

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06954

研究課題名(和文)腎細胞癌患者の予後に寄与するmiRNA発現プロファイルの網羅的探索とその機能解析

研究課題名(英文) Analysis of specific miRNA profilings which are correlated with prognosis in renal cell carcinoma patients.

研究代表者

王 聡 (WANG, CONG)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70783893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腎細胞癌患者の予後に寄与する有意な変化を示す候補miRNAの同定はできなかったが、淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)において、正常腎部位と比べ、腎細胞癌部位では顕著に高発現するmiR-122に着目することにより、公共データベースを用いた解析では腎細胞癌患者の予後と関連するmiR-122標的候補遺伝子の中から癌抑制的に働くことが報告されているFilamin B遺伝子を同定した。腎細胞癌におけるFilamin Bの生理的役割は不明であることから、今後腎癌におけるmiR-122の機能解析ならびにFilamin Bの機能解析も行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we could not identified specific miRNA candidate which is correlated with prognosis in renal cell carcinoma(RCC) patients as planed. But we switched to focus on miRNA which was significantly up-regulated in clear cell renal cell carcinoma(ccRCC) compared to normal tissue by Microarray analysis. Here we showed miR-122 was the most significantly up-reguated miRNA, and by using public prediction tools such as MIRbase, we listed up miR-122 target genes and focusd on the target genes which were correlated with survival in RCC patients by using TCGA data. We identified Filamin B as a target gene of miR-122. Since the fuction of Filamin B in RCC is unknown, we planed to clarify the fuction of miR-122 and Filamin B in RCC.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：miRNA RCC

1. 研究開始当初の背景

腎癌はがん全体のうちの約 1%を占め、罹患数や死亡数がともに年代と共に上昇傾向を示している。転移性腎癌に対し標準治療とされている分子標的薬治療の奏効率が限定的であり、転移性腎癌の治療成績が依然として満足できるものではないと言える。予後不良の転移性腎癌の新規治療標的および血液バイオマーカーを同定するため、腎癌特異的に高発現する遺伝子、分子の探索が行われているが、臨床応用に至ったものはない。miRNA は 20-25 塩基の non-coding small RNA であり、翻訳阻害あるいは RNA 分解により標的遺伝子を抑制することで、癌の発生・悪性化における分子機序に深く関与すると考えられている。近年、癌細胞は miRNA を豊富に内包するエクソソームを分泌しており、その miRNA を介して微小環境に影響を及ぼすことが明らかとなっている。特に癌細胞由来エクソソーム中に内包される miRNA 濃度は、細胞質内の miRNA 濃度よりも高く、癌周囲環境に重要な役割を果たしている可能性がある。そのため miRNA は治療標的にもなり得ると考えられ、我々は腎細胞癌における miRNA の解析を着手することに至った。

2. 研究の目的

腎細胞癌患者における特異的な miRNA の発現解析の報告は散見される。また予後と相関するとされる腎細胞癌特異的な発現情報を示す miRNA の報告もあるが、一定の結果が得られておらず、臨床応用されているものもない。特に単一遺伝子の発現のみで予後を予測することは困難であると考えられている。そこで我々は腎細胞癌特異的な高発現または低発現を示す遺伝子群の同定を試みた。また単一遺伝子の発現の変化ではなく、多くの遺伝子に対して発現コントロールを行うとされる miRNA ネットワークを探索し、腎細胞患

者の予後に寄与する miRNA の発現プロファイルを同定。同定した miRNA の機能解析を行うことによって、転移、浸潤のメカニズムを解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

[1] 腎細胞癌組織および正常組織を用いた miRNA の網羅的マイクロアレイ解析より腎細胞癌特異的 miRNA プロファイルを作成。

[2] 腎細胞癌患者を予後不良、予後良好群に分け、階層的クラスタリング解析を行い、腎癌の予後に寄与する miRNA のプロファイルを同定。

[3] 絞り込んだ miRNA 群の発現解析をより簡便な RT-PCR による多検体を用いた検証を行い、予後不良患者群において発現変化を認める miRNA を評価。

[4] 腎細胞癌組織および正常組織を用いた miRNA の網羅的マイクロアレイ解析より、正常腎組織と比べ、腎細胞癌組織に顕著に高発現する miRNA 候補遺伝子を抽出。

