

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16471

研究課題名（和文）腎ラブドイド腫瘍におけるmiRNAネットワークの治療標的としての可能性

研究課題名（英文）Strategies to use the miRNA-mRNA network as a potential therapeutic target in the treatment of rhabdoid tumor of the kidney

研究代表者

長崎 瑛里（Nagasaki, Eri）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70845354

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、miRNA-mRNA比較統合解析およびGene Ontology (GO) enrichment解析を行い、腎ラブドイド腫瘍（RTK）の腫瘍関連遺伝子の候補を絞り込み、細胞培養系におけるその候補遺伝子の機能を解析した。miRNA-mRNA比較統合解析およびGO enrichment解析の結果からNeuropilin 1 (NRP1)を同定し、RTK細胞においてNRP1の発現を抑制すると、細胞浸潤能と遊走能が抑制された。以上より、NRP1はRTKにおいてOncogeneとして浸潤や遊走を促進する可能性があり、RTKの新たな治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎ラブドイド腫瘍(Rhabdoid tumor of the kidney: RTK)は5年生存率が26%という非常に予後が悪い小児腎腫瘍である。治療は手術、多剤併用化学療法、放射線療法を組み合わせで行うが、有効な治療法は確立しておらず、新規治療法の開発が切望される。本研究結果から、NRP1はRTKにおいてOncogeneとして浸潤や遊走を促進する可能性があり、RTKの新たな治療標的となりうることを示唆された。本研究で得られた知見に基づいて、将来的にはNRP1を標的とした核酸医薬品の開発に発展させ、RTKの予後の改善に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed an integrated analysis of messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA) sequencing to detect candidate oncogenes of rhabdoid tumor of the kidney (RTK) and evaluated their roles in RTK in vitro. The results revealed 40 mRNAs that were highly expressed in RTK cells targeted by exosomal miRNAs, the expression of which was lower in RTK cells than in the controls. A gene ontology enrichment analysis showed that the highly expressed mRNAs were primarily related to cell adhesion. Of these mRNAs, we selected neuropilin 1 (NRP1) as a candidate oncogene because its upregulation is associated with a poor prognosis of several types of tumors. Matrigel invasion and wound healing assays showed that RTK cells in which NRP1 had been knocked down exhibited decreased invasive and migratory abilities. The present study indicated that NRP1 acts as an oncogene by promoting the invasion and migration of RTK cells and that it could serve as a therapeutic target.

研究分野：小児がん

キーワード：腎ラブドイド腫瘍 核酸医薬 miRNA 標的遺伝子 Neuropilin 1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎ラブドイド腫瘍(Rhabdoid tumor of the kidney: RTK)は5年生存率が26%という非常に予後が悪い小児腎腫瘍である<sup>1)</sup>。治療は手術、多剤併用化学療法、放射線療法を組み合わせる行うが、有効な治療法は確立しておらず、新規治療法の開発が切望される。

近年注目されている核酸医薬は、siRNAやmiRNA mimicといった核酸が十~数十塩基連結したオリゴ核酸で構成される医薬品である。mRNAやmiRNAを標的とすることから、特異性が高く副作用も少ない次世代の分子標的薬として期待されている。がんで発現異常を示すmiRNAは、それぞれ標的となるがん抑制遺伝子およびがん促進遺伝子(mRNA)の発現を抑制することにより、がん促進因子およびがん抑制因子のように機能する。またmiRNAの作用はがん細胞のみにとどまらない。細胞内で生成されたmiRNAの一部は細胞外小胞 Exosome に内包されて分泌され(Exosomal miRNA)、血管内皮細胞などのがん微小環境を構成する細胞にも影響を及ぼし、がんの進展に寄与しうる。このようながん細胞およびがん微小環境におけるmiRNAとmRNAの遺伝子発現調節ネットワークが解明できれば、それを標的とする核酸医薬品が考案できる。

