

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11148

研究課題名(和文)革新的腎癌治療法の開発を目指したゲノム編集による癌促進型マイクロRNAの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the oncogenic microRNA by the genome editing aiming at the development of the innovative renal cancer treatment

研究代表者

井手迫 俊彦 (ITESAKO, Toshihiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：10642613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果として、正常腎と腎癌臨床検体を用いたアレイ解析から癌細胞内で十分な発現値を示す最上位のマイクロRNA-210 (miR-210)を見出した。更に、CRISPR/Cas9を用いてmiR-210をノックアウトし、miR-210の発現をほぼ100%抑制することが出来た。標的遺伝子探索ではmiR-210がTWIST1を直接制御することが明らかとなった。また、miR-1274も腎癌において高発現していることを確認し、その標的遺伝子として骨形成タンパク質受容体であるBMPRIIを同定した。本研究により、これまでに殆ど研究が進んでいなかった癌促進型マイクロRNAの機能解析と標的遺伝子を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性腎癌の多くは分子標的治療薬に治療抵抗性を獲得し、再発・転移に至る。マイクロRNAは遺伝子の発現調節に寄与することが知られており、今まで癌に関与するマイクロRNAに関して多くの報告がなされてきた。しかし、癌部で発現が亢進しているマイクロRNAに関しての報告は限定的であった。本研究により、癌促進型マイクロRNAの機能解析と標的遺伝子を示すことができ、進行性腎癌に対する新たな理解と治療戦略の可能性が提案された。

研究成果の概要(英文)：As results of research, we found that microRNA-210 (miR-210) was highly expressed in renal cancers compared to normal kidneys by the array analysis using normal kidneys and kidney cancer clinical specimens. miR-210 expression was almost depleted by using CRISPR/Cas9. It was revealed that miR-210 regulated TWIST1 directly by the target gene search. In addition, we confirmed that miR-1274 was highly expressed in kidney cancers compared to normal kidneys, and identified BMPRII which was an osteoplastic protein receptor as the target gene. In summary, we showed a functional analysis and a target gene of highly expressed micro RNA in renal cancer.

研究分野：Urological cancer

キーワード：マイクロRNA 腎癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎癌は、国内で年間約2万人が罹患し、すべての癌の約2%を占める。泌尿器科系悪性腫瘍の中では前立腺癌、膀胱癌について多い腫瘍である。手術以外に根治的治療法がなく、化学療法や放射線療法は有効ではない。また、転移性腎癌の5年生存率は約5-10%と著しく低い。生存率の低さは、再発や遠隔転移に起因しており、再発・転移の制御が腎癌の治療の重要課題である。近年、ソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブ等のマルチキナーゼ阻害薬や、エベロリムスやテムシロリムスなどの mTOR 阻害薬が実用化された。これら分子標的治療薬の奏効率は40%程度であり、一定の治療効果を上げている。しかしながら、転移性腎癌の多くは分子標的治療薬に治療抵抗性を獲得し、再発・転移に至る。また2016年8月26日に進行性腎細胞癌に対して、これまでの分子標的薬とは全く違うコンセプトで作られた PD-1 抗体薬であるニボルマブが保険承認された。ニボルマブによる前臨床試験 (CheckMate 025) では奏効率は約25%であり、対照群に比較して有意な延命効果を示したが、残りの75%は腫瘍縮小効果が見られず治療薬として十分とは言えない。このように分子標的薬治療抵抗性を獲得した腎癌患者に対する有効な治療法は限定的であり、更に治療無効例の予後は極めて悪いため、更なる新規治療法の開発が必要である。

