

平成 21 年 12 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591842

研究課題名（和文） ヒト腎細胞癌でマイクロRNAに制御される標的遺伝子と遺伝子ネットワークの検討

研究課題名（英文） Study of the target genes network in human renal cell carcinomas regulated by small RNAs.

研究代表者 岡田 裕作 (OKADA YUSAKU)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20127062

## 研究成果の概要：

われわれは、14q32 領域に存在する刷り込み遺伝子 GTL2 遺伝子と同じであり、GTL2 と同様 epigenetics で制御を受けている可能性が示唆された mir-127 について重点的に解析をおこなった。すなわち siRNA によるノックダウンシステムを腎癌細胞株において作成し得られた Wild 株とノックダウン株についてマイクロアレイを行い、さらにその結果を RT-PCR およびノーザンブロットでの確認を行った。この結果 14q32 領域の 5 つの miR (miR-433, miR-127, miR-299, miR-134, miR-154) の発現が腎癌細胞株で高頻度に消失している (83%) ことを明らかとした。しかしながら、腎癌発生に寄与する miR とその標的遺伝子の同定にまでは至っておらず今後の検討が必要とされる。また、miR 発現を制御する機構についても DNA メチル化だけではなくヒストンのメチル化・アセチル化の検討が必要と考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌、14 番染色体、DLK1, マイクロ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は日本国内では年間約 1 万人の発生をみる悪性腫瘍であるが、手術以外に根治的治療法がなく化学療法や放射線療法が有効でないため転移を伴う症例のほとんどが 2 年以内に死亡する。転移性腎細胞癌の一部にはインターフェロンやインターロイキンを中心とした免疫療法が効を奏することもあるがその奏効率は 15% 程度と満足すべきものではない。このような観点から腎細胞癌に対する新たな治療の必要性が提唱され近

年、分子標的薬剤が使われたしたが、その持続効果、副作用などまだまだ課題は多い現況である。こういった状況を踏まえるとき、腎細胞癌の発癌メカニズムを今一度分子遺伝学的立場から地道に明らかにすることは、本悪性腫瘍の発生のみならず発癌予防法、新たな分子マーカーの樹立といった意味で肝要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、発癌過程における microRNA (miR) の関与が注目されている。miR は 21~25 塩基程度

の小さい non-coding RNA であり、動植物に広く保存され、現在 300 以上の miR がクローニングされている。これらの miR は組織特異的・発生段階特異的に発現しており細胞の増殖・分化・アポトーシスなどに重要な役割を果たしていると考えられている。Calin らは、186 の miR に関してその染色体上の位置を検索し、多くの miR が癌と関連のある染色体の欠失・増幅部位に位置していることから、miR と発癌の関係を示唆している 1)。また、miR の特定クラスターの増幅によってリンパ腫が発生すること 2)、miR 発現プロファイリングによって正常細胞と癌細胞には miR 発現の差が存在し、messenger RNA (mRNA) の発現プロファイリングよりも正確であったことなどが報告され 3)、miR が癌発症にいたる新しいプロセスをもたらすことが立証されている。腎細胞癌において第 14 番染色体長腕の欠失は第 3 番染色体に次いで頻度の高い染色体欠失部位とされる。とくに highstage、high grade 腫瘍と相関関係が認められることから、同領域に癌の転移・浸潤に関わる分子が存在する可能性があると考えられてきた 4-6)。われわれは、すでに腎細胞癌において高頻度に染色体欠失 (LOH) が報告されている第 14 番染色体長腕に注目し 14q32 に存在する刷り込み遺伝子である DLK1 がヒト腎細胞癌の癌抑制遺伝子として機能し、DLK1/GTL2 領域の異常メチル化獲得が DLK1 の発現消失に大きくかかわっていることを報告した 7)。Calin らは、14q32 領域に miR クラスターが存在することを明らかにしており 1)、14q32 領域の miR が癌抑制遺伝子である可能性が示唆されている。

miR は複数の遺伝子発現を制御しているため、miR の発現制御機構の解明は重要であるが、どのような因子が miR の発現を調節しているかはいまだ明らかになっていない。しかし、miR が組織特異的・発生段階特異的に発現していることから miR も通常の RNA と同様に DNA メチル化やヒストン修飾などの epigenetic な制御を受けていることが予想される。Frigola らは大腸癌細胞を用いた実験で 2q14.2 領域全体 (4Mb) が DNA メチル化とヒストン H3 のヒストンテール第 9 番目の Lys 残基 (H3K9) のメチル化によって遺伝子発現抑制状態であることを示した 8)。このことは癌細胞において観察される epigenetic gene silencing が遺伝子単位の限局されたものではなく、染色体レベルで、しかも同時に起こりうる事象であることを示唆している。われわれは、腎細胞癌において 14q32 に存在する DLK1 遺伝子とその相補的刷り込み遺伝子 GTL2 の 1.8kb 上流に存在する CpG アイランドの異常メチル化によって不活化されていることを示したが、Frigola らの報告とわれわれの実験結果より 14q32 領域全体が DNA

