

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430137

研究課題名(和文) 血中低分子核酸を指標にした腎細胞癌新規腫瘍マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel tumor markers for renal cell carcinoma by evaluating small nuclear acid in blood

研究代表者

鏑野 秀一 (tatarano, shuichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30624655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制型マイクロRNA200ファミリー(miR-200a、miR-200b、miR-429クラスターと、miR-200cとmiR-141クラスター)に注目した。miR-200sの発現導入により、上皮間葉転換(EMT)のスイッチであるZEB1/2遺伝子の発現が抑制され、細胞接着因子であるE-cadherinの発現が上昇した。またmiR-138はZEB1/2の下流のVimentinの発現を抑制した。またRNA29ファミリーは癌細胞の遊走・浸潤に関わるLOXL2を制御してextracellular matrix (ECM)を不安定化した。このようなマイクロRNAは腎細胞癌の腫瘍マーカーとなり得る。

研究成果の概要(英文)：We focused on miR-200s (miR-200a/miR-200b/miR-429 cluster and miR-200c/miR-141cluster). ZEB1/2 genes that are key molecules for EMT were repressed by miR-200s transfection. miR-138 targeted Vimentin which was under stream of ZEB1/2. Tumor suppressive miR-29s repressed LOXL2 and lead to instability of ECM. These microRNAs could be a biomarker of renal cell carcinoma.

研究分野：マイクロRNA

キーワード：マイクロRNA 腎細胞癌 腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は、国内で年間約1万人が罹患するが、スクリーニング CT などで偶発的に発見される症例も増えている。しかし CT で造影効果を伴わない非典型的な腎腫瘍の術前診断は困難で、良性であっても鑑別のために腎摘除術が選択されることも多い。また術後の再発判定のために頻回に CT 検査が実施されており、患者への身体的負担やコスト面の問題は大きい。この背景には、前立腺癌における PSA のように腎細胞癌を早期で発見する有効な腫瘍マーカーが無いことが挙げられる。また最近、切除不可能な転移性腎細胞癌に対して種々のマルチキナーゼ阻害薬や mTOR 阻害薬の分子標的薬が開発され、それらの交替療法が推奨されているが、交替のタイミングの指標はなく、試行錯誤の段階である。このような現状から非侵襲的で感度・特異度ともに優れた腫瘍マーカーの早急な開発が望まれている。

ヒトゲノム解析研究の成果として、ヒトゲノム中には、従来の概念であるタンパクコード遺伝子はわずか2%で、その他の大部分が非タンパクコード遺伝子(機能性 RNA や非転写領域)で占められている事が判明した。機能性 RNA 分子の中で、miRNA に分類される RNA 分子は、最終的に1本鎖の RNA 分子として機能し、タンパクコード RNA の翻訳阻害や分解を通してタンパクコード遺伝子の制御をしている。最近では、ヒト癌において癌抑制遺伝子または癌遺伝子として機能する miRNA の報告が相次いでおり、癌の発生・進展・転移・治療抵抗性に重要な役割を担っている事が判明しつつある。

これまで miRNA は、細胞内の遺伝子発現制御因子として考えられてきたが、miRNA 研究の最近のトピックスとして、miRNA が細胞外に分泌される事が明らかになり (Nat Cell Biol 9, 654-659, 2007)、ヒトの体液(唾液・血清・尿など)から検出された報告が相次いで

ている。これは Exosome という細胞小胞体に包埋された miRNA が血液を循環しており遠隔の細胞に取り込まれ、まるでホルモンのように作用するというものである。血中を循環している miRNA の機能解析は今後の大きな課題であるが、血液循環型の miRNA を指標とした癌特異的マーカーの可能性は十分に考えられる。癌細胞では、癌遺伝子型の miRNA がしばしば高発現している事が示されており、これら miRNA を指標とした腫瘍マーカーの探索研究は臨床に直結する課題である。

