

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861276

研究課題名(和文) 機能性RNAネットワーク解析に基づく腎癌低酸素耐性機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of hypoxia resistance in renal cell carcinoma based on functional RNA network analyses

研究代表者

千代丸 剛 (Chiyomaru, Takeshi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60593796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌遺伝子MYCはmiR-135aにより直接制御されることが明らかになった。さらにmiR-1291は解糖系に関わる重要なグルコース輸送タンパクであるglucose transporter 1 (SLC2A1/GLUT1)を制御した。またmiR-143/miR-145クラスター癌抑制型マイクロRNAであるが、共通して解糖系の重要な酵素であるhexokinase 2 (HK2)を制御した。腎癌細胞ではmiR-135a、miR-1291、miR-143、miR-145の発現を抑制することで低酸素環境下でも解糖系によるATP産生を維持し、分子標的薬による耐性を獲得している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that MYC oncogene was directly regulated by miR-135a. miR-1291 also regulated glucose transporter 1 (SLC2A1/GLUT1). miR-143/145 is a tumor suppressive cluster microRNA, and they had a common target hexokinase 2 gene. Down regulation of miR-135a, miR-1291, miR-143, and miR-145 might activate glycolytic pathway and maintain ATP synthesis under hypoxia circumstances in renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：腎細胞癌 マイクロRNA 低酸素

1. 研究開始当初の背景

腎癌は、日本国内で年間約1万人が罹患する悪性腫瘍であり、手術以外に根治的治療法がなく、化学療法や放射線療法が有効でないことが特徴である。転移性腎癌の5年生存率は約20%と著しく低い。従来、進行性腎癌や転移にはインターフェロンやインターロイキンを中心とした免疫療法が使用され、奏効率は15%程度と満足すべきものではなかった。近年、チロシンキナーゼ阻害薬やmTOR阻害剤等の分子標的治療薬が実用化されたが、奏効率は40%程度であり、延命効果は数カ月に過ぎない。2003年に完了したヒトゲノムシーケンス計画より、ヒトのゲノム中には、タンパク質をコードする遺伝子はわずか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)で占められていることがわかった。これら機能性RNAのうちマイクロRNAは二十数塩基前後からなる短いRNAで、現在までにヒトで約2000種類以上が見つかっており、標的遺伝子の3'非翻訳領域に結合し、その翻訳(タンパク合成)を妨げる働きをする。マイクロRNAは発生や分化から生体内の様々な現象や機能に関与し、全タンパク質コード遺伝子の60%以上の制御に関わる可能性が予測されている。癌組織においては、発現異常により標的遺伝子の発現を制御し、マイクロRNA自体が癌遺伝子または癌抑制遺伝子として機能することが報告されていた。すなわち、癌研究において、タンパクコード遺伝子の相互分子ネットワークの解析だけでは不十分であり、機能性RNAを含めた癌分子ネットワークの再理解・再構築を行う事が必要となってきた

我々は腎癌の発癌や進展のメカニズムを解明するためマイクロRNAの役割を研究してきた。腎癌検体10例(限局癌+局所浸潤癌)と正常検体5例を用いてマイクロアレイを行ない、独自のマイクロRNA発現プロファイルを作成し、癌抑制的マイクロRNAとその標的

遺伝子を報告していた。さらに癌抑制的マイクロRNAとその標的となる遺伝子との新規癌ネットワークの構築も行っていった。

チロシンキナーゼ阻害薬(ソラフェニブ、スニチニブ等)は、癌細胞に対して増殖を仲介するシグナル伝達をブロックし、抗腫瘍効果を発揮するのみならず、血管内皮細胞に対して血管新生に関与する増殖因子受容体をブロックする。その結果、腫瘍への血管新生を阻害し、低酸素状態に陥らせ抗腫瘍効果をもたらす。分子標的薬の登場で制癌されるかと思われていたが、腎癌は、さらにそれに抵抗し生存、進展する。腎癌では以前から低酸素状態におけるVHL遺伝子やHIF1遺伝子の関与が注目されてきているが、まだまだ十分なメカニズムは解明されていなかった。

