

平成30年6月16日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20091

研究課題名(和文) microRNAをtargetとした腎癌の診断マーカーと薬剤感受性に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of diagnostic marker and drug sensitivity in human renal cell carcinoma cells targeting microRNA

研究代表者

岩本 秀人 (Iwamoto, Hideto)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：80621010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト由来の腎癌細胞株においてスニチニブ抵抗性株の作成に成功した。また、スニチニブ抵抗性株においてmicroRNA194-5p(miR194-5p)は、感受性株に比べて有意に発現低下を示すことを確認した。進行性腎癌の摘出腎組織において、腫瘍部ではmiR194-5pの発現が低下していることが確認され、パラフィン切片の免疫染色を用いて、miR194-5pとLAMP-2の発現に逆相関が確認されたことにより、LAMP-2の発現を負に制御しているmiR194-5pの発現が低下することで、腎細胞癌はスニチニブに対する抵抗性を獲得するというメカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction revealed that miR-194-5p expression was significantly decreased in sunitinib resistant-ACHN (SR-ACHN) cells when compared with that observed in ACHN cells. Transfection of miR-194-5p, though not with negative control miR, in SR-ACHN cells could significantly inhibit cell proliferation following sunitinib treatment. Western blotting demonstrated that the expression of lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2), which attenuates the anti-proliferative effect of sunitinib, was significantly higher in SR-ACHN than in ACHN cells. In addition, LAMP-2 expression was suppressed by miR-194-5p transfection in SR-ACHN cells. These data suggested that miR-194-5p downregulation may be associated with sunitinib resistance via the induction of LAMP-2 expression in human RCC.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：microRNA 腎細胞癌 スニチニブ抵抗性

1. 研究開始当初の背景

米国および我が国において、腎細胞癌(腎癌)の罹患率は近年増加傾向にある。そして、診断や治療の技術が進歩しているとは言え、その癌特異的死亡率は現在も増加傾向にある。

現在、日常診療において腎癌と診断される症例は、大きく2つのタイプに分けることができる。

- | |
|---|
| <p>(1) 早期に発見され(転移なし)、根治が期待できる症例</p> <p>(2) 進行例として発見され(転移あり)、根治が期待できない症例</p> |
|---|

これらのタイプを5年生存率で比較すると、stage (早期発見例)では95%以上と予後良好であるのに対し、stage 以上(進行例)では50%以下と予後不良である。では、腎癌診療における問題点は(2)のタイプに限られるのかということ、問題はそれ程単純ではない。

(1)の問題点;腎癌と良性腎腫瘍の鑑別が困難であること

近年、画像検査の進歩に伴い無症状のうちに偶然発見される症例(偶発腫瘍)が増加しており、現在では腎癌患者の70-80%を占めると言われている。これらの偶発癌は、症候癌にくらべて腫瘍サイズが小さく、low stageであることが多いが、画像検査(CTやMRIなど)を駆使しても良・悪性の診断は困難であるケースが多く、ほとんどの症例で外科的治療が選択される。病理結果が悪性であった場合は、早期診断となり良好な予後が期待できる訳だが、良性(腎血管筋脂肪腫やオンコサイトーマなど)であった場合は、腎部分切除術であったとしても腎機能低下や心血管イベントのリスクは上昇し、結果的に over treatment となってしまう。

(2)の問題点;化学療法や放射線治療が無効であること

腎癌は一般的に化学療法や放射線治療への感受性が乏しく、有転移症例に対しては、これまで免疫療法などが用いられてきたが、その効果は10%程度低かった。近年、チロシナーゼ・インヒビターや mTOR 阻害薬などの分子標的薬による良好な治療成績が報告され、有転移症例の予後改善が大いに期待されたが、著名な奏功を示す症例がある一方で、経過中に耐性となり再増大を示す症例や、全く効果を示さない症例も少なからず経験され、分子標的薬の効果は未だ限定的と言わざるを得ない。

そして、これらの問題点を細胞生物学的手法により改善しようとする試みが、現在 global に行われている。近年、microRNA(蛋白質をコードしていない non-coding small RNA)は、mRNA から蛋白への翻訳を抑制することで発生や細胞増殖など様々な細胞生物学のプロセスを制御しており、その発現

異常が癌の発生や進展に関与していることが多くの癌種において報告されている。そして、micro RNA は exosome などに内包された状態で RNase からの分解を免れ、血液や尿などの体液中でも安定して存在することが証明されており、新規バイオマーカーに関する研究が多数報告されている。また、特に最近では microRNA の発現異常と分子標的薬の奏功性に関する研究が盛んに行われ、複数の癌腫において徐々に奏功性を制御しているメカニズムが報告されつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく分けて以下の3つである。

