

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16450

研究課題名（和文）腎細胞癌におけるMicroRNA-204-5pおよびTRPM3の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of MicroRNA-204-5p and TRPM3 in renal cell carcinoma

研究代表者

倉橋 竜磨（Kurahashi, Ryoma）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：80867945

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）：Xp11.2転座型腎癌細胞におけるmiR-204-5pとTRPM3遺伝子の発現について、PRCC-TFE3がどのように発現制御しているか、また腫瘍制御にどのように関わっているか検証した。PRCC-TFE3がTRPM3近傍のEboxに結合することはわかったが、それ以降の発現制御については樹立した細胞株で再現性がとれず解明できなかった。またオートファジーを介した腫瘍制御について、転座型腎細胞癌患者由来株を用いて検証を行ったが、淡明細胞型腎細胞癌で示されているようなオートファジー機構は転座型腎癌では関与していないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Xp11.2転座型腎細胞癌モデルマウスの尿中において発症初期から上昇するmiR-204-5pはバイオマーカーとしての可能性は残されているが、腫瘍細胞中での挙動は不明なところが多い。PRCC-TFE3がmiR-204-5pをイントロンに含むTRPM3に結合し得ることから、直接的な制御機構が考えられる。一方でオートファジーを介した腫瘍制御は淡明細胞型腎細胞癌と転座型腎細胞癌では挙動が異なる部分があり、これが本来腫瘍抑制的に働くはずのmiR-204-5pが早期から上昇することや転座型腎癌の予後が極めて悪い理由につながっている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In Xp11.2 translocation renal cell carcinoma, we investigated how the expression of miR-204-5p and TRPM3 genes is regulated by PRCC-TFE3, and how they affect tumor control. Although it was found that PRCC-TFE3 binds to the Ebox near TRPM3, the subsequent regulation of expression could not be elucidated because the reproducibility was not achieved in the established cell lines. We also examined tumor control via autophagy using a patient-derived line of translocation renal cell carcinoma, but the autophagy mechanism shown in clear cell renal cell carcinoma could not be confirmed in translocation renal cell carcinoma.

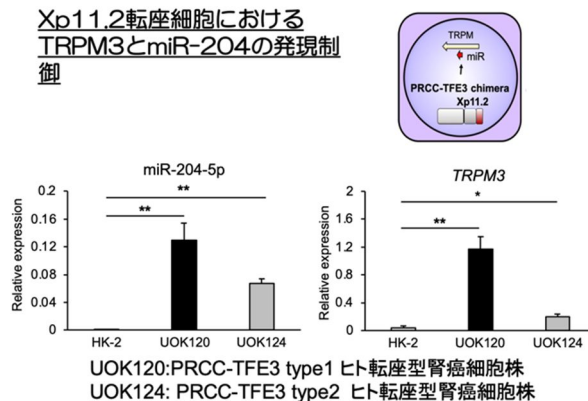
研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 micro RNA TRPM3 オートファジー CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

ヒト腎腫瘍において最も多いものは腎細胞癌であるが、それにはいくつかの組織型が存在する。Xp11.2 転座型腎細胞癌はその一つであり、X 染色体短腕の 11.2 を切断点とする相互型転座により生じる転写因子 TFE3 の融合遺伝子を原因遺伝子とする。TFE3 融合遺伝子より生じる恒常活性化型の TFE3 キメラタンパク質が、発癌に寄与すると考えられている。臨床的に Xp11.2 転座型腎細胞癌は、一般的な腎細胞癌と比べ発症が極めて稀である一方で、進行が早く、早期に再発・転移をきたすことが多いことから予後不良とされる。早期発見による原発巣の切除が唯一の治療法であるが、腎癌自体の自覚症状の乏しさもあり、検診等の偶発的な発見に頼らざるを得ないのが現状であった。申請者は先行研究¹⁾において、ヒト Xp11.2 転座型腎癌の原因遺伝子である PRCC-TFE3 融合遺伝子を腎尿細管特異的に発現する Xp11.2 転座型腎細胞癌モデルマウスを作製し、このマウスが実際に腎細胞癌を発症することを確認した。さらに、Xp11.2 転座型腎細胞癌モデルマウスの尿サンプルを用い、尿中に含まれる exosome を単離し、そこから抽出した total RNA の網羅的 qPCR によって転座型腎癌モデルマウスに特異的な発現上昇を示す候補 miRNA を同定し、細胞内および細胞周囲の exosome 中での発現上昇を証明した。一方で、該当 miRNA が転座型腎細胞癌、さらには通常の淡明細胞癌においてどのような機序で発現が上昇し、病態の発生にどのように関連しているのかは依然不明であった。バイオマーカーとしての信頼性を担保するためにも該当 miRNA の腎細胞癌の発生における詳細な分子機構の解明が必要であった。

Xp11.2 転座細胞における TRPM3 と miR-204 の発現制御



MicroRNA-204-5p: A novel candidate urinary biomarker of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. *Cancer Science*. 2019 Jun;110(6):1897-1908.