これまでに申請者は preliminary data として、RTK細胞を用いたmiRNA-mRNA比較統合解析により、RTKに特異的に発現変化を起こしているmiRNAとmRNAの組み合わせを同定している。本研究ではこれらのmiRNA/mRNAがRTKにおける核酸医薬の治療標的となりうるかを検討する。

### 2. 研究の目的

RTKにおける腫瘍関連miRNAおよびその標的遺伝子を同定し、核酸医薬の治療標的としての可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

RTK細胞株(WT-CLS1、G401)とControlとしてヒト胎生腎由来細胞株HEK293Tからexosomal miRNA、mRNAを抽出し、次世代シーケンシングによる網羅的発現解析を行った。その結果を用いてmiRNA-mRNA比較統合解析を行い、RTK特異的に発現変化を起こしているmiRNAおよびその標的遺伝子を抽出した。抽出された標的遺伝子を対象にGene Ontology (GO) enrichment解析を行い、RTK細胞における発現変動遺伝子の機能的特徴を解析し、候補遺伝子を絞り込んだ。qRT-PCRを行い各種細胞株における候補miRNA/標的遺伝子の発現を解析した。

siRNAを用いて候補遺伝子の発現を抑制し、RTK細胞の生存率、浸潤能、遊走能をWST-8 assay、Matrigel invasion assay、Wound healing assayで解析した。

また、候補遺伝子発現抑制下でRTK細胞において発現が変化する遺伝子を絞り込むことを目的に、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) miRNA-mRNA比較統合解析とGO enrichment解析による候補miRNA/標的遺伝子の同定  
RTK細胞で発現低下を認めたmiRNAの標的遺伝子であり、かつRTK細胞で発現亢進を認めた40個の遺伝子を同定した(表1)。この40個のRTK高発現遺伝子群を対象としてGene Ontology (GO)解析を行い、どのような機能的特徴を有するかを解析したところ、Cell adhesionに關与する遺伝子が有意に濃縮されていた(表2)。この結果から、Cell adhesionに關与する遺伝子の発現異常がRTK細胞の遊走や浸潤に關与している可能性が示唆された。

表1: RTK細胞で発現低下を認めたmiRNAの標的遺伝子であり、かつRTK細胞で発現亢進を認めた40個の遺伝子。

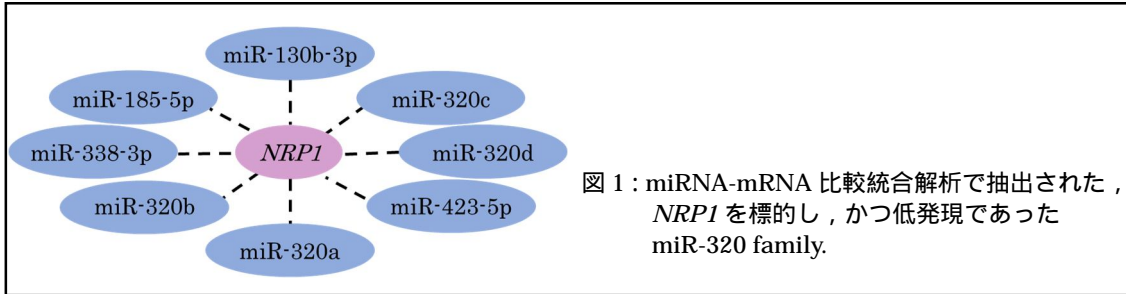
<i>CLCN6</i>	<i>GCNT4</i>	<i>PCDHAC2</i>	<i>ARHGEF17</i>	<i>MYL12A</i>
<i>DHDDS</i>	<i>PCDHA3</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>PDGFD</i>	<i>SOC36</i>
<i>KCMF1</i>	<i>PCDHA4</i>	<i>ADRA1B</i>	<i>ITGA5</i>	<i>MIER2</i>
<i>FHL2</i>	<i>PCDHA5</i>	<i>TSC22D4</i>	<i>CKAP4</i>	<i>TPM4</i>
<i>DAG1</i>	<i>PCDHA6</i>	<i>ARHGEF10</i>	<i>CPEB1</i>	<i>FTL</i>
<i>ETV5</i>	<i>PCDHA7</i>	<i>ATP6V1B2</i>	<i>TNFRSF12A</i>	<i>ZNF667</i>
<i>NAP1L5</i>	<i>PCDHA13</i>	<i>NSMAF</i>	<i>SCARF1</i>	<i>PARD6B</i>
<i>SORBS2</i>	<i>PCDHAC1</i>	<i>NRP1</i>	<i>SERPINF1</i>	<i>C2CD2</i>

