

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790389

研究課題名（和文） 腎細胞癌において異常発現するmiRNAの機能解析

研究課題名（英文） Analyses of functions of deregulated miRNAs in renal carcinoma

研究代表者

中田 知里 (NAKADA CHISATO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60379625

研究成果の概要（和文）：

本研究は腎癌の主要な亜型である淡明細胞癌の発生・悪性化に関与する miRNA を同定することを目的とする。腎淡明細胞癌において異常発現する3つの miRNA の機能解析を行った。miR-200c と 141 は腎癌症例で発現低下しており、これを腎癌細胞株に過剰発現すると細胞増殖が抑制された。miR-210 は腎癌症例で発現上昇しており、これを細胞株に導入すると、多極紡錘体が形成され、細胞分裂異常が引き起こされることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

It has recently been reported that microRNAs (miRNAs), non-protein-coding small RNAs comprising about 22 nucleotides, are aberrantly expressed in certain carcinomas and play oncogenic or tumor-suppressive roles in carcinoma cells. The aim of this project is to clarify the functions of the miRNAs aberrantly expressed in clear cell renal cell carcinoma (CCC), and to identify miRNAs associated with carcinogenesis and/or cancer progression.

Three miRNAs are found deregulated in CCC, but the mechanism and biological consequences of their deregulation are poorly understood. MiR-200c and miR-141 are significantly downregulated in CCC. Ectopic expression of these miRNAs induced growth suppression of renal carcinoma cell lines. Ectopic expression of miR-210, which is upregulated in CCC, caused accumulation at G2/M phase of the cell cycle associated with multipolar spindle, suggesting that miR-210 overexpression may trigger an event that hinders normal cell division.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：実験病理、分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：microRNA、腎細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は、発生率は3%と低いが、5年生存率は依然として低い予後不良の疾患である。とくに外科的切除以外に効果的な治療法に乏しいことがその大きな要因であると考えられる。一方、近年蛋白質をコードしていない small RNA (microRNA) が messenger RNA の分解と翻訳を制御し、細胞増殖、分化、アポトーシスを含む生物学的プロセスに重要な働きをすることが明らかとなった。そして microRNA の異常発現が癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常発現を介して、癌発生や進行にも関与することが示唆され注目されつつある。私はこの点に着目し、腎細胞癌における miRNA 発現をマイクロアレイ (Agilent G4470A) を用いて Sanger miRBase 9.1 に登録されている 470 個の Human miRNA の発現を解析し報告した (Nakada et al. J Pathol 2008)。Clear cell carcinoma (CCC 16 症例)、chromophobe renal cell carcinoma (ChCC 4 症例) と正常腎組織 (6 例) における miRNA 発現を比較したところ、CCC では 43 個の miRNA が発現変動しており、miR-155、-210 など 6 個が発現上昇し、miR-141、-200c など 37 個が発現低下していた。

## 2. 研究の目的

本研究では腎癌で異常発現する microRNA の機能解析を行い、癌発生や悪性化にどのような役割を果たしているかを解明したい。

これまで腎細胞癌 CCC における研究では、責任遺伝子 VHL とその下流のシグナル伝達分子について集中的に研究がなされ、分子標的治療の標的としても注目され実用化が進められている。しかしながら、これらの分子標的治療薬も効果は限定的である。miRNA の発現異常という、これまでとは異なった側面から腎細胞癌にアプローチし、腎癌の発生・進行に関与する miRNA を同定して機能を明らかにすることは新しい分子標的の発見につながる可能性がある。現在用いられている分子標的治療薬の効果の補完につながれば、腎細胞癌の治療において有益である。

## 3. 研究の方法

(1) 腎細胞癌 CCC において異常発現していた miRNA の機能解析

まず CCC における miRNA 発現プロファイルにおいて、異常発現していた 43 個の miRNA より発現強度、変動の大きさを考慮して 3 個の

miRNA (miR-210、-200c、-141) を選んだ。腎癌細胞株を用いてこれらの発現低下あるいは発現上昇が腎癌細胞の性質に影響を及ぼしているか否か調べた。

それぞれの miRNA について Pre-miR miRNA precursor (Ambion) を腎癌細胞株に導入して過剰発現させた。そして、

- ① 細胞の増殖能
  - ② アポトーシス耐性能
- について検討した。

逆に発現上昇していた miRNA については、Anti-miR miRNA inhibitor (Ambion) を導入して miRNA 発現を抑制し、上述の方法により細胞への影響を調べた。

## (2) レンチウイルスベクターによる miRNA 過剰発現システムの構築

ヌードマウスを用いた細胞株移植実験をおこなうため、レンチウイルスベクターによる miRNA 安定発現細胞株の樹立を計画し、前述の miRNA について前駆体領域のゲノムをクローニングし、レンチウイルスベクター (理研より購入) に組み込んだ。

