

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22591773

研究課題名（和文）腎癌における RNA 干渉による免疫回避機構の解明と治療への応用に関する研究

研究課題名（英文）Expression and role of miRNA in renal cell carcinoma which resists to immunotherapy

研究代表者

石橋 啓（ISHIBASHI KEI）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90347211

研究成果の概要（和文）：本研究では腎癌に対する免疫療法の一つとして位置づけられているインターフェロン療法に対する抵抗性をきたすメカニズムについて解析した。腎細胞癌株 786-O、ACHN、Caki2 等を用いたインターフェロン投与時の miRNA および mRNA 発現解析から、IFN 耐性株の 786-O において、miRNA の一種 hsa-miR-93 と SOCS3-mRNA が強発現していることが判明した。それぞれを miRNA inhibitor や siRNA で knock out した状態でインターフェロン感受性を解析したところ SOCS3 を抑制した場合のほうが hsa-miR-93 を抑制した場合より感受性が有意に回復した。SOCS3 抑制には IL-6 受容体抗体の効率がよく、将来臨床応用も可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Interferon (IFN)- α is one of the most commonly used agents in immunotherapy for patients with advanced-stage renal cell carcinoma. However, because of the drug resistance to IFN- α , its benefits are limited. In this study, we evaluated the expression of hsa-miR-93 or SOCS3-mRNA in renal cell carcinoma cells which resists to IFN treatment. Among the renal cell carcinoma cell lines which we used in this study, 786-O cells showed resistance to IFN treatment. The expression of both hsa-miR-93 and SOCS3-mRNA was significantly higher compared with other cell lines. Suppression of hsa-miR-93 or SOCS3-mRNA induced sensitivity to IFN in 786-O cells. Especially, down regulation of SOCS3-mRNA enhanced STAT1 activation and anti-tumor activity of IFN, both *in vitro* and *in vivo*, in a human IFN-resistant RCC cell line 786-O. Because IL-6 receptor antibody blocked SOCS3 efficiently, combination therapy using an antihuman IL-6R antibody with IFN- α may represent a novel therapeutic approach for the treatment of renal cell carcinoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

Micro RNA(miRNA)は18~25塩基からなる低分子 noncoding RNA であり、通常標的とする mRNA の 3'UTR に結合し遺伝子の転写後制御に関わっている。MiRNA は細胞の発達や分化、増殖など様々な機能に関与すると考えられており、これまでヒトにおいては約 500 種同定されている。MiRNA の機能として最も研究されているのが癌との関係で、癌の血管新生と miR-17-19 との関連や前立腺癌と miR-15a-miR-16-1 との関連などが近年報告されている。しかしその機能が解明されている miRNA はこれまでのところ限られている。我々はこれまで免疫感染分野での研究の過程で IFN シグナルにおいて suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の発現が重要な役割を示していることを解明した。泌尿器科領域への応用では、IFN 療法抵抗性の腎癌細胞を IFN で刺激した後 SOCS3-mRNA の発現が IFN 感受性の癌細胞より有意に強く、siRNA にて SOCS3 を抑制すると IFN 感受性が回復することを明らかにした。また、ヌードマウスを用いた *in vivo* の実験系では IFN 耐性の腎癌細胞は SOCS3 に対する siRNA 局所投与を併用することによって皮下に形成した腫瘍の縮小と、免疫組織学的に腫瘍細胞の細胞死が観察された。これらの結果から腎癌においても IFN 下流のシグナルには SOCS3 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。この研究過程において IFN は腎癌細胞に apoptosis を誘導する事が示されたが、この癌細胞において apoptosis 誘導に重要な役割を担っている可能性があるのが TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) である。TRAIL は NK 細胞に発現する TNF ファミリーの一つで受容体に作用するとカスパーゼ 1 および 8、次いでカスパーゼ 3 を活性化して腫瘍細胞に apoptosis を起こす。我々はこれまでこの TRAIL 受容体が miRNA の一種によって発現がコントロールされている可能性も指摘してきた