これらの遺伝子のうち、*Neuropilin 1 (NRP1)*はこれまでに悪性腫瘍との関連が多く報告されていることから<sup>2-4)</sup>、RTKにおける腫瘍関連遺伝子の候補として以降の実験の解析対象とした。qRT-PCR、Western blottingを行い、Controlと比較し、RTK細胞株において*NRP1*の発現が有意に高いことを確認した。

また、*NRP1*を標的とするmiRNAには、がん抑制miRNAとして報告されているmiR-320 family<sup>5-7)</sup>が多く含まれていた(図1)。

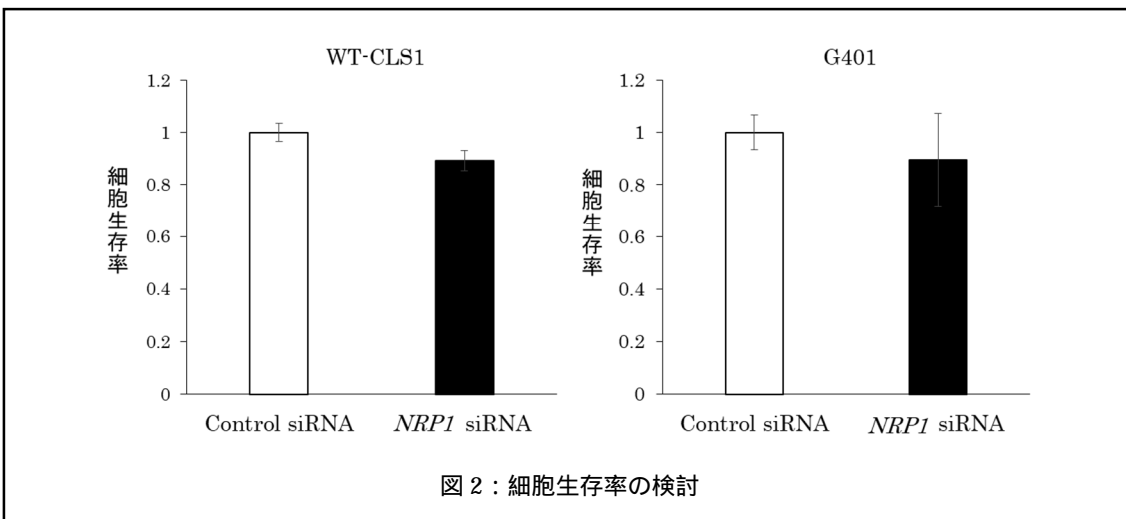
表 2 : miRNA-mRNA 比較統合解析で抽出された 40 個の RTK 高発現遺伝子における GO 解析 .

ID (GO ACCESSION)	GO term	Count in total	Count in selection	Expected	Fold Enrichment	raw p-value	Corrected p-value
GO:0007155	Cell adhesion	951	14	1.83	7.85	1.62E-09	1.28E-05