(1) 腎癌と良性腎腫瘍の鑑別に有用な血清 microRNA を同定すること

(2) 腎癌の Sunitinib 感受性を決定する microRNA を同定すること。

(3)(2)で同定した microRNA を使用し、腎癌(淡明細胞癌)転移モデルマウス体内で候補 microRNA の発現量を人工的に調節することで転移巣が縮小するかどうかを確認すること。

3. 研究の方法

研究の目的(1)の方法

腎癌患者と良性腎腫瘍患者における血清中 microRNA 発現の網羅的解析

鳥取大学泌尿器科において、凍結保存している腎癌(淡明細胞癌)患者10例と良性腎腫瘍(腎血管筋脂肪腫)患者10例の血清サンプルから total RNA を抽出し、microRNA microarray によって2群間で有意な発現差を示す microRNA を鑑別マーカーの候補として選出する。

鑑別マーカーとしての診断精度の評価と前向き研究

候補マーカーについて、他の腎癌(淡明細胞癌)患者と良性腎腫瘍(腎血管筋脂肪腫)患者の血清サンプルを用いて、その診断精度を確認する。これにより同定された鑑別マーカーについて、その後前向きに検討を継続する。また、健康人や尿路感染症(腎盂腎炎など)患者や他の泌尿器悪性腫瘍(膀胱癌や前立腺癌など)患者の血清サンプルとの比較により、特異性の評価も行う。

研究の目的(2)の方法

ヒト腎癌細胞株での Sunitinib 感受性を決定する microRNA の同定

ヒト腎癌細胞株(RCC4、Caki1、ACHN etc)6種に対し、それぞれに Sunitinib を添加し Cell viability Assay および Apoptosis Assay により効果を判定する。その効果を基に細胞株を2群に分ける(Sunitinib 効果あり; Good responders、Sunitinib 効果なし; Poor responders)。これら2群における microRNA 発現量を microarray により網羅的に解析し、Good responders と比較して Poor

responders で有意に発現上昇または発現低下を示す microRNA を同定する。これらの microRNA の中で特に有意差の高い microRNA を感受性決定 microRNA の候補として選出する。

microRNA の発現量調節による Sunitinib 感受性獲得の検証

上記により、発現上昇 (microRNA-X) または発現低下 (microRNA-Y) が確認された microRNA について、Poor responders の細胞株内でこれらの microRNA 発現量を人工的に調節する。つまり、発現上昇する microRNA-X では microRNA-X のアンチセンス miRNA オリゴヌクレオチドを導入して microRNA-X の発現を抑制させ、また発現低下する (microRNA-Y) では siRNA や pre-miRNA を導入して microRNA-Y を過剰発現させることで、Poor responders が Sunitinib への感受性を獲得するようになるか否かを検証する。

研究の目的 (3) の方法

モデルマウスでの転移抑制効果の検証

Poor responders の細胞を皮下に移植した転移モデルマウスを作製する。これに対する抗腫瘍効果を検証する。

MicroRNA-X については、これを抑制するためのアンチセンス microRNA オリゴヌクレオチドと Sunitinib を同時に経静脈的に全身投与し、転移の縮小効果を判定する。同様の実験として、Ma らは microRNA-10b に対する Antagomir を動物モデルに全身投与することで、乳がんの肺転移が抑制されたことを報告している。(Ma, L et al : Nat Biotechnol, 28 : 341-347, 2010)

一方、microRNA-Y については、これを補充するための同 microRNA と Sunitinib を同時に経静脈的に全身投与し、転移の縮小効果を判定する。同様の実験として、共同研究者である尾崎は既に microRNA-16 による前立腺癌骨転移抑制効果、microRNA-143 による骨肉腫肺転移抑制効果について報告している。

特に合成した核酸の投与に当たっては、そのデリバリーシステムが問題となるが、尾崎らのグループはアテロコラーゲンを用いた核酸医薬の開発を行ってきた経緯があり、モデルマウスにおける効果が実証されている。

