

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18598

研究課題名(和文)腎癌におけるlong non-coding RNAの意義

研究課題名(英文)The role of long non-coding RNA in kidney cancer

研究代表者

久富木原 良平 (KUFUKIHARA, Ryohei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40837027

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)：2000年代に入ってたんぱく質をコードしないRNAがヒトゲノムの大部分を占めることがわかり、その中のlong non-coding RNA(lncRNA)で様々な癌種との関連が報告されている。今回新規RNA detection systemであるquantitative in situ hybridization chain reaction (qHCR)という手法を用いてlncRNAの同定を行った。従来より安価でハイスループットな研究が可能で、腎癌予後との関連も示すことが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究期間中に16種類で108症例、計1728検体でqHCRに成功した。本研究の目的の一つであった従来のin-situ hybridization法と比較した低コスト化、またハイスループットな研究手法としての妥当性は証明されたものと考えられる。実際に腎癌予後との関連を示すこともできており、qHCRが今後のさらなるlncRNAの機能解析や疾患との関連についての検討に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The relationship between some kinds of malignancies and long non-coding RNA (lncRNA) have been reported. We investigated that a high expression of lncRNA affect clinical outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma, by using a method of in situ hybridization chain reaction (qHCR). The new technique enables inexpensive and high-throughput in situ hybridization. We revealed that high expressions of 6 lncRNAs were significantly related to high recurrence rate. 3 lncRNAs (HOTAIR, TUG1 and CDKN2B-AS1) were related to overall survival.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎がん long non-coding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網羅的な遺伝子発現解析により、ヒトゲノムの大部分はタンパク質のアミノ酸一次配列情報をコードしない non-coding RNA で構成されることが判明している。これら ncRNA の中で、200 塩基以上の塩基配列で構成されるものを long non-coding RNA (lncRNA) といい、近年多くの lncRNA が同定されている。lncRNA は生体内で RNA 結合タンパク質と結合し、その蛋白質の細胞内局在、蛋白質間の相互作用、酵素としての活性機能などのエピジェネティックな調節機能を通じた多様な生理機能を有することが知られている。lncRNA と癌の関連は様々な癌種で報告され始めているが、その機能解析は未だ不十分である。その理由の一つとして、lncRNA の同定手法に限られていることがあげられる。我々が世界に先駆ける quantitative in situ hybridization chain reaction (qHCR) を使用することで、lncRNA の簡便で網羅的な同定を可能にしたいと考えた。また、転移性・切除不能腎がんは、他の固形癌に先駆けて、腫瘍細胞の増殖や血管内皮細胞の増殖に関わる細胞内シグナル伝達系をターゲットにした分子標的治療 (mTOR 阻害薬や VEGF 受容体 TKI 阻害薬) が 2000 年代に導入され、治療成績が改善した。更に 2010 年代には抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体といった腫瘍組織内の癌細胞免疫逃避機能に着目した免疫チェックポイント阻害薬が導入された。しかし未だこれらの薬剤が無効な症例も多く、一時期な奏功を得ても大部分が進行的である。そのような現状から、我々は腎がん治療への新規標的分子として lncRNA に着目した。

2. 研究の目的

分子標的治療の先駆的な立場である腎がんにおいて、新規 RNA detection system である quantitative in situ hybridization chain reaction (qHCR) を用いて、ヒト腎がん組織の lncRNA 発現を網羅的に同定し、腎がん臨床との関連を検討することを第一の目的とした。また、lncRNA の組織内、細胞内局在を明らかにすることで、機能解析の一助になるとも考えた。革新的な膨張顕微鏡法 (expansion microscopy) を qHCR に適用し、lncRNA の空間分布や細胞内局在を、回折限界を越えるナノスケールで可視化することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

最新の RNA detection system qHCR は、probe (標的分子毎に通常 10-20 probe) に 50 塩基程度の鋳型を採用し、ターゲットの mRNA に結合したのちに hairpin が連なることで標識が可能となる。本手法の革新性は、1) 分解された RNA の中からも部分的にペアとなる RNA のパターンを把握することにより、より長い塩基の RNA を抽出することができる、2) 短い塩基鋳型を使用することにより、probe 合成が安定化し、lncRNA 発現の網羅的解析が低予算で可能になる (従来 of in situ hybridization 法と比較し、数十分の 1 程度の低コスト化)。