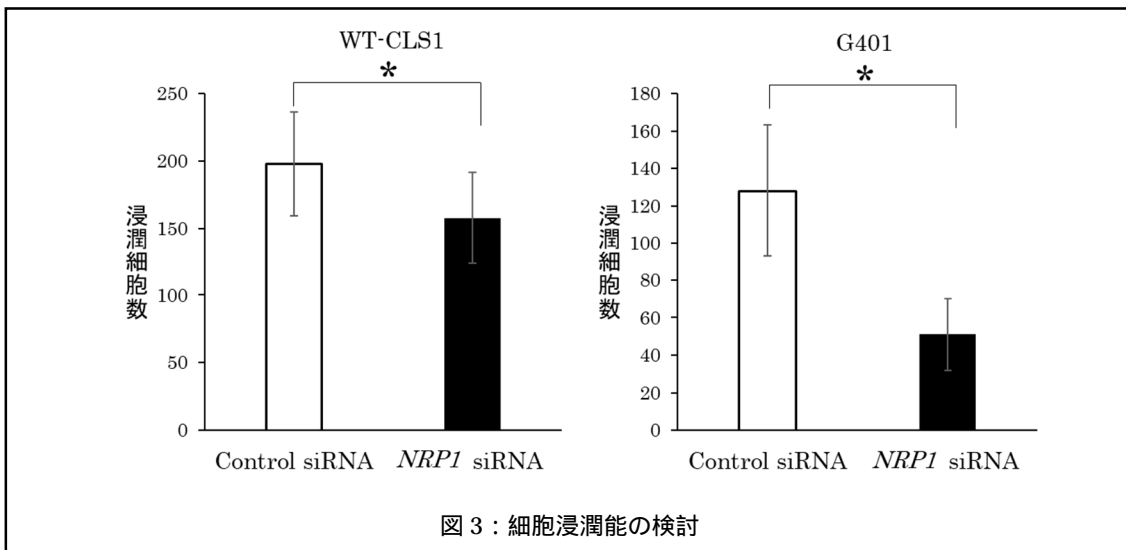
(2) *NRP1* 発現抑制下における RTK 細胞の生存率の解析

siRNA を用いて *NRP1* の発現抑制を行い、RTK 細胞の生存率の変化を WST-8 assay で解析したところ、WT-CLS1、G401 とともに細胞生存率の有意な変化は認めなかった ( 図 2 )。



(3) *NRP1* 発現抑制下における RTK 細胞の浸潤能の解析

siRNA を用いて *NRP1* の発現抑制を行い、RTK 細胞の浸潤能の変化を Matrigel invasion assay で解析したところ、WT-CLS1、G401 とともに *NRP1* の発現抑制下で細胞浸潤能の有意な低下を認めた ( 図 3 )。



(4) *NRP1* 発現抑制下における RTK 細胞の遊走能の解析

siRNA を用いて *NRP1* の発現抑制を行い、RTK 細胞の遊走能の変化を Wound healing assay で解析したところ、WT-CLS1 においては *NRP1* の発現抑制下で細胞遊走能の有意な低下を認めた。G401 では有意な変化は認めなかったが、*NRP1* の発現抑制下で細胞遊走能