## 2. 研究の目的

近年、進行性腎細胞癌に対する分子標的薬が相次いで開発され治療効果の改善を認めるが、腎細胞癌の腫瘍マーカーは未だ存在せず、治療効果の判定は専ら画像診断に依存している。また小径腎癌の診断や根治的手術後の再発の判定にも有効な腫瘍マーカーがない。最近、低分子核酸である microRNA(miRNA) が血液中を循環している事が判明し、この核酸を指標にした癌の診断の報告が相次いでいる。我々は、腎細胞癌臨床検体を用いた miRNA の発現プロファイルを作成し、癌細胞で発現亢進している miRNA 分子について既に情報を得ている。更に、分子標的薬使用後の剖検検体の RNA から miRNA の発現プロファイルの作成に着手した。本研究は、腎細胞癌患者で発現が亢進している miRNA を指標にして、血液中を循環している miRNA を検出し、腎癌の腫瘍マーカーとしての有効性を検討する申請である。候補となる miRNA の血中における検出が小径腎癌の診断に有効であるか、また再発・転移の指標になるか、さらに分子標的薬の治療効果の指標になるか検討することが目的である。

## 3. 研究の方法

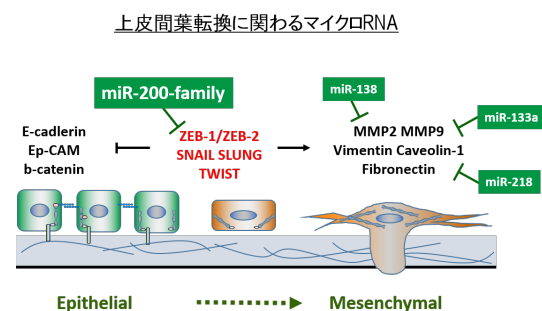
研究は大きく分けて以下の3段階のステップを経て行った。

- (1) 分子標的薬 (Sunitinib、Temsirolimus など) を投与後の剖検腎癌検体を使用した miRNA 発現プロファイルを作成し、分子標的薬施行前のプロファイルと比較することにより、分子標的薬耐性に関わる miRNA を選択する。このような候補 miRNA (上位 10 種類程度) について、分子標的薬で治療中の患者血液中における発現を経時的に測定する。
- (2) 上記解析により、腎細胞癌において感度・特異度ともに優れた腫瘍マーカーの候補が得られた場合、その miRNA の機能解析と miRNA が制御する機能性 RNA の分子ネットワークの探索を行う。
- (3) 腫瘍マーカーの候補が得られた場合、腎細胞癌患者、健常者等の大規模なサンプル収集を開始し、臨床試験に向けた準備を開始する。

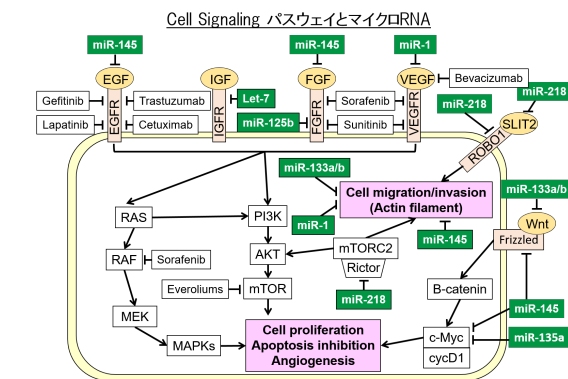
#### 4. 研究成果

上皮間葉転換 (EMT) は上皮細胞がその細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い、遊走・浸潤能力を獲得し間葉系細胞に変化するプロセスであり、癌の浸潤・転移の過程においても重要である。マイクロ RNA200 ファミリー (miR-200s) は共通の塩基配列パターンを有する 5 つのマイクロ RNA からなる。この中で miR-200a、miR-200b、miR-429 は 1 番染色体 p36.33 に近接して存在し、また miR-200c と miR-141 は 12 番染色体 p13.31 に近接して存在するクラスターマイクロ RNA である。面白いことに miR-200b、miR-200c、miR-429 は共通の塩基配列 (AAUACUG) を有し、miR-200a と miR-141 も共通の塩基配列 (AACACUG) を有している。仮に一方の染色体領域が欠失しても共通の配列を有する他のファミリーマイクロ RNA の発現が維持されるようになって興味深い。これらのマイクロ RNA200 ファミリークラスターが共通して制御する遺伝子は重要と思われる。miR-200s の発現導入