2. 研究の目的

上述で示した候補 miRNA、miR-204-5p は TRPM3 遺伝子の intron に含まれているが、マウスおよびヒトの初代癌細胞中において TFE3 の過剰発現に相関してこの miR-204-5p と TRPM3 が上昇していることが確認された。そこで、本研究では以下を目的として研究を行なった。

(1) TFE3 と miR-204-5p、TRPM3 の転写制御経路の解明

TFE3 は CANNTG から成る 6 塩基対の E-box を認識して結合することで転写制御を行う。TRPM3 遺伝子の upstream に同 E-box を同定し、TFE3 が直接結合することで転写制御を行っているか探索と解析を行う。TFE3 による TRPM3、miR-204-5p への発現調整が確認できれば後述の機能解析に大きな役割を果たすことになる。

(2) miR-204-5p が転座型腎癌の病態に果たす機能解析

miR-204-5p は種々の癌において発現が確認されているが、一般的に細胞増殖や腫瘍細胞の浸潤を抑制的に制御するとの報告が多い。しかし、癌腫によっては腫瘍促進的に働くとの報告もあり、その機能や標的因子は未だ不明確な部分が多い。上述の TFE3 結合阻害から TRPM3、miR-204-5p の発現制御がなれば、その前後で遺伝子発現解析を行うことでより正確な機能解析や標的因子の同定を行うことができる。

(3) TFE3 が miR-204-5p、TRPM3 を直接ではなく間接的に制御している場合の間接的分子機構の解明

E-box への結合による直接制御でなく、他因子を介して間接的に TFE3 が miR-204-5p、TRPM3 の発現を制御していることが確認された場合、TRPM3 とその intron にある miR-204-5p への直接的な遺伝子制御を行い、腫瘍細胞の遺伝子発現変化や細胞自体の増殖能、浸潤能への影響を評価することで機能解析が可能である。

3. 研究の方法

(1) ChIP sequence による TRPM3 遺伝子の upstream 1kbps の E-box の探索と CRISPR/CAS9 を用いた転写制御の解析

本研究協力者が報告した、ヒト近位尿細管 HK2 細胞で融合 TFE3 (PRCC-TFE3) のドキシサイクリン依存的発現誘導細胞株を用いて、TFE3 が結合する事が予測される E-box 配列を TRPM3 遺伝子の upstream 1kbps で探索する。結果同定し得た E-box 配列に対し CRISPR/Cas9 システムによりこれ

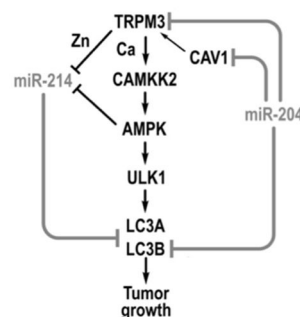
らの E-box 配列に変異を導入する sgRNA を複数個ずつ設計し、その切断効率を T7 エンドヌクレアーゼ I (T7E1) アッセイにより評価し、最適な配列を決定する。更にこれらの E-box 配列を標的とした sgRNA をレンチウイルスベクターに組み込み、PRCC-TFE3 発現誘導 HK2 細胞に導入することで直接制御の可能性を探る。

(2) PRCC-TFE3 による TRPM3、miR204-5p を介したオートファジー制御機構の解明

淡明細胞型腎細胞癌においては、miR204-5p が CAV1, TRPM3、及び LC3B を制御して、腫瘍増殖を助けるオートファジーを、抑制していることが明らかにされている²⁾(右図)。一方、転座型腎細胞癌においては、PRCC-TFE3 が miR204-5p 及び TRPM3 の発現増加に関与することが我々により明らかにされている。そこで、PRCC-TFE3 が miR204-5p や TRPM3 の発現を介してオートファジーを制御している可能性を考えた。

オートファジーに関わる分子の挙動を調べるために、PRCC-TFE3 転座型腎細胞癌患者由来株 (UOK120, 124) を用いて CRISPR/Cas9 システムにより TFE3 をノックアウトした細胞株を樹立し、解析する。

淡明細胞型腎細胞癌における TRPM3 と miR-204 によるオートファジーの調整機構



TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):738-53.