Public Database を利用し、腎がんの発生や予後と関連が示唆されている 16 種類の lncRNA (NEAT1, HOTAIR, TUG1, DLEU2, MALAT1, FILNC, PVT1, H19, GAS5, UCA1, CDKN2B-AS1, PCAT1, MEG3, HIF1A-AS1, HIF1A-AS2, PTENP1) を抽出した。当教室に保存されている腎がんの凍結保存検体を使用して、108 例において qHCR を行い、それぞれの lncRNA の発現を調べた。当教室で作成した腎癌患者データベースと照合し、病理学的な腫瘍の悪性度や転移・再発との相関、5 年生存率など予後との関連を、統計学的に解析した。

4. 研究成果

16 種類の lncRNA で 108 症例、計 1728 検体で qHCR を行い、腎癌検体において lncRNA の同定は可能であった。まず本研究の目的の一つであった従来 of in-situ hybridization 法と比較した低コスト化、またハイスループットな研究手法としての妥当性は証明されたものと考えられる。図 1 に示すように、100 倍視野にて信号を確認できたものは高発現、確認できないものは低発現として (図 1) 腎がん予後との関連を解析した。6 種類の lncRNA (TUG1, GAS5, UCA1, CDKN2B-AS1, HOTAIR, DLEU2) において、高発現と無再発生存率に関連を認め、3 種類の lncRNA (HOTAIR, TUG1, CDKN2B-AS1) において、高発現と全生存率に関連を認めた。全生存率と関連を認めた 3 種類の lncRNA (HOTAIR, TUG1, CDKN2B-AS1) で、それぞれ低発現を 0 点、高発現を 1 点として、合計値を算出した。合計値 0 点を low risk、1, 2 点を intermediate risk、3 点を high risk と定義したところ、有意に生存率を反映する結果であった (図 3)。

細胞内局在を明らかにするため、qHCR 法と膨張顕微鏡法を組み合わせる実験を行った。核染色、核小体染色を同時に行うことで、目的の lncRNA が細胞内のどこに発現しているのか、ナノスケールで映し出すことができた (図 4)。膨張することで qHCR の信号をドットで評価でき、細胞内における分布割合を現在評価中である。

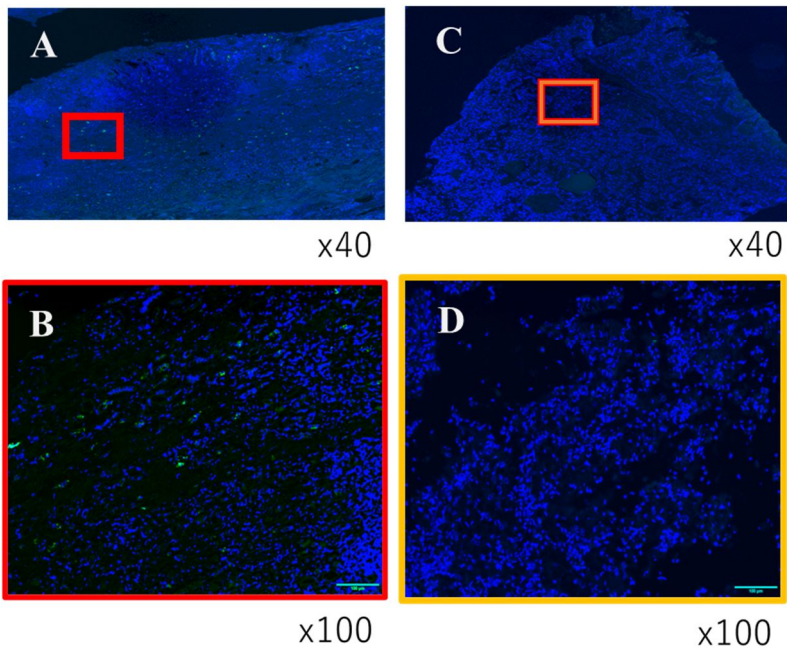


図 1 : HOTAIR の qPCR。青が DAPI で、緑が HOTAIR である。A, B では 100 倍視野にて信号が確認でき高発現、C, D では確認できず低発現となる。