2. 研究の目的

腎癌細胞における IFN 感受性解明するための手段として腎癌細胞における miRNA 発現を microRNA Array によって解析し、IFN 感受性に関連する miRNA を同定し、そのターゲット遺伝子を miRANDA により解析し、miRNA 発現と IFN 感受性の関連を解明する。

3. 研究の方法

腎癌細胞における miRNA 発現を microRNA Array によって解析し、発現が亢進している、

もしくは低下している miRNA を同定する。同定された miRNA のターゲット遺伝子はスローンケタリング記念癌センター開発の

「miRNCANDA」を用いて標的遺伝子を予測する。予測されたターゲット遺伝子の中で腎癌の IFN 感受性に影響を与えると思われる遺伝子の発現量の変化と miRNA 発現の変化との相関を解析する。

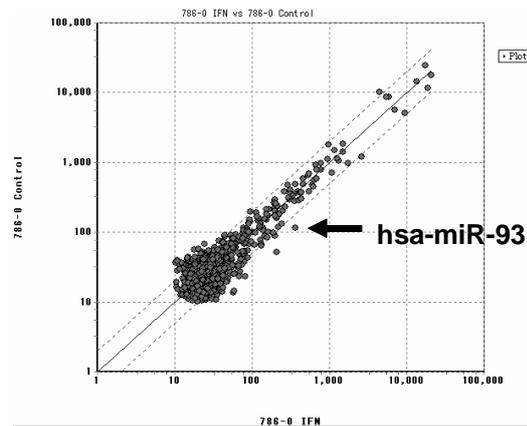
腎癌細胞における miRNA 発現は miRNA precursor にて発現亢進を、miRNA inhibitor を用いて発現抑制を誘導する。ターゲット遺伝子の発現解析は real time PCR とウエスタンブロット法により mRNA と蛋白レベルでの発現量の変化を解析する。

また、腎癌細胞における表現形の変化はインターフェロインを加えたときの腎癌細胞の増殖能の変化として MTT アッセイで解析する。

また腎癌ヌードマウス皮下移植モデルを作成し、ターゲット遺伝子を knock down したときのインターフェロン感受性の変化を腫瘍増殖曲線や、摘出標本の病理学的検査から解析する。

4. 研究成果

腎癌細胞における miRNA 発現を microRNA Array によって解析したところ、腎癌細胞に IFN と加えた場合には 4 種類の miRNA が投



与前に比較して有意に発現が上昇していることが判明した。それらの予想ターゲット遺伝子を検索したところ、hsa-miR-93 のターゲットに TNFSF10A があることが判明した。これは TRAIL 受容体のひとつ DR4 であり、これが抑制された場合、TRAIL 感受性が低下すること、つまり IFN 感受性が低下することが予想された。

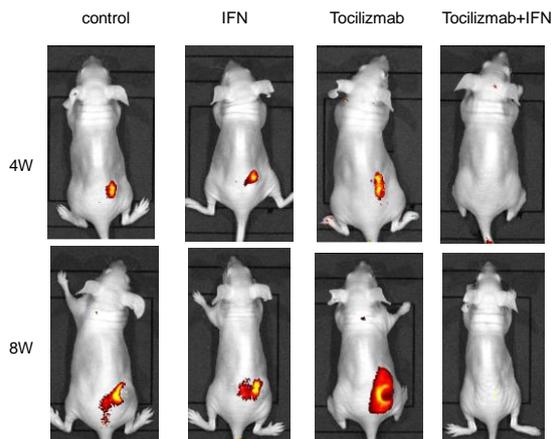
また、腎癌細胞株 ACHN、786-O において細胞中の hsa-miR-93 発現量、IFN 投与後の

hsa-miR-93 発現量と TRAIL-R1 mRNA の発現量を Real Time PCR にて比較定量解析した。その結果、ACHN に比較して 786-O は IFN 投与後の hsa-miR-93 発現が有意に高値であることが確認できた。