の低下傾向を認めた(図4)。

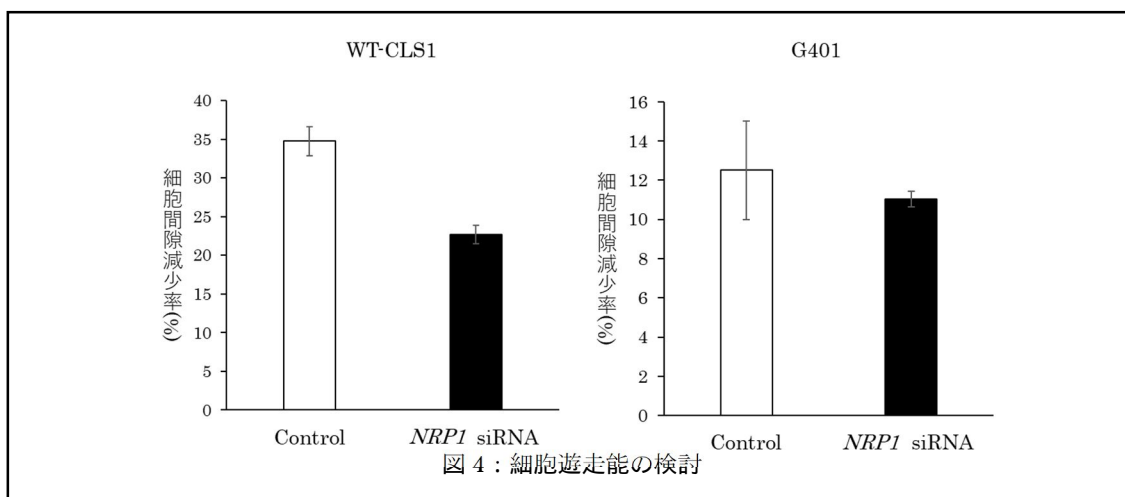


図4：細胞遊走能の検討

(5) *NRP1* を標的とし、かつ RTK 細胞株において低発現である miRNA の発現解析

miRNA-mRNA 比較統合解析により同定した、*NRP1* を標的とし、かつ RTK 細胞株において低発現である 8 つの miRNA のうち、miR-320a、miR-320b、miR-320c について、qRT-PCR を行い各種細胞株での発現を解析した。しかし、これらの miRNA の発現が HEK293 と比較して RTK 細胞株で低いことを、研究期間内では確認できなかった。

(6) RTK 細胞における *NRP1* 発現抑制下での遺伝子発現変化の検討

RTK 細胞において *NRP1* の発現抑制により発現が変化する遺伝子を絞り込むことを目的に、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行った。結果、RTK 細胞において *NRP1* の発現抑制により発現が低下する遺伝子を 28 個、発現が上昇する遺伝子を 24 個抽出した。抽出した遺伝子群には細胞運動に関与するものも含まれており、これらの遺伝子を対象に、*NRP1* との関係性や RTK 細胞における役割について検討を継続している。

(7) *NRP1* 以外の RTK 腫瘍関連遺伝子の探索

miRNA-mRNA 比較統合解析により、RTK 細胞で高発現の miRNA の標的遺伝子であり、かつ RTK 細胞株において低発現である 28 の遺伝子を抽出した。この 28 の遺伝子を対象に GO enrichment 解析を行い、RTK 細胞における発現変動遺伝子の機能的特徴を検討したが、有意な結果は得られなかった。

(8) 考察

*NRP1* は 1 回膜貫通型受容体蛋白の *NRP1* をコードし、神経細胞や血管内皮細胞のほかに、腫瘍細胞にも発現が認められる。*NRP1* のリガンドは主に 5 つのタイプが存在する；VEGF や TGF- $\beta$ 、HGF、PDGF が *NRP1* と結合すると、ERK や PI3K/Akt pathway を介して細胞の増殖や遊走を促進する他、semaphorin 3 family が *NRP1* と Plexin に作用し、細胞増殖や遊走、血管新生を抑制することなどが報告されている<sup>8)</sup>。*NRP1* は神経系の発達や免疫機能の他、血管新生や腫瘍進展に重要な役割を担っている<sup>8-11)</sup>。胃癌や肝細胞癌、骨肉腫など様々な癌腫で高発現しており、*NRP1* の高発現は予後不良や転移を示唆する報告が認められる<sup>2-4)</sup>。

腫瘍進展における *NRP1* の重要な役割として、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の促進がある。EMT は悪性腫瘍上皮細胞が浸潤・遊走能を獲得する生物学的プロセスである<sup>12)</sup>。本研究結果から、RTK における *NRP1* の高発現が EMT を誘導することで細胞浸潤・遊走を促進し、高頻度の転移や予後不良に関与する可能性が示唆された。

本研究の Limitation として、miRNA の発現を qRT-PCR で validation できていない、miRNA と *NRP1* の相互作用について解明できていない、*NRP1* 発現抑制下での浸潤や遊走に関わる下流シグナル分子の解析がなされていないことが挙げられ、さらに、生体内での *NRP1* 発現抑制による抗腫瘍効果を検討することで、将来的な核酸医薬の治療標的としての臨床的有用性を評価する必要がある。