2. 研究の目的

この研究の目的は、これまでに殆ど研究が進んでいなかった癌促進型マイクロ RNA の機能解析と標的遺伝子探索を CRISPR/Cas9 と呼ばれる第3世代のゲノム編集技術を用いて行うことである。本研究では、次世代シーケンサーによる癌で発現が亢進しているマイクロ RNA 発現プロファイルから、増殖/転移に関わる癌促進型マイクロ RNA を探索して、それらが制御する分子ネットワークの描写を試みる。以上の検討により、癌促進型マイクロ RNA が制御する増殖/転移機構の解明を行い、その経路を遮断する既存治療薬の効果を検討する。このような過程を経て現在、治療の選択肢が非常に少ない進行性腎癌に対して、新たな治療戦略の探索に繋がる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

申請者は、マイクロ RNA アレイを用いて、腎癌組織から低分子 RNA の網羅的な発現解析を行い、今後のスタンダードとなる「腎癌マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。これに基づき、腎癌細胞で発現が亢進しているマイクロ RNA を基点として、進行腎癌における増殖/転移の分子メカニズムを明らかにする。また癌促進型マイクロ RNA が制御する分子ネットワークを明らかにして、腎癌の増殖・浸潤で活性化している分子経路を分子経路遮断薬で遮断する。この研究ステップを以下に示す。

- (1) 培養腎癌細胞において癌で発現が亢進しているマイクロ RNA に対して CRISPR-Cas9 によるノックアウトを行い、細胞機能解析 (増殖・遊走・浸潤能テスト) を行い「癌促進型マイクロ RNA」の同定を行う。
- (2) 上記の癌促進型マイクロ RNA をノックアウトした細胞における遺伝子発現解析によりターゲット遺伝子探索を行い、癌促進型マイクロ RNA が関わる分子ネットワークを明らかにする。
- (3) 上記の実験で有望な「癌促進型マイクロ RNA」については、ノックアウト細胞を作成して、ゼノグラフトモデルや尾静脈注射による転移モデルにおいて in vivo での抗腫瘍効果を検討

する。

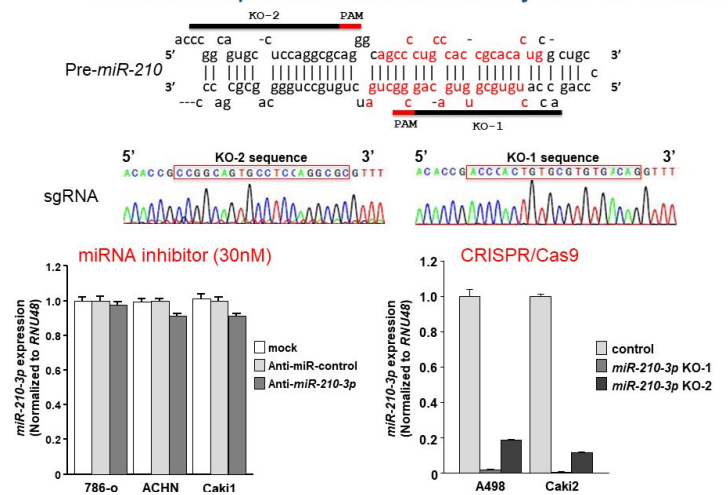
(4) 癌促進型マイクロ RNA を基点とした分子ネットワーク解析から、腎癌の増殖・浸潤で活性化している分子経路を遮断する方法を模索し、分子経路遮断薬の効果を in vitro/in vivo で検証する。

(5) 癌抑制型マイクロ RNA が関わるターゲット遺伝子との相互関係の検討を行い、癌促進型・癌抑制型マイクロ RNA 双方の知見からマイクロ RNA 関連分子ネットワークを構築する。