[5] 公共データベースを用いて、抽出した miRNA 候補遺伝子の標的候補遺伝子をリストアップ。

[6] miRNA 候補遺伝子の標的候補遺伝子の中から、腎細胞癌患者予後と関連する候補遺伝子を同定。

[7] 着目した miRNA 候補遺伝子および標的遺伝子の機能解析。

4. 研究成果

腎細胞癌組織および正常腎組織の FFPE 臨床検体から miRNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ解析を行った。まず、正常腎組織と比較し腎細胞癌組織において高発現および低発現する miRNA リストを作成した。次に、腎細胞癌患者の長期予後が明らかとなっている臨床組織検体を用いて miRNA リストより予後良好群、予後不良群を層別化できる候補 miRNA 群を抽出した。多検体を用いた検証の

結果、統計学的に有意な変化を示す miRNA は得られなかった。

次に我々は miRNA マイクロアレイ解析にて正常腎組織と比較し、腎細胞癌組織において顕著に高発現している miR-122 に着目した(図1)。

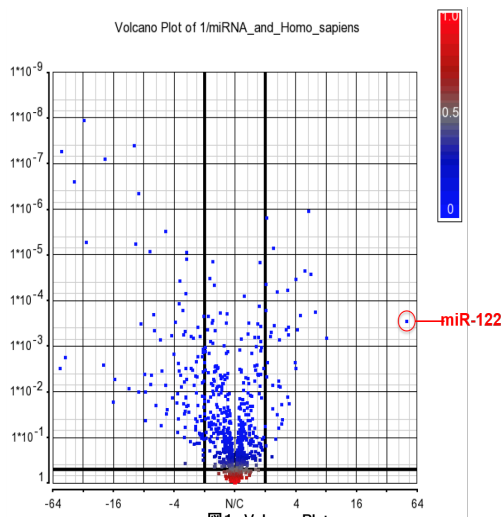


図1 Volcano Plot
正常腎組織と比較し、腎細胞癌組織において遺伝子の発現変動を表している

公共データベース miRBase を用いて miR-122 標的候補遺伝子群をリストアップした。その中より公共データベース The Cancer Genome Atlas を用いて腎癌予後と関連する miR-122 標的候補遺伝子を抽出した(表1)。

表1 miR-122が制御する標的遺伝子の中で、低発現が腎癌予後不良因子である候補遺伝子。

CLIC4	H1FO	STK24
COX10	MMGT1	NFAT5
C10orf118	TNFRSF19	ARFGEF1
SEC22C	CDC42BPB	EIF4E3
ABHD11	CUBN	CTDSPL
ERLIN2	FLNB	VAV3
NSMF	LRP10	MAML2
PLEKHB2	GCNT4	C18orf32
COX16	G3BP2	ATP11A
TSPAN7		

その中で癌抑制的に機能する Filamin B 遺伝子を miR-122 標的遺伝子候補として着目した。

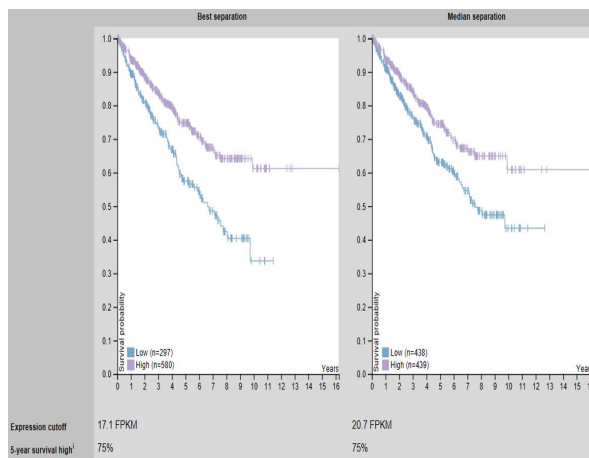


図2 腎癌においてFilamin B遺伝子の発現と予後との関係

既報の文献によると、Filamin B 遺伝子の発現抑制は癌細胞における VEGF-A の放出および MMP-9 の活性化を介して、腫瘍の増殖および浸潤に寄与することが明らかとなっている(Bandaru S, et al. Oncogenesis, 2014)。しかしながら、腎細胞癌における Filamin B の生理的役割は不明であることから、今後腎癌における miR-122 の機能解析ならびに Filamin B の機能解析も行なっていく予定である。

腎癌細胞株を用いて、増殖能、遊走能や浸潤能に対する miR-122 および Filamin B の表現型解析、臨床検体を用いて miR-122 や Filamin B の発現レベルと腎癌予後との関連について検討を行う予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 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

王 聡 (WANG, Cong)

大阪大学医学部附属病院 医員

研究者番号：70783893

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()