4. 研究成果

(1) TRPM3 のイントロン 1 内に PRCC-TFE3 キメラタンパク質が結合する部位を 3 か所見出した。この為、TFE3 結合配列に変異を導入して miR-204-5p の遺伝子発現を抑制することは困難であることが予測されたため miR-204-5p 自体に変異を導入する方針に変更した。融合 TFE3 (PRCC-TFE3) のドキシサイクリン依存的発現誘導細胞株を親株として、miR-204-5p を標的としたガイド RNA をデザインし、CRISPR/Cas9 システムにより miR-204-5p をノックアウトした細胞株を複数株樹立し解析を進めたが、非ノックアウト株における PRCC-TFE3 の発現誘導と miR-204-5p の発現が連動せず、ノックアウト株との比較・検証までは進めていない。他株 (HEK293) を用いて再度 miR-204-5p のノックアウト株を作成予定である。

(2) 既報告では淡明細胞型腎細胞癌中において miR-204-5p が TRPM3、CAV1 を抑制することでオートファジーを調整し腫瘍抑制的に働くことが示されている²⁾。このオートファジー機構が転座型腎細胞癌にも適用されているか、また TFE3 の過剰発現に応じてオートファジーに関わるどの分子が影響を受けているのか確認するために、PRCC-TFE3 転座型腎細胞癌患者由来株 (UOK120, 124) を用いて CRISPR/Cas9 システムにより TFE3 をノックアウトした細胞株を樹立し、TRPM3、CAV1 が関与するオートファジー機構に関与する分子について解析を行なった。結果、TFE3 の発現の多寡に関わらずウェスタンブロットにてこれらの分子の発現変化が確認できず、転座型腎細胞癌では同オートファジー機構は関与していないことがわかった。

<引用文献>

- 1) Kurahashi R, Kadomatsu T, Baba M, Hara C, Itoh H, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Terada K, Araki K, Eto M, Schmidt LS, Kamba T, Linehan WM, Oike Y, MicroRNA-204-5p: A novel candidate urinary biomarker of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2019 Jun;110(6):1897-1908.
- 2) Hall DP, Cost NG, Hegde S, Kellner E, Mikhaylova O, Stratton Y, Ehmer B, Abplanalp WA, Pandey R, Biesiada J, Harteneck C, Plas DR, Meller J, Czyzyk-Krzeska MF, TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2014 Nov 10;26(5):738-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 to K, Kobayashi T, Kojima T, Hikami K, Yamada T, Ogawa K, Nakamura K, Sassa N, Yokomizo A, Abe T, Tsuchihashi K, Tatarano S, Inokuchi J, Tomida R, Fujiwara M, Takahashi A, Matsumoto K, Shimizu K, Araki H, Kurahashi R, Osaki Y, Tashiro Y, Uegaki M, Ogawa O, Kitamura H, Nishiyama H	4. 巻 10
2. 論文標題 Pembrolizumab for treating advanced urothelial carcinoma in patients with impaired performance status: Analysis of a Japanese nationwide cohort	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3188 ~ 3196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3863	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 -

1. 著者名 Anami Toshiki, Komohara Yoshihiro, Miura Yuji, Yamanaka Kotaro, Kurahashi Ryoma, Segawa Takuya, Motoshima Takanobu, Murakami Yoji, Yatsuda Junji, Yamaguchi Takahiro, Sugiyama Yutaka, Jinnouchi Yoshiteru, Kamba Tomomi	4. 巻 54
2. 論文標題 High T-cell infiltration in tumor tissue and younger age predict the response to pembrolizumab in recurrent urothelial cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 316 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-021-00292-8	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 -

1. 著者名 Mizuno K, et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Clinical Impact of Detecting Low-Frequency Variants in Cell-Free DNA on Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6164 ~ 6173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-21-2328	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 -

1. 著者名 Kato M, Kobayashi T, Matsui Y, Ito K, Hikami K, Yamada T, Ogawa K, Nakamura K, Sassa N, Yokomizo A, Abe T, Tsuchihashi K, Tatarano S, Inokuchi J, Tomida R, Fujiwara M, Takahashi A, Matsumoto K, Shimizu K, Araki H, Kurahashi R, Ozaki Y, Tashiro Y, Uegaki M, Kojima T, Uchida J, Ogawa O, Nishiyama H, Kitamura H	4. 巻 28
2. 論文標題 Impact of the objective response to and number of cycles of platinum based first line chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma on overall survival of patients treated with pembrolizumab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14686	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 -

1. 著者名 Otsuka Hikari, Kita Yuki, Ito Katsuhiko, Sano Takeshi, Inokuchi Junichi, Tomida Ryotaro, Takahashi Atsushi, Matsumoto Kazumasa, Kurahashi Ryoma, Ozaki Yu, Uegaki Masayuki, Maruyama Satoru, Mukai Shoichiro, Tsutsumi Masakazu, Kawahara Takashi, Segawa Takehiko, Kitamura Hiroshi, Morita Satoshi, Kobayashi Takashi	4. 巻 113
2. 論文標題 Immune related adverse events in urothelial cancer patients: Adjustment for immortal time bias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3912 ~ 3921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15539	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 -