これをヌードマウス可移植性の腎癌細胞株 786-0 と ACHN に導入して過剰発現株を作製する予定であったが、(1) における機能解析において興味深い結果を得て、その解析を重視したため、期間内に細胞株樹立には至らなかった。

## (3) ヌードマウスへの癌細胞移植による腫瘍増殖能の検討

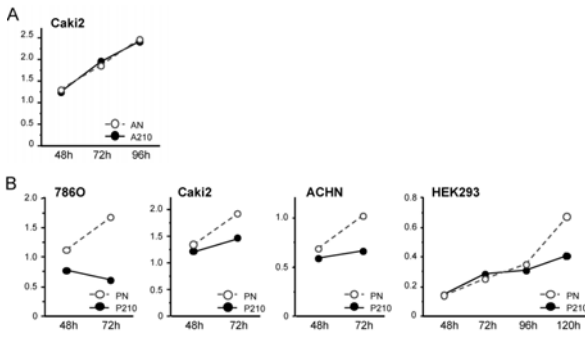
当初計画していたが (1) における機能解析において興味深い結果を得て、その解析を重視したため実施していない。

## 4. 研究成果

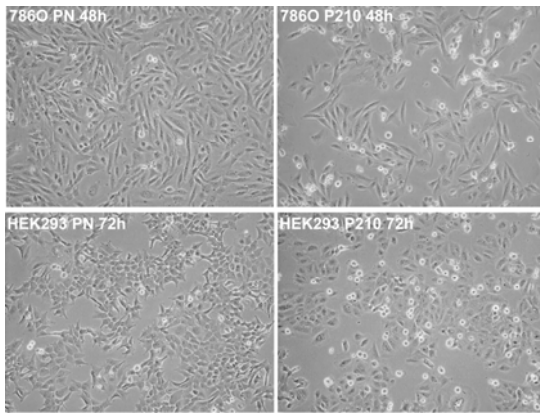
### (1) miR-210 について

miR-210 は腎癌 CCC で過剰発現していることから、癌促進的な機能を果たしている可能性があると考え、解析を進めた。まず細胞増殖に関与しているかどうかを調べるため、miR-210 が過剰発現している腎癌細胞株 Caki2 において Anti-miR-210 により発現抑制を行った。予想に反して細胞増殖には変化がなく (下 A 図)、形態にも変化がなかった。

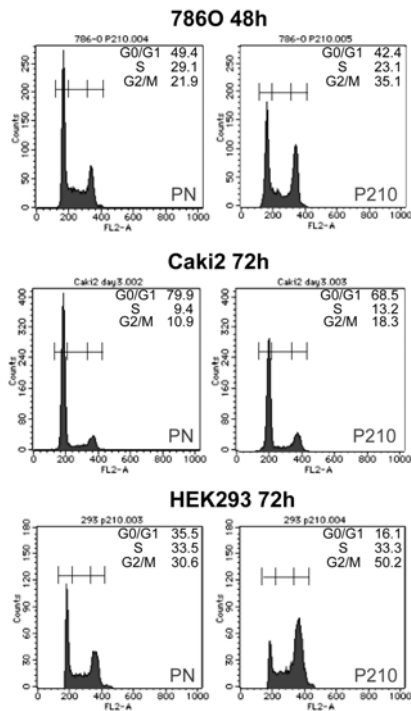
一方、miR-210 発現が低い細胞株 786-0、ACHN に miR-210 を過剰発現させると、むしろ細胞増殖が抑制された (下 B 図)。



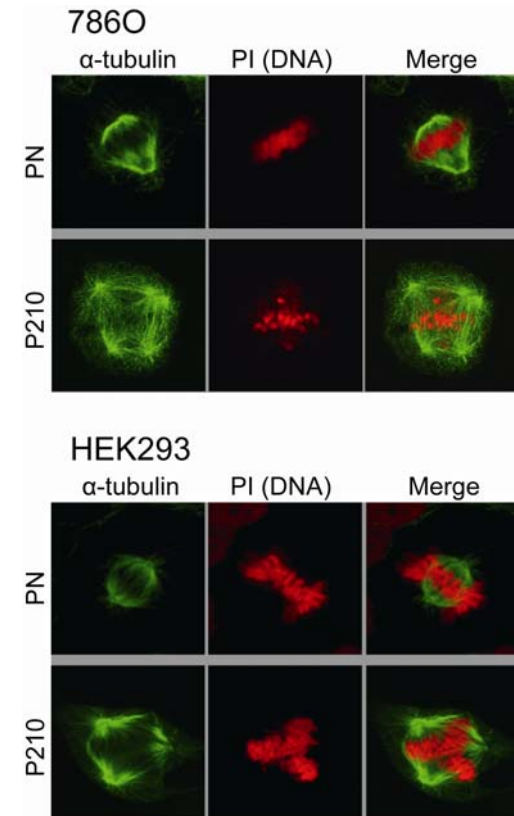
これらの結果はmiR-210が癌促進的な機能を持つという予測と矛盾していた。しかし、細胞をよく観察してみるとmiR-210を導入した細胞では丸い細胞が増えており（下図）、それらの多くで染色体が赤道面に並んでいるのがみとめられた（data not shown）。