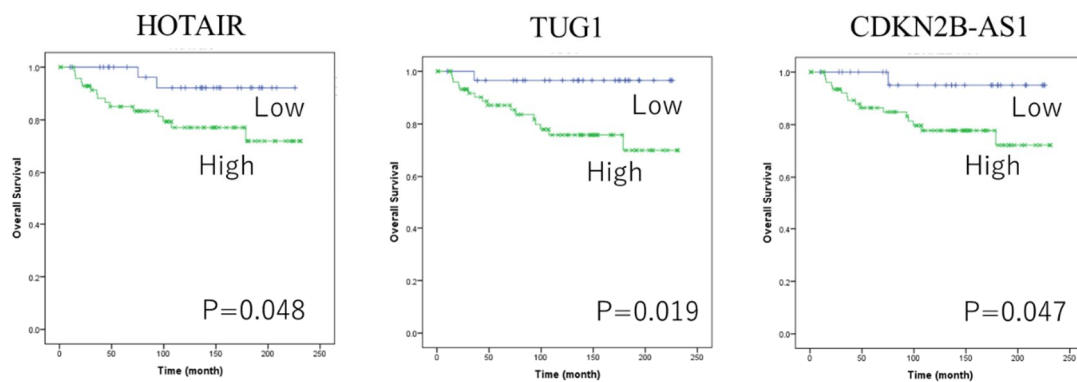


図 2 : HOTAIR、TUG1、CDKN2B-AS1 の 3 種の lncRNA では、高発現群は低発現群と比較して有意に全生存率が低かった。

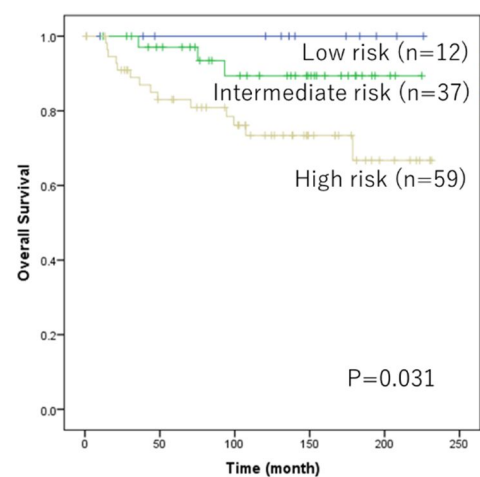


図 3 : HOTAIR、TUG1、CDKN2B-AS1 の発現をスコア化して作成した risk 分類から得られた生存曲線。

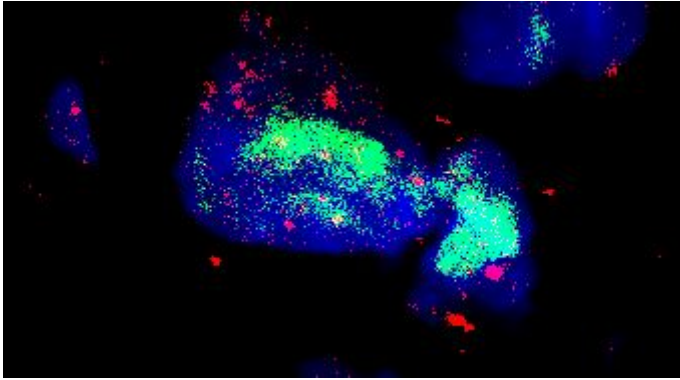


図4：1000倍視野における核（青）、核小体（緑）、HOTAIR（赤）。膨張顕微鏡法とqHCR法を併用することで、回折限界を超えて細胞内局在を評価できる。

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 0件）

1. 発表者名 久富木原良平
2. 発表標題 Impact of long non-coding RNA on outcomes of clear cell renal cell carcinoma: A simple/rapid RNA imaging technique of new in-situ hybridization chain reaction
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久富木原良平
2. 発表標題 In situ hybridization chain reactionを用いた、腎癌におけるlong non-coding RNAと予後との関連の解明
3. 学会等名 第30回泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------