<引用文献>

1. Dähnert W: Radiology review manual. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2017
2. Li L, Jiang X, Zhang Q, Dong X, Gao Y, He Y, Qiao H, Xie F, Xie X and Sun X: Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors. J Exp Clin Cancer Res 35: 16, 2016.
3. Zhang Y, Liu P, Jiang Y, Dou X, Yan J, Ma C, Fan Q, Wang W, Su F, Tang H, et al: High expression of Neuropilin-1 associates with unfavorable clinicopathological features in

- hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 22: 367-375, 2016.
4. Zhu H, Cai H, Tang M and Tang J: Neuropilin-1 is overexpressed in osteosarcoma and contributes to tumor progression and poor prognosis. *Clin Transl Oncol* 16: 732-738, 2014.
  5. Bronisz A, Godlewski J, Wallace JA, Merchant AS, Nowicki MO, Mathsyaraja H, Srinivasan R, Trimboli AJ, Martin CK, Li F, et al: Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. *Nat Cell Biol* 14: 159-167, 2011.
  6. Hsieh IS, Chang KC, Tsai YT, Ke JY, Lu PJ, Lee KH, Yeh SD, Hong TM and Chen YL: MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Carcinogenesis* 34: 530-538, 2013.
  7. Vishnubalaji R, Hamam R, Yue S, Al-Obeed O, Kassem M, Liu FF, Aldahmash A and Alajez NM: MicroRNA-320 suppresses colorectal cancer by targeting SOX4, FOXM1, and FOXQ1. *Oncotarget* 7: 35789-35802, 2016.
  8. Prud'homme GJ and Glinka Y: Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 3: 921-939, 2012.
  9. He Z and Tessier-Lavigne M: Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* 90: 739-751, 1997.
  10. Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ and Ginty DD: Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90: 753-762, 1997.
  11. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G and Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745, 1998.
  12. Jin Q, Ren Q, Chang X, Yu H, Jin X, Lu X, He N and Wang G: Neuropilin-1 predicts poor prognosis and promotes tumor metastasis through epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *J Cancer* 12: 3648-3659, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryo Sakai, Kyoko Fujiwara, Eri Nagasaki-Maeoka, Yoshinori Inagaki, Bin Yamaoka, Eri Muto-Fujita, Yusuke Kamidaki, Tsugumichi Koshinaga, Shuichiro Uehara, Tadateru Takayama, Shuichi Sato.	4. 巻 27
2. 論文標題 Knockdown of TFAP2E results in rapid G2/M transition in oral squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2024.14260	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長崎 瑛里, 上原 秀一郎, 星 玲奈, 細川 崇, 金田 英秀, 下澤 克宜, 谷ヶ崎 博, 越永 従道
2. 発表標題 Anaplastic sarcoma of the kidneyの1例(第2報) DICER1遺伝子解析について
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Muto Eri, Yamaoka Bin, Nagasaki Eri, Abe Naoko, Fujiwara Kyoko, Koshinaga Tsugumichi, Uehara Shuichiro
2. 発表標題 腎ラドイド腫瘍細胞におけるケトン体による抗腫瘍効果の検討(Ketone bodies inhibit the growth of rhabdoid tumor of the kidney cells)
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 恭子, 関本和洋, 廣田大樹, 神戸 洸哉, 金城はなか, 小林佑朔, 松田大聖, 村上瑞希, 坂口陸, 佐藤睦, 長崎瑛里, 池田和博, 高山賢一, 井上聡, 大月穰
2. 発表標題 分子内エチレングリコールの数が新規呼吸鎖複合体 阻害剤9bwの機能に与える影響
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山岡敏, 長崎瑛里, 植草省太, 武藤衣里, 阿部奈緒子, 藤原恭子, 越永従道, 上原秀一郎
2. 発表標題 miRNA-mRNA比較統合解析を用いた腎ラブroid腫瘍の治療標的の検討
3. 学会等名 第61回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2024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