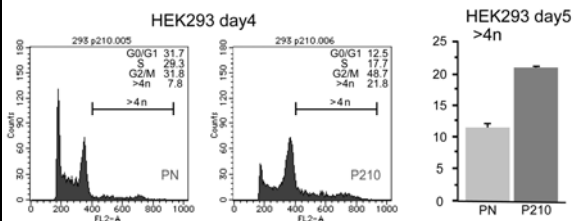
このことから、FACSにより細胞周期を調べるとG2/M期に蓄積していることが確認され（下図）、細胞分裂異常が起こっている可能性が示唆された。



実際に、分裂期の細胞において多極紡錘体の形成が確認された（下図）。



多極紡錘体は、染色体分配異常を引き起こし、染色体異常の原因となることが知られている。このことから、私は、腎細胞癌におけるmiR-210発現亢進は、多極紡錘体を誘導して染色体分配異常を引き起こし、細胞に染色体数異常を獲得させることによって発がんに関与している可能性があるとの仮説を立てた。そこで、miR-210の過剰発現により染色体数異常が引き起こされるかをFACSにより解析した。



HEK293細胞にmiR-210を導入すると、4~5日後に核型が4n<の細胞が数多く検出され、Aneuploidの細胞が出現していることが示された。

さらに、腎癌細胞におけるmiR-210の発現上昇が、VHLの不活性化によるHIF1αの蓄積によるものであることをHIF1αノックダウンにより示した（data not shown）。このことより、miR-210の構成的な発現上昇は腎細胞癌CCCの分子病理学的な特徴であると云える。

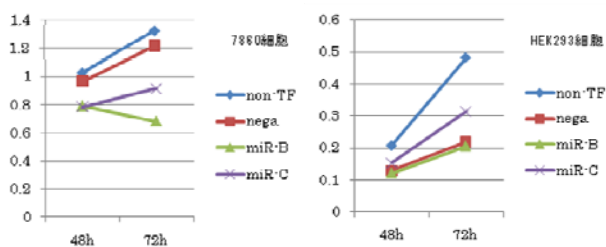
以上の結果より、miR-210 の過剰発現は、HIF1 $\alpha$  の蓄積によって誘導される腎癌に特徴的な現象であり、これによって染色体の分配異常を引き起こされ、Aneuploidy などのゲノム異常を引き起こす可能性が示唆された。よって miR-210 の過剰発現は、腎癌の発生や悪性化に関与している可能性がある。

ここまでの結果を論文として 2011 年に発表した (the Journal of Pathology、業績①)。今後は miR-210 の標的分子の探索を通してメカニズムの解明に取り組みたい。

## (2) miR-200c と miR-141 について

腎癌 CCC において著しく発現低下しているこの 2 つの miRNA は、ひとつの前駆体 RNA から切り出されてくるため、発現が協調して変動する。さらに、両者とも miR-200 ファミリーに属していることから、その機能も協調していると考えられている。

まず細胞増殖能への影響を MTS アッセイによって調べた。ヒト胎児腎臓不死化細胞株 HEK293 と腎癌細胞株 7860 にオリゴ pre-miR-141 (B), -200c (C) を導入し、MTS アッセイ (下図) を行った。どちらの microRNA も過剰発現によって細胞増殖を抑制することが示唆された。



また、オリゴ導入後 72 時間における細胞数をカウントしたところ、顕著に細胞数の減少がみられた (data not shown)。この結果は MTS アッセイの結果と一致するものであった。

これら 2 つの miRNA は、腎細胞がんの増殖抑制に有用である可能性があるが、さらに機能解析を続ける必要がある。

## 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 2 件)

① Chisato Nakada, Yoshiyuki Tsukamoto, Keiko Matsuura, Tung Lam Nguyen, Naoki Hijiya, Tomohisa Uchida, Fuminori Sato, Hiromitsu Mimata, Seto Masao, Masatsugu Moriyama

Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells  
J Pathol 2011, 224; 280-288

査読有り

② Yoshiyuki Tsukamoto, Chisato Nakada, Tsuyoshi Noguchi, Masato Tanigawa, Lam Tung Nguyen, Tomohisa Uchida, Naoki Hijiya, Keiko Matsuura, Toshio Fujioka, Masao Seto, Masatsugu Moriyama

MicroRNA-375 Is Downregulated in Gastric Carcinomas and Regulates Cell Survival by Targeting PDK1 and 14-3-3 $\zeta$

Cancer Res 2010, 70(6); 2339-49

査読有り

[学会発表] (計 1 件)

① 塚本 善之、中田 知里ほか  
胃癌で発現低下する miR-375 は PDK1 と 14-3-3 $\zeta$  を標的として細胞生存を制御する  
第 69 回 日本癌学会学術総会  
2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 知里 (NAKADA CHISATO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60379625