1. 著者名 Miura Yuji, Motoshima Takanobu, Anami Toshiki, Yano Hiromu, Mito Remi, Pan Cheng, Urakami Shinji, Kinowaki Keiichi, Tsukamoto Hirotake, Kurahashi Ryoma, Murakami Yoji, Yatsuda Junji, Fujiwara Yukio, Kamba Tomomi, Komohara Yoshihiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Predictive value of CXCL10 for the occurrence of immune related adverse events in patient with renal cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 345 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13067	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 -

1. 著者名 Kadomatsu Tsuyoshi, Hara Chiaki, Kurahashi Ryoma, Horiguchi Haruki, Morinaga Jun, Miyata Keishi, Kurano Sohtarō, Kanemaru Hisashi, Fukushima Satoshi, Araki Kimi, Baba Masaya, Linehan W. Marston, Kamba Tomomi, Oike Yuichi	4. 巻 17
2. 論文標題 <sc>ANGPTL2</sc> mediated epigenetic repression of <sc>MHC I</sc> in tumor cells accelerates tumor immune evasion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2637 ~ 2658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13490	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 -

1. 著者名 Kubota M, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of thienopyridine class antiplatelets on bleeding outcomes following robot-assisted radical prostatectomy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5847-5847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-56570-9	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 西澤秀和、倉橋竜磨、脊川卓也、元島崇信、村上洋嗣、杉山豊、矢津田旬二、山口隆大、馬場理也、神波大己
2. 発表標題 t(6; 11) translocation renal cell carcinoma, successfully diagnosed by using FISH
3. 学会等名 The 37th KOREA-JAPAN Urological Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishizawa H, Funasaki S, Kurahashi R, Segawa T, Motoshima T, Murakami Y, Yatsuda J, Baba M, Kamba T
2. 発表標題 Iucidation of Transcriptional regulation in Translocation Renal Cell Carcinoma Using CRISPR/Cas9 Genome-Wide Screening
3. 学会等名 JUA/AUA Advancements in Urology (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 倉橋 竜磨, 元島 崇信, 村上 洋嗣, 矢津田 旬二, 山口 隆大, 杉山 豊, 神波 大己
2. 発表標題 nivolumabからpazopanibへ変更後重篤な多臓器障害を来した2例
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 広太郎, 矢津田 旬二, 倉橋 竜磨, 元島 崇信, 山口 隆大, 杉山 豊, 西 一彦, 神波 大己
2. 発表標題 当院Pembrolizumab使用例解析による効果予測因子の検討
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山 豊, 西 一彦, 黒川 慎一郎, 山中 広太郎, 倉橋 竜磨, 村上 洋嗣, 神波 大己
2. 発表標題 熊本大学病院における透析腎癌の臨床的検討
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 元島 崇信, 倉橋 竜磨, 矢津田 旬二, 村上 洋嗣, 山口 隆大, 杉山 豊, 神波 大己
2. 発表標題 本大学における分子標的薬の進行性腎癌に治療成績の検討
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 元島崇信, 福島結美, 脊川卓也, 倉橋竜磨, 村上洋嗣, 杉山豊, 矢津田旬二, 山口隆大, 神波大己
2. 発表標題 熊本大学病院におけるがん複合免疫療法の治療効果と副作用の発現
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 洋嗣, 倉橋 竜磨, 脊川 卓也, 元島 崇信, 矢津田 旬二, 杉山 豊, 神波 大己
2. 発表標題 本大学病院での腎細胞癌に対するペムプロリズマブ、レンパチニブ併用療法の使用経験
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 元島 崇信, 脊川 卓也, 倉橋 竜磨, 村上 洋嗣, 矢津田 旬二, 杉山 豊, 神波 大己
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬と分子標的薬併用療法の使用経験から学ぶこれからの使用方法の探索
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤 秀和, 舟崎 慎太郎, 倉橋 竜磨, 脊川 卓也, 元島 崇信, 村上 洋嗣, 杉山 豊, 矢津田 旬二, 馬場 理也, 神波 大己
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニングを用いたTFE3融合遺伝子による発がん機構の解明
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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
研究協力者	馬場 理也 (Baba Masaya)	熊本大学大学院生命科学研究部国際先端医学研究機構 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	西澤 秀和 (Nishizawa Hidekazu)	熊本大学大学院生命科学研究部泌尿器科学講座 (17401)	

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