4 . 研究成果

研究成果として、正常腎と腎癌臨床検体を用いたアレイ解析から癌細胞内で十分な発現値を示す最上位のマイクロ RNA-210 (miR-210)を見出した。更に、CRISPR/Cas9 を用いて miR-210 をノックアウトし、miR-210 の発現をほぼ 100%抑制することが出来た (右上図)。標的遺伝子探索では miR-210 が TWIST1 を直接制御することが明らかとなった。また、miR-1274 も腎癌において高発現していることを確認し、その標的遺伝子として骨形成タンパク質受容体である BMPR1B を同定した (右下図)。本研究により、これまでに殆ど研究が進んでいなかった癌促進型マイクロ RNA の機能解析と標的遺伝子を示した。

miR-210-3p was knocked out by CRISPR/Cas9



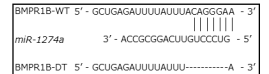
BMPR1B is regulated by miR-1274a

Putative target genes of miR-1274a

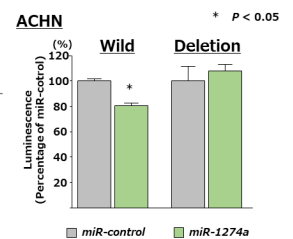
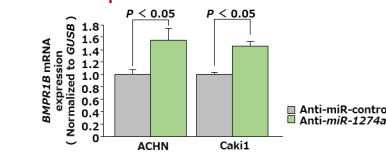
Expression of miR-1274a target genes involved in significantly enriched annotations

Gene name	Field Change	Gene Symbol	p-value	Fold Change	TargetScan 5.2
BMPR1B	4.58	bone morphogenetic protein receptor type 1B	2.31E-09	-9.75	○
PAK6	1.43	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6	2.00E-09	-7.08	○
MEDCOM	1.47	MDS1 and EVI1 complex locus	4.51E-09	-4.85	○
ACVRLC	3.36	activin A receptor type 1C	4.94E-06	-2.18	○
GADD45A	2.62	growth arrest and DNA damage inducible alpha	7.83E-05	-1.99	○
PPM1A	1.44	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent 1A	6.08E-06	-1.73	○
NRG1	1.41	neuregulin 1	1.46E-03	-1.62	○
ITGA2	1.49	integrin subunit alpha 2	7.67E-03	-1.59	○
NLK	1.56	nemo-like kinase	2.37E-02	-1.15	○

Luciferase reporter assay



BMPR1B expression in anti-miR-1274a transfectants



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshino H, Nohata N, Miyamoto K, Yonemori M, Sakaguchi T, Sugita S, Itesako T, Kofuji S, Nakagawa M, Dahiya R, Enokida H.	4. 巻 77
2. 論文標題 PHGDH as a Key Enzyme for Serine Biosynthesis in HIF2 ⁻ Targeting Therapy for Renal Cell Carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 6321-6329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshino Hirofumi, Yonezawa Tomokazu, Yonemori Masaya, Miyamoto Kazutaka, Sakaguchi Takashi, Sugita Satoru, Osako Youichi, Tatarano Shuichi, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki	4. 巻 39
2. 論文標題 Downregulation of microRNA-1274a induces cell apoptosis through regulation of BMPR1B in clear cell renal cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 173-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2017.6098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Takashi, Yoshino Hirofumi, Sugita Satoshi, Miyamoto Kazutaka, Yonemori Masaya, Osako Yoichi, Meguro-Horike Makiko, Horike Shin-Ichi, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Bromodomain protein BRD4 inhibitor JQ1 regulates potential prognostic molecules in advanced renal cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 23003 ~ 23017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Satoshi Sugita, Takashi Sakaguchi, Youichi Osako, Masayuki Nakagawa
2. 発表標題 microRNA-1274a suppression induces cell apoptosis through BMPR1B acceleration in renal cell carcinoma
3. 学会等名 American Urological Association（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirofumi Yoshino, Kazutaka Miyamoto, Masaya Yonemori, Satoru Sugita, Takashi Sakaguchi, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa
2. 発表標題 Metabolism re-programming as a therapeutic target for drug resistant renal cell carcinoma
3. 学会等名 American Urological Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉野 裕史 (YOSHINO Hirofumi) (90642611)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教 (17701)	
研究協力者	大迫 洋一 (OSAKO Yoichi)		
研究協力者	坂口 大 (SAKAGUCHI Takashi)		