メチル化やヒストン修飾によって不活化状態であることが考えられ、miR の不活化に関与している可能性は非常に高いと予想される。そこで本検討では第 14 番染色体長腕 telomere 側にクローニングされた 5 つの miR (miR-433, miR-127, miR-299, miR-134, miR-154) の腎細胞癌発生における役割を明らかにし、さらに腎癌発生にかかわる癌遺伝子的あるいは癌抑制的な未知の miR をクローニングすること、加えて従来から腎細胞癌の発生に寄与すると考えられている第 3 番染色体短腕上の遺伝子 (VHL, RASSF1A) を含め他の腎癌発症に絡む遺伝子群の発現に miR がどのように関わっているかを検討した。

### 3. 研究の方法

ヒト腎細胞癌株 Caki-1, Caki-2, ACHN, NC65, SW839, VMRC-RCW および HEK293 細胞を用い各々の DNA, RNA を抽出した。miR の発現は TaqMan microRNA assay kit (Applied Biosystems) を用いて解析した。14q32 領域にクローニングされた miR のうち今回検討したのは miR-433, miR-127, miR-299, miR-134, miR-154 について検討した。また AZA-C, TSA 存在下で Caki-1 細胞を培養し 48 時間後に RNA を抽出、その一部で DLK1,  $\beta$  アクチンを RT-PCR で検討した後に mirVana miRNA Array system (Ambion) を用い AZA-C, TSA 存在下で発現誘導される miR の検討を行った。そして PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いてサブクローニングし、コロニーを 8 個選択し BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) にて配列を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 腎細胞癌株における miR の発現腎癌細胞株において 83% (5/6) で各 miR 発現は消失していたが、腎癌で特異的に発現が抑制されている miR は認めなかった。

#### (2) AZA-C, TSA の miR 発現に与える影響

多くの悪性腫瘍において癌関連遺伝子が異常な DNA メチル化やヒストンの脱アセチル化により不活化されていることは広く知られている。miR も同様に異常な epigenetic 制御を受けていることが予想される。そこで DNA メチル化・ヒストンアセチル化を阻害して再発現してくる miR の中に TSG (tumor suppressor gene) としての機能をもつものがあるかもしれないと考え、腎癌細胞株を AZA-C, TSA 存在下で培養し 14q32 領域の miRNA が再発現するか検討を行った。まず腎癌細胞株で高頻度に DNA メチル化によって発現消失している DLK1 遺伝子が AZA-C, TSA で再発現することを確認したのちに、各 miR の再発現についての検討を行った。AZA-C, TSA により epigenetics で制御されている DLK1 遺伝子は再発現したが、各 miR の発現は変化を認めなかった。

(3) miR array

さらに、DLK1 遺伝子の再発現を来したサンプルのうち AZA-C 75uM 単独処理, TSA 0.3uM 単独処理, AZA-C 75uM と TSA 0.3uM の併用処理した RNA, それとは別に AZA-C 150uM 単独処理, TSA 0.5uM 単独処理, AZA-C 150uM と TSA 0.5uM の併用処理した RNA につき mirVana miRNA Array system (Ambion) を用い 14q32 領域以外で AZA-C, TSA により発現量が増加する miRNA を検討した. しかしながら Caki-1, VMRC-RCW とともに AZA-C, TSA 処理により発現量が 2 倍以上になる miR は認めなかった.

(4) DNA メチル化解析 Bisulfite genomic sequence 法および TA cloning 法を用い miR 領域の DNA メチル化解析を行った. miR 配列に CpG island を含む miR-127, miR-299, miR-134 について解析を行ったところ, miR の発現とは関係なくメチル化状態であった. 一方, NC65 では比較的 non-methylated CpG が多く認められた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kim CJ, Takimoto K, Tomita K, Osafune T, Nishikawa N, Johnin K, Okada Y. Evaluation of hydronephrosis with tubeless cutaneous ureterostomy using Tc-99m MAG3 diuretic renography. Clin Nucl Med. 34(10):666-9. 2009 (査読有)
- ② Kageyama S, Isono T, Matsuda S, Ushio Y, Satomura S, Terai A, Arai Y, Kawakita M, Okada Y. Yoshiki T. Urinary calreticulin in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. Int J Urol. 16:481-6. 2009 (査読有)
- ③ Kim CJ, Isono T, Tambe Y, Chano T, Okabe H, Okada Y. Inoue H. Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis. Int J Oncol. 32: 161-169. 2008. (査読有)
- ④ Minami K, Inoue H, Terashita T, Kawakami T. Watanabe R, Haneda M, Isobe K, Okabe H, Chano T. GADD34 induces p21

expression and cellular senescence. Oncol Rep. 17: 1481-1485. 2008 (査読有)

- ⑤ Okamoto K\* and Kawakami T. Epigenetic profile of testicular germ cell tumours. Int J Androl: 30 385-92. 2007 (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 裕作 (OKADA YUSAKU)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20127062

(2) 研究分担者

川上 享弘 (KAWAKAMI TAKAHIRO)  
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号: 90346023

(3) 研究分担者

岡本 圭生 (OKAMOTO KEISEI)  
滋賀医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50303780