さらに、has-mir-93 は STAT3 もターゲット遺伝子の検索から STAT3 もターゲットとする可能性も判明した。この STAT3 は癌細胞を増殖させる分子だが、SOCS3 によって抑制される事が判っている。つまり腎癌の細胞増殖およびNK細胞からの免疫回避などに関与する分子の中心に SOCS3 に has-mir-93 が関与している可能性が高まった。そのため、siRNA2 や遺伝子発現プラスミドを用いて、has-mir-93 と SOCS3 いずれがインターフェロンに対する抑制効果が強いかを比較検討する事とした。

腎癌のインターフェロン感受性における効果を SOCS3 と has-mir-93 の発現量の変化での変化を MTT アッセイで解析した結果、IFN 感受性には SOCS3 の方が has-mir-93 と比較して強く関連していることが示唆された。

そのため、以降のヌードマウスモデルによる in vivo の検討では has-mir-93 抑制ではなく SOCS3 抑制に主眼を置くこととした。具体的には腎癌皮下移植ヌードマウスモデルにおいて SOCS3-siRNA および IL-6 受容体抗体とインターフェロンを併用した場合の腫瘍の増殖抑制効果を解析した。その結果 SOCS3-siRNA および IL-6 受容体抗体双方ともインターフェロンとの併用で腫瘍増殖を抑制した。単独では抗腫瘍効果は認められなかった。



摘出した腫瘍の病理学的解析により、SOCS3 抑制によるアポトーシス、細胞浸潤、線維化が観察され、インターフェロンによる免疫反応が効率的に抗腫瘍効果として発揮されていることが確認された。今後臨床応用を考慮

しながら SOCS3 抑制による腎癌療法の検討に入る。

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. Oguro T, Ishibashi K, Sugino T, Hashimoto K, Tomita S, Takahashi N, Yanagida T, Haga N, Aikawa K, Suzutani T, Yamaguchi O, Kojima Y : Equally contributed Humanised antihuman IL-6R antibody with interferon inhibits renal cell carcinoma cell growth in vitro and in vivo through suppressed SOCS3 expression. *European J Cancer*, 2012 Dec 26
2. Tomita S, Ishibashi K, Hashimoto K, Sugino T, Yanagida T, Kushida N, Shishido K, Aikawa K, Sato Y, Suzutani T, Yamaguchi O : Equally contributed Suppression of SOCS3 increases susceptibility of renal cell carcinoma to INF- α *Cancer Sci*, Jan; 102(1):57-63. 2011

[学会発表] (計 3 件)

1. T. Oguro, K. Ishibashi, T. Sugino, S. Kumagai, N. Takahashi, N. Haga, T. Yanagida, K. Aikawa, O. Yamaguchi, Y. Kojima TOCILIZUMAB CAN ENHANCE THE ANTI-TUMOR EFFECT OF IFN- α IN RENAL CELL CARCINOMA 37th ESMO Congress 28 September - 2 October 2012, Vienna.
2. Kei Ishibashi, Toshiki Oguro; Shin Kumagai; Norio Takahashi; Nobuhiro Haga; Masanori Nomiya; Tomohiko Yanagida; Ken Aikawa; Yoshiyuki Kojima Combination therapy with humanized antihuman IL-6R antibody and interferon- α successfully prevents the growth of 786-O renal cell carcinoma cells. AUA May 4 - 8 2013 SanDiego USA.
3. Kei Ishibashi, Toshiki Oguro; Shin Kumagai; Masao Kataoka; Hidenori Akaihata; Ken Aikawa; Yoshiyuki Kojima IL-6 and SOCS3 regulates cell proliferation in renal cell carcinoma cells AUA May 4-8 2013 SanDiego USA.

〔図書〕（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

石橋 啓 (ISHIBASHI KEI)
福島県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：90347211

(2)研究分担者

宍戸啓一 (SHISHIDO KEIICHI)
福島県立医科大学 医学部 博士研究員
研究者番号：30285035