

機関番号： 11401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009 ～ 2010
 課題番号： 21791486
 研究課題名(和文) 尿路上皮癌および腎細胞癌におけるマイクロ RNA 関連遺伝子多型とその機能解析
 研究課題名(英文) MicroRNA related gene polymorphisms and its function in urinary tract urothelial carcinoma and renal cell carcinoma
 研究代表者
 堀川 洋平 (HORIKAWA YOHEI)
 秋田大学・医学部・講師
 研究者番号： 40361232

研究成果の概要(和文)：

尿路上皮癌と腎細胞癌を対象として、マイクロ RNA 関連遺伝子多型の検討を行った。マイクロ RNA 合成経路に関連する遺伝子上の多型は、腎細胞がんの発症と、治療後の予後との有意な関連を認め、悪性度の高い表現型をもつ癌においてその進展を修飾している可能性があり、予後予測マーカーとしての有用性が示唆された。また、マイクロ RNA 遺伝子上の多型に対する検討も行ったが、癌の発症と進展との有意な関連は認めず、多型解析の対象としての意義は少ないと思われた。

研究成果の概要(英文)：

We took a polygenic approach to investigate the associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in miRNA synthesis genes and cancer progression in urinary tract and renal cell carcinoma. We identified several SNPs significantly associations with poor survival in RCC. This result suggests that these miRNA related gene SNPs may modify RCC progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：マイクロ RNA、尿路上皮がん、腎細胞癌、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA(以下 miRNA)は 20-25

塩基の長さの 1 本鎖 non-codingRNA 分子で、ヒトではこれまで約 700 以上が同定されている。ヒト遺伝子の約 30%は miRNA により

発現調節されていると予想され、miRNA は細胞の増殖や分化を制御・調節し生体内の様々な機能に関与していると考えられる。さらに、miRNA の異常発現は多くのヒトの疾患の病因と考えられているが、近年癌との関連が広く報告され、miRNA は oncogene および tumor suppressor として機能することが明らかとなった (Esquela-Kerscher et al. Nat Rev Cancer 2006)。さらに、miRNA マイクロアレイによる発現 profiling の癌診断および予後予測ツールとしての有用性が検討され、miRNA の発現異常と癌との関連が強く示唆されているが (Calin GA et al. Nat Rev Cancer 2006)、その機序のひとつとして miRNA 合成経路蛋白の異常が考えられている。

miRNAs の合成過程には様々な蛋白が関与している。まず、数千塩基の長さの miRNA 遺伝子が転写されヘアピン構造をもつ長さ 70-110 塩基の pri-miRNAs となり、次に核内で DROSHA、DGCR8 などの RNase III 酵素により 60-70 塩基の pre-miRNAs に処理される。Pre-miRNAs は輸送蛋白 (Exportin-5/Ran-GTP 複合体) により細胞質へ送られ RNase III 酵素である DICER による切断を受け、最終的に mature miRNA となり TRBP や AGO2 などのタンパクで構成される miRNA-associated multiprotein RNA-induced silencing complex (以下 miRISC) に保持される。miRISC 内の miRNA は、miRNA に相補的な塩基配列をもつ標的遺伝子の 3' UTR に結合することで標的遺伝子の発現を調節する。この miRNA 合成過程で機能する蛋白の異常は様々な癌で報告されている (Esquela-Kerscher et al. Nat Rev Cancer 2006)。また実験的にも、miRNA プロセッシングの破綻は癌への進展を促進しより浸潤能の高い癌になることが示されている (Kumar et al. Nat Genet, 2007)。さらに、実際の臨床組織から miRNA 関連タンパク発現を検討した研究では、肺がん・前立腺がんにおいて DICER と癌の予後との有意な関連が指摘され、これらの研究は miRNA 合成経路が癌の進展に強く関係していることを支持している。

遺伝子内の一塩基置換型多型 (SNP) は遺伝子の発現や機能に影響し、癌においても遺伝子多型の違いが個人の癌へのなり易さや、癌の進展を修飾する可能性が示唆さ

れている。miRNA 合成に関連する遺伝子内にも多くの遺伝子多型があり、これらの多型の違いが宿主の癌発症リスクや癌の進展を修飾することは十分考えられる。最近、膀胱癌と腎癌においていくつかの miRNA 関連遺伝子多型と発症リスクとの有意な関連が見いだされたが (Yang et al. Cancer Res 2008, Horikawa et al. Clin Cancer Res 2008)、これらは一部の遺伝子多型を検討した過ぎず、また、白人を対象とした検討であるため、日本人を対象にした研究においてこれらの結果を検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、miRNA 関連の遺伝子多型 (miRNA 合成経路蛋白、miRNA の標的遺伝子 3' UTR 上、miRNA 遺伝子上) を解析し、アソシエーションスタディ手法により尿路上皮癌・腎細胞癌の発症・進展に関与する SNP を同定することを目的とする。解析にて癌発症との関連が示唆される SNP については、機能解析を行い、尿路上皮癌、腎癌の発症・進展メカニズムへの解明につなげる。