2. 研究の目的

機能性RNA分子のひとつであるmicroRNA(miRNA)は、タンパクコード遺伝子の発現制御を司る重要なRNA分子であり、癌の発生・進展・転移に深く関わっている。我々は腎癌のmiRNA解析に逸早く取り組み、これまでに癌抑制型miRNAの探索とmiRNAが制御する遺伝子群の報告をしてきた。その中で、腎癌で見出された癌抑制型miRNAが複数の受容体型チロシンキナーゼ(VEGF・EGFR・FGFR・IGFRなど)とその下流のシグナル伝達経路を制御している知見を得た。今回は分子標的薬耐性機序の一因としてマイクロRNAを基点とした低酸素環境下で活性化しているシグナル経路の解明を行う。低酸素環境下培養腎癌細胞で同定された活性化経路の解明を行い、それと臨床腎癌患者における癌抑制型miRNAの発現とその下流の分子ネットワークとの整合性を詳細に検討する事で、個々の患者に適した分子標的薬や既存薬剤の個別化治療が可能と考えた。本申請は、現在使用可能な既存治療薬の標的となっているシグナル伝達機構と、腎癌細胞における機能性RNA分子

ネットワークの相互関係を研究・理解して、腎癌の新規個別化治療戦略を構築し提案する事が目的である。

3. 研究の方法

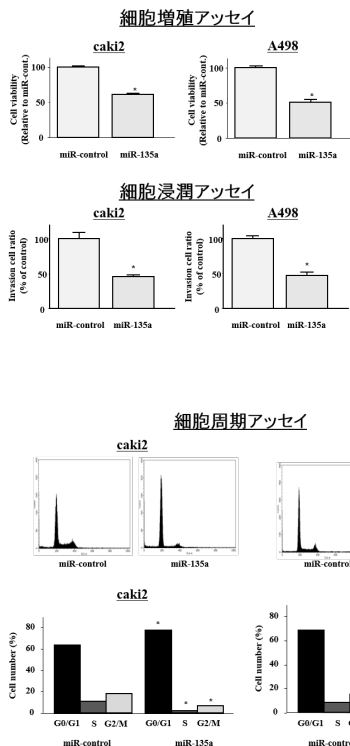
研究は大きく分けて以下の3段階のステップを経て行った。

- (1) 低酸素状態に誘導されるマイクロ RNA の探索とその標的遺伝子・分子ネットワークの探索：低酸素培養条件下の腎癌由来細胞株からマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。このリストを基に低酸素状態で誘導されるマイクロ RNA とその標的遺伝子を探索するために生物情報科学の手法を用いた *in silico* 解析を行った。
- (2) (1)で明らかとなったシグナル伝達機構について、チロシンキナーゼ阻害剤治療抵抗性を示した臨床検体を用いた検証：臨床検体におけるこれらマイクロ RNA と標的遺伝子の発現を PCR や免疫組織学的検査で調べ、臨床病理学的事項との相関を検証した。
- (3) 低酸素下で活性化されているシグナルを遮断する方法の検討および細胞株を用いた腫瘍抑制効果の検討：細胞株においてこれらマイクロ RNA と標的遺伝子を発現導入またはノックダウンして、癌細胞の増殖・遊走・浸潤能の変化を実験した。

4. 研究成果

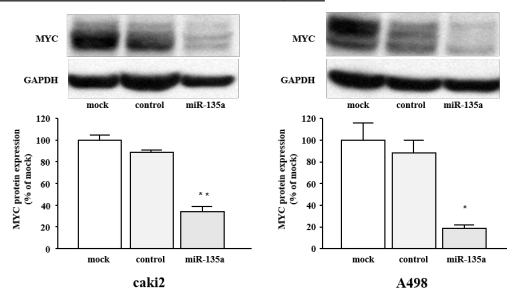
淡明細胞型腎細胞癌 10 検体において正常腎組織と比べて発現が低下しているマイクロ RNA のリストを作成した。この中で *miR-135a* は腎細胞癌細胞株 (Caki-2、A498) に発現導入すると細胞の増殖・浸潤能が抑制され、細胞周期アッセイでは G0/G1 細胞周期停止が誘導された (次図)。

