に分子標的薬治療をはじめとする様々な治療に対する抵抗性を獲得する。治療抵抗に至った患者に対する有効な治療法は無く、患者の予後は極めて不良である。

### 2. 研究の目的

本研究では、治療抵抗性を獲得した腎細胞癌に対して、マイクロ RNA を起点とした機能性 RNA ネットワークの探索を行い、治療抵抗性獲得に関わる分子機序を解明する事を目的とした。さらに、本疾患の新規予後マーカーや治療標的となりえる分子を探索することを目的とした。

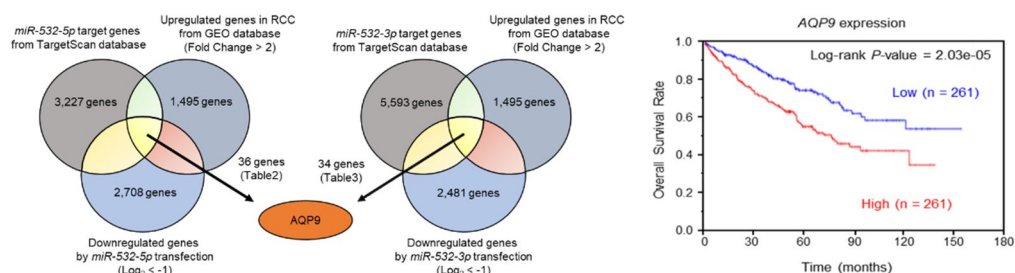
### 3. 研究の方法

本研究では、腎細胞癌患者の手術検体および、分子標的治療を施行後、死に至った剖検検体を用いて独自に作成したマイクロ RNA 発現プロファイルから、正常組織と比較し、癌部において発現の低下しているマイクロ RNA をがん抑制型マイクロ RNA の候補として抽出した。マイクロ RNA の機能解析は腎細胞癌細胞株 (786-O, A498) を用いて、細胞増殖・遊走・浸潤能を指標として行った。マイクロ RNA の制御する遺伝子群は公共データベースを用いて配列依存的に結合し得る遺伝子の抽出と、マイクロアレイ解析によりマイクロ RNA の核酸導入により発現低下を認める遺伝子の抽出を組み合わせる事でより有力な候補遺伝子を同定した。臨床データベース解析は The Cancer Genome Atlas を用いて行い、患者予後と遺伝子発現の関連を検討した。マイクロ RNA の遺伝子制御は luciferase reporter assay、PCR 法、ウエスタンブロッティング法により検討を行った。臨床検体における遺伝子発現解析は PCR 法、免疫染色法にて解析した。遺伝子の機能解析は siRNA による knockdown assay 及び vector を用いた rescue assay にて評価した。

### 4. 研究成果

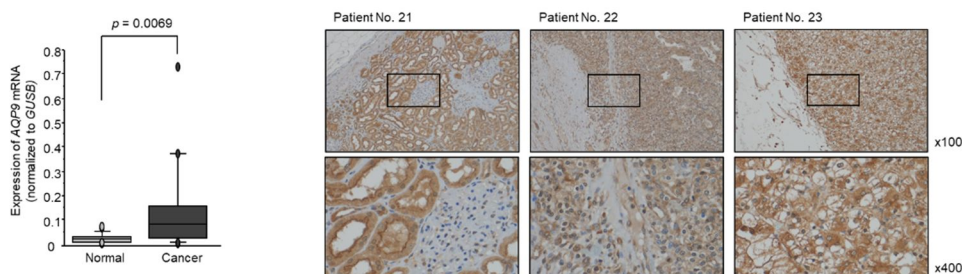
我々は、独自のマイクロ RNA 発現プロファイルから miR-532 に着目した。miR-532 はこれまでにガイド鎖である miR-532-5p が腎細胞癌に対して癌抑制的機能を有することが報告されているが、パッセンジャー鎖である miR-532-3p についての腎細胞癌における役割は解明されていない。腎細胞癌細胞株における機能解析結果から、miR-532-5p、miR-532-3p 共に癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を顕著に抑制する事が判明し、両者共に腎細胞癌における有力な癌抑制型マイクロ RNA である事を証明した。今回、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析と、The Cancer Genome Atlas のデータベース解析を組み合わせることで、これら 2 つのマイクロ RNA がともに制御する癌促進遺伝子の候補として、aquaporin9 (AQP9) を同定した (図 1)。

図 1



AQP9 は water channel protein をコードする遺伝子の一つであり、脳腫瘍においては AQP9 の異常発現が AKT 活性化を誘発し、E-カドヘリン発現を低下させ EMT を誘導することが報告されている。Luciferase reporter assay により miR-532-5p/-3p 両鎖が AQP9 を直接制御する事が示され、PCR 法、ウエスタンブロッティング法によっても miR-532-5p/-3p による発現制御が示された。AQP9 の発現は、mRNA/蛋白レベル共に腎細胞癌組織で上昇しており、腎細胞癌の発生・進展に関与している可能性が示された (図 2)。

図 2



また、siRNA 及び vector を用いた AQP9 の機能解析 (knockdown assay、rescue assay) の結果、腎細胞癌細胞における、AQP9 の癌促進的機能を証明した。このことから、miR-532/AQP9 の軸が腎細胞癌細胞の進展に重要である事が示唆された。

これら研究成果から、腎細胞癌の進展に AQP9 が関連し、新規バイオマーカー及び治療標的となる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamada Y, Nohata N, Uchida A, Kato M, Arai T, Moriya S, Mizuno K, Kojima S, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Replisome genes regulation by antitumor miR-101-5p in clear cell renal cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1392-1406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kato M, Kojima S, Sakamoto S, Komiya A, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of pre-miR-532 (miR-532-5p and miR-532-3p) in regulation of gene expression and molecular pathogenesis in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Clinical and Experimental Urology	6. 最初と最後の頁 11-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kojima S, Sugawara S, Kato M, Okato A, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 109
2. 論文標題 Regulation of antitumor miR-144-5p targets oncogenes: Direct regulation of syndecan-3 and its clinical significance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2919-2936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Y, Arai T, Kojima S, Sugawara S, Kato M, Okato A, Yamazaki K, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-tumor roles of both strands of the miR-455 duplex: their targets SKA1 and SKA3 are involved in the pathogenesis of renal cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 26638-26658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山田康隆、菅原翔、新井隆之、岡東篤、小島聡子、納谷幸男、市川智彦、関直彦
2. 発表標題 癌抑制型microRNA-451aの制御する腎癌分子ネットワークの探索
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada Y, Sugawara S, Arai T, Okato A, Kojima S, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. Antitumor miR-451a regulatory network is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma.
2. 発表標題 Antitumor miR-451a regulatory network is associated with poor prognosis of renal cell carcinoma.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新井隆之、岡東篤、小島聡子、黒住顕、加藤繭子、納谷幸男、市川智彦、関直彦
2. 発表標題 癌抑制型マイクロRNA(miR-10a-5p)が制御する治療抵抗性腎癌・新規分子ネットワークの探索
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田康隆、菅原翔、新井隆之、岡東篤、小島聡子、納谷幸男、市川智彦、関直彦
2. 発表標題 癌抑制型microRNA-451aの制御する腎癌分子ネットワークの探索
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田康隆、菅原翔、新井隆之、小島聡子、納谷幸男、市川智彦、関直彦
2. 発表標題 腎癌・癌抑制型マイクロRNA (microRNA-144 ) が 制御する分子ネットワークの探索
3. 学会等名 第28回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----