3. 研究の方法

- ① miRNA 合成経路の中で特に重要な蛋白 (DROSHA, DGCR5, XPO5, DICER, TRBP2, AGO1, AGO2 など) から機能的に意味があると予想される遺伝子多型を選定し、すでに我々の保有する症例対照研究用の癌患者 DNA (尿路上皮癌 約 300 例、腎細胞癌 約 250 例) と正常コントロール (約 300 検体) 用いて、多型のジェノタイプングを行い発症リスクとの関連を解析する。同時に、臨床情報データベースを使用し癌患者において遺伝子多型と癌の臨床的特徴 (組織型、細胞悪性度、再発、予後など) との関連を検討する。遺伝子多型は、SNP データベース (dbSNP, International HapMap project) にて Minor allele frequency (MAF) 0.01 以上で機能的遺伝子多型 (exon、UTR、プロモータ領域) を選択し、複数の機能的多型が同じハプロタイプブロックにある場合には 1 つの多型を解析する。

- ② 手術標本から得られた尿路上皮癌（腎盂尿管癌、膀胱癌）と腎細胞癌の組織パラフィン切片を用いて、miRNA 合成経路上の各種タンパク質発現を免疫組織化学により検討する。各蛋白の染色性と癌の悪性度と治療アウトカムとの関連について検討し、miRNA 合成蛋白の予後予測バイオマーカーとしての可能性を検討する。

4. 研究成果

- ① 腎細胞がんを検体として、41 の miRNA 関連遺伝子多型の解析を行った。miRNA 合成経路上のタンパクとしては、DROSHA, DGCR8, XPO5, RAN, DICER1, TARBP2, AGO1, AGO2, GEMIN3, GEMIN4, HIWI に着目し、それぞれの遺伝子のプロモータ領域等の functional SNP を解析した。また、pre-miRNA, pri-miRNA 上の SNP についてもタイピングを行った。先行研究にて、XPO5 (rs11077), AGO1 (rs595961), GEMIN4 (rs2740348, rs7813), GEMIN3 (rs197412) の多型と腎細胞癌発症との関連が認められ、これらを用いたリスクモデルでは 2.49 倍リスクが増大することが示されていた。今回は、さらに腎細胞がんの表現型と治療アウトカムとの解析を進めたが、GEMIN4 遺伝子多型 (rs7813, rs910925) は有意に腎癌の予後不良と関連しており (Hazard ratio 1.74 [95% CI 1.15-2.62]、GEMIN4 遺伝子は、癌の発症、進展においてなんらかの機能的意味をもつことが強く示唆された。現在、機能解析が進行中であり、上記と同様の解析を現在、尿路上皮癌に対しても検討を進めている。さらに、各遺伝子のハプロタイプ解析を行ったところ、DICER1 (rs3742330 A/G, rs13078 T/A) の G-A タイプでは、2.04 倍 (95%CI 1.00-4.15) の死亡リスク増加があった。さらに、これらの解析で同定された、遺伝子から CART モデルを使用したリスクモデルを構築したところ、治療後の再発と死亡を予測可能であった。これは、miRNA 関連遺伝子が腎細胞がんの発症に強く影響しているとともに、その進展と予後を修飾していることを示している。