miR-135a 発現導入による細胞機能解析

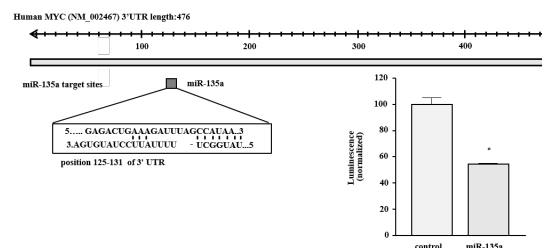


In-silico 解析で標的遺伝子の候補となった癌遺伝子 MYC はルシフェラーゼアッセイにて *miR-135a* と直接結合することが明らかになった。またウエスタンブロットでは MYC のタンパク発現は *miR-135a* 発現導入細胞株で著しく抑制された (次図)。

miR-135aによるMYCノックダウン実験



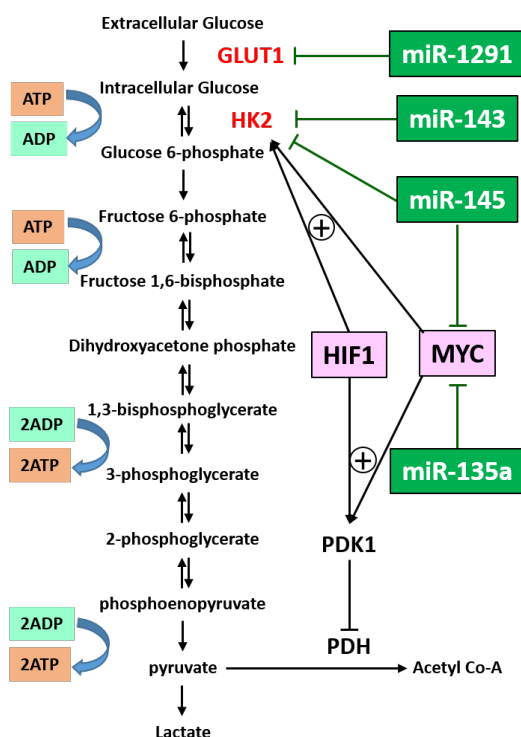
ルシフェラーゼアッセイによる結合サイトの証明



さらに *miR-1291* は解糖系に関わる重要なグルコース輸送タンパクである glucose

transporter 1 (SLC2A1/GLUT1) を制御することを見出した。また *miR-143* と *miR-145* は共に 5 番染色体 q32 の近接した領域から転写されるためクラスターマイクロ RNA と呼ばれ、種々の癌でも発現が低下している癌抑制型マイクロ RNA であるが、これらは共通して解糖系の重要な酵素である hexokinase 2 (HK2) を制御することが判明した¹⁾。腫瘍細胞ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化よりも、解糖系によるアデノシン三リン酸 (ATP) 産生が亢進しており、低酸素環境下でも生き残れるメカニズムとされ、これを Warburg 効果と呼んでいる。このように腎癌細胞では *miR-135a*, *miR-1291*, *miR-143*, *miR-145* の発現を抑制することで低酸素環境下でも解糖系による ATP 産生を維持し、分子標的薬による耐性を獲得している可能性が示唆された (次図)。

癌抑制型マイクロRNAによる解糖系の制御



このような研究を通して microRNA を基点としていくつかの重要な腎細胞癌の治療戦略の糸口が明らかになった。今後、*vivo* の実験を展開していく予定である。

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3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. J Urol. 2014;192:1822-30. (査読あり)
3. Long non-coding RNA HOTAIR is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells. Chiyomaru T, Fukuhara S, Saini S, Majid S, Deng G, Shahryari V, Chang I, Tanaka Y, Enokida H, Nakagawa M, Dahiya R, Yamamura S. J Biol Chem. 2014;289:12550-65. (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

千代丸 剛 (CHIYOMARU TAKESHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60593796

(2)研究協力者

中川 昌之 (NAKAGAWA MASAYUKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：90164144

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：80347103

関 直彦 (SEKI NAHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50345013