4. 研究成果

研究の目的 (1) の成果

「腎癌患者と良性腎腫瘍患者における血清中 microRNA 発現の網羅的解析」

良性腎腫瘍 (腎血管筋脂肪腫) 患者が予定以上に集まらず、現在もサンプルを集積中である。

研究の目的 (2) の成果

ヒト腎癌細胞株での Sunitinib 感受性を決定する microRNA の同定

平成 27 年度の研究において、ヒト由来の腎癌細胞株 (ACHN、RCC23) でのスニチニブ

抵抗性株の作成に成功した。さらに、これら 2 種の抵抗性株と感受性株 (親株) において、超痛する 7 個の microRNA が microarray の結果通りに、スニチニブ抵抗性株で発現上昇または低下していることを確認した。また、過去の文献において、腎細胞癌のスニチニブ抵抗性のメカニズムとリソソーム関連膜蛋白 (LAMP) との関連が報告されていたことから、これら 7 つの microRNA と LAMP と関連について、データベースウェブサイト miRDB (Nucleic Acids Research. 43(D1):D146-152.) を用いて検索を行った。その結果、これらの間に関連を確認することはできなかった。しかし、2 種の抵抗性株に共通する microRNA ではないが、スニチニブ抵抗性 ACHN で感受性株 (親株) に比べて 4 倍以上の発現低下を示した microRNA194-5p (miR194-5p) において、miRDB で LAMP-2 との関連が示唆されていたため、平成 28 年度は miR194-5p と LAMP-2 との関連を調査することとした。

microRNA の発現量調節による Sunitinib 感受性獲得の検証

抵抗性株に mimic miR194-5p で過剰発現させることにより抵抗性が改善するかどうかを調査した。その結果、miR194-5p を導入した細胞株では、基の抵抗性株と比較して、有意に IC50 が低下することを確認した。次に、LAMP-2 の発現について実験を行った。ACHN の抵抗性株と感受性株 (親株) のタンパクを用いて、Western blotting を行った結果、抵抗性株では感受性株と比較して LAMP-2 の発現が有意に上昇していた。また、抵抗性株と miR194-5p 過剰発現株で同様の比較を行った結果、miR194-5p 過剰発現群では LAMP-2 の発現が有意に低下していた。これらの結果より、miR194-5p は LAMP-2 の発現を負に制御している可能性が示唆された。続いて、臨床材料として進行性腎癌の摘出腎組織を用いて miR194-5p の測定を行ったところ、腫瘍部では正常部と比較して miR194-5p の発現が低下していることが確認された。さらに、パラフィン切片を LAMP-2 で免疫染色した結果、miR194-5p と LAMP-2 の発現に逆相関が認められた。

以上の結果から、LAMP-2 の発現を負に制御している miR194-5p の発現が低下することで、腎細胞癌はスニチニブに対する抵抗性を獲得するというメカニズムが示唆された。

研究の目的 (3) の成果

平成 30 年度より、研究を開始している。Poor responders の細胞を皮下に移植した転移モデルマウスを作製中である。

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 4 件)

(1) Yumioka T, Osaki M, Sasaki R, Yamaguchi N, Onuma K, Iwamoto H, Morizane S, Honda M, Takenaka A, Okada F.: Lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP-2) expression induced by miR-194-5p downregulation contributes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cells. *Oncol Lett.*15: 893-900, 2018

(2) Yamaguchi N, Osaki M, Onuma K, Yumioka T, Iwamoto H, Sejima T, Kugoh H, Takenaka A, Okada F.: Identification of MicroRNAs Involved in Resistance to Sunitinib in Renal Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 37: 2985-2992, 2017

(3) Iwamoto H, Osaki M, Honda M, Sejima T, Takenaka A, Okada F.: miR-210 as a Biomarker in Renal Carcinoma. *Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. Biomarkers in Kidney Disease.* 895-910, 2016

(4) Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, Osaki M, Okada F, Takenaka A: Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 44: 53-58, 2014

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 弓岡徹也、尾崎充彦、山口徳也、小沼邦重、岩本秀人、森實修一、本田正史、岡田太、武中 篤: miR-194-5p suppressed cell proliferation by targeting lysosome associated membrane protein 2 in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells. 第 69 回 西日本泌尿器科学会総会. 2017.11.10. 大分 (大分県)

(2) Yumioka T, Osaki M, Yamaguchi N, Kanda Y, Iwamoto H, Omura K, Morizane S, Honda M, Okada F, Takenaka A: Downregulation of miR-194-5p involved in sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell. 第 76 回 日本癌学会学術集会. 2017.9.29, 名古屋 (愛知県)

(3) Yamaguchi N, Yumioka T, Omura K, Iwamoto H, Masago T, Morizane S, Honda M, Osaki M, Okada F, Takenaka A: Identification of microRNA regulating sunitinib resistance in renal cell carcinoma cells. American Urological Association annual meeting 2017, 2017.5.12, Boston (USA)

(4) Yamaguchi N, Yumioka T, Omura K, Iwamoto H, Osaki M, Okada F, Takenaka A: Identification of microRNA involved in sunitinib resistance of renal cell carcinoma cells. 第 68 回 西日本泌尿器科学会総会. 2016.11.25, 下関 (山口県)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

岩本 秀人 (IWAMOTO, Hideto)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号 : 80621010

(2)研究分担者

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()