により、EMT のスイッチともいべき ZEB1、ZEB2 遺伝子の発現が抑制され、細胞接着因子である E-cadherin (CHD1) の発現が上昇した。また別の miR-138 は ZEB1/2 の下流の Vimentin (VIM) の発現を抑制することがわかった (下図)。



最近の話題として lysyl oxidase (LOX) family 遺伝子は extracellular matrix (ECM) におけるコラーゲンやエラスチンの安定化に関わっているが、その過剰発現は ECM を不安定化して癌細胞の遊走・浸潤に関わっているとされている。癌抑制型マイクロ RNA29 ファミリー (miR-29s) は腎癌細胞において LOXL2 を制御することも明らかになった。腎細胞癌に対する分子標的薬は Receptor Tyrosine kinase (RTK) や mTOR 経路の阻害薬などで、癌細胞の増殖や血管新生に関わるシグナル伝達経路を阻害することを目的としている。我々の研究により、多くのマイクロ RNA がこれらの経路の重要な分子を標的とすることが近年明らかになってきた (下図)。



すなわち Tyrosine kinase inhibitor (TKI) が標的とするリガンドやレセプターはいくつかの癌抑制型マイクロ RNA の標的遺伝子あ

り、腎癌細胞ではこれらのマイクロ RNA の発現が抑制されることによって、RTK や mTOR の経路が活性化していることが示唆されている。当然のことながらマイクロ RNA は、分子標的薬耐性にも深く関わっていると考えている。今後、これらのマイクロ RNA の発現を個々の症例において測定し、その発現パターンから活性化している経路を見出せば分子標的薬のオーダーメイド治療につながる可能性があり期待される。

#### 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 4 件 )

1. Tumour-suppressive microRNA-29s directly regulate LOXL2 expression and inhibit cancer cell migration and invasion in renal cell carcinoma. Nishikawa R, Chiyomaru T, Enokida H, Inoguchi S, Ishihara T, Matsushita R, Goto Y, Fukumoto I, Nakagawa M, Seki N. FEBS Lett. 2015;589:2136-45. ( 査読あり )
2. Expression of the tumor suppressive miRNA-23b/27b cluster is a good prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. Ishihara T, Seki N, Inoguchi S, Yoshino H, Tatarano S, Yamada Y, Itesako T, Goto Y, Nishikawa R, Nakagawa M, Enokida H. 2015;192:1822-30. ( 査読あり )
3. Epithelial-mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma. Yoshino H, Enokida H, Itesako T, Tatarano S, Kinoshita T, Fuse M, Kojima S, Nakagawa M, Seki N. J Hum Genet. 2013;58:508-16. ( 査読あり )

4. MicroRNA-218 inhibits cell migration and invasion in renal cell carcinoma through targeting caveolin-2 involved in focal adhesion pathway. Yamasaki T, Seki N, Yoshino H, Itesako T, Hidaka H, Yamada Y, Tatarano S, Yonezawa T, Kinoshita T, Nakagawa M, Enokida H. J Urol. 2013;190:1059-68. ( 査読あり )

[ その他 ]

ホームページ等 : <http://genomejet.jp/>

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

鑪野秀一 ( TATARANO SHUICHI )

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号 : 30624655

##### (2) 研究分担者

小島 聡子 ( KOJIMA SATOKO )

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10345019

関 直彦 ( SEKI NAOHICO )

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 50345013

榎田 英樹 ( ENOKIDA HIDEKI )

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号 : 80347103

中川 昌之 ( NAKAGAWA MASAYUKI )

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号 : 90164144