今後これらの結果の妥当性をさらに大規模な研究として検証していく必要がある。

- ② 膀胱癌 300 例、腎細胞癌 300 例の患者から得られた血液検体から抽出された DNA を使用し、それぞれ年齢、性別をマッチさせた健常人を対照として miRNA 遺伝子関連 SNP の検討を行った。SET8 遺伝子 3' UTR に位置する多型 (rs16917496) を検討した。この多型は *hsa-miR-502 T→C* の結合部位に位置しており、乳癌の発症との関連が報告されており (Song et al. Clin Cancer Res 2009)、特に p53 codon72 の遺伝子多型との相互作用により、乳癌の若年発症との関連が指摘されている。この多型に対して、膀胱癌の発症との関連について症例対照研究として検討を行ったが、多型と発症リスクとの関連は認めなかった。さらに、p53 codon72 遺伝子型との検討も行ったが、発症年齢との関連は認めなかった。
- ③ pre-miRNA SNP (*hsa-miR-146* rs2910164 G→C, *hsa-miR-149* rs2292832 C→T, *hsa-miR-196a2* rs11614913 C→T, *hsa-miR-499* rs3746444 C→T) に対する検討を行った。これらは、いずれも、多種の遺伝子発現を調節することが指摘されており、さらに非小細胞肺癌とその予後との有意な関連が報告されている (Hu et al. J Clin Inves 2008)。特に、*hsa-miR-196a2* は、多型の違いにより、mature miRNA の発現量が異なることが機能解析により示されており、各癌腫においての検討が進みつつある。本研究では、膀胱癌、腎細胞癌症例それぞれ 300 例のタイピングを行い、健常人 300 例を対照としたアソシエーションスタディとして発症リスクとの関連を検討したが、有意な発症リスク増加は認めなかった。さらに、治療後の再発・癌特異生存率との関連についても検討を行ったが、予後との有意な関連も見出すことはできなかった。これらの検討から pre-miRNA 上の遺伝子多型は、癌の発症・進展との関連は低いことが予想された。このことから、今

後のmiRNA関連SNP解析の展開として、その対象をmiRNA遺伝子上ではなく、標的遺伝子の3' UTR上の遺伝子発現に影響するSNP解析に集中すべきと思われる。

- ④ miRNA合成においては、pri-miRNAからmatura-miRNAにいたるまで、多種のタンパクが関与している。本研究では特に、Dicer1蛋白発現の検討を行った。Dicer1はその発現の低下が肺がんの予後に関連することが指摘されており(Karube et al. Cancer Sci 2005)、腎細胞がんでのアソシエーションスタディにおいても、あるハプロタイプと再発と生存との関連が見出されている。今回は、尿路上皮癌(腎盂尿管癌60例、膀胱癌150例)と腎細胞癌100例の摘出標本のパラフィン切片を用いて免疫組織化学によりDICER発現の検討を行った。染色性をその強度と範囲から、3段階に評価して検討を行い、それぞれの癌の臨床情報(病期、異型度、治療後の予後)との関連性を検討したが、有意な関連を見出すことはできなかった。よって、Dicer1の尿路上皮癌と腎細胞癌との関連は低いものと考えられた。Dicer1上のSNPの、発現への影響も検討しているが、現在、その他の関連タンパクについても引き継ぎ検討を加えている。

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6件)

- ① Lin J, Horikawa Y, Tamboli P, et al: Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. Carcinogenesis 31, 1805-1812, 2010 (査読あり)
- ② Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y, et al. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. Int J Cancer 2010 Epub (査読あり)

- ③ Maita S, Yuasa T, Tsuchiya N, Mitobe Y, Narita S, Horikawa Y et al. Antitumor effect of sunitinib against skeletal metastatic renal cell carcinoma through inhibition of osteoclast function. Int J Cancer 2011 Epub (査読あり)
- ④ Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, Huang M, Obara T, Narita S, Horikawa Y, et al. Clinical significance of polymorphism and expression of chromogranin A and endothelin-1 in prostate cancer. J Urol 184: 1182-8m 2010 (査読あり)
- ⑤ Wang W, Yuasa T, Tsuchiya N, Ma Z, Maita S, Narita S, Kumazawa T, Inoue T, Tsuruta H, Horikawa Y, et al. The novel tumor-suppressor Mel-18 in prostate cancer: its functional polymorphism, expression and clinical significance. Int J Cancer 15:2836-43, 2009 (査読あり)
- ⑥ Chen Y, Zhang H, Gou X, Horikawa Y, Xing J, Chen Z. Upregulation of HAb18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis. Cancer Lett 278:113-21, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

- ① Horikawa Y et al. Clinical implications of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder. The 105th Annual Meeting of the American Urological Association, April, Chicago, 2009
- ② Horikawa Y et al. Polymorphisms in the XRCC1 and MDM2 genes may be associated with recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. The 106th Annual Meeting of the American Urological Association, April, San Francisco, 2010

[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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀川 洋平 (HORIKAWA YOHEI)
秋田大学・医学部・講師
研究者番号：40361232

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：