

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11166

研究課題名（和文）難治性腎癌に対するHOTAIRを標的とした治療法の開発のための基礎検討

研究課題名（英文）Development of non-coding RNA-targeting therapy for refractory renal carcinoma

研究代表者

川村 貞文（Kawamura, Sadafumi）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：40292213

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）：腎癌は、泌尿器悪性疾患のなかで前立腺癌、膀胱癌に次ぐ3番目に罹患率の高い悪性腫瘍であるが、死亡率は約40%と最も高いことが特徴である。私たちは、non coding RNA HOTAIRが腎癌の悪性度を亢進させる分子であることを見いだした。さらに探索を続け、癌の悪性度を亢進させる新規non coding RNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちはnon-coding RNAに着目して、癌の悪性度を亢進させる新たなnon-coding RNAを同定した。詳細な分子機構の解析を行うことで、将来的に治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Renal carcinoma is the third most common malignancy following prostate and bladder cancer, while the mortality is the highest (40%) among them. We identified non coding RNA HOTAIR which is involved in the malignant characteristics. We further identified a novel non-coding RNA which is also promote cancer malignancy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：non coding RNA

1. 研究開始当初の背景

腎癌は、泌尿器悪性疾患のなかで前立腺癌、膀胱癌に次ぐ3番目に罹患率の高い悪性腫瘍であるが、死亡率は約40%と最も高いことが特徴である。腎癌は転移傾向の強い癌であり、診断時には約40%の例で転移性腫瘍が存在する。転移例の生存率中央値は約13ヶ月、5年生存率は9%と極めて予後不良である。近年、分子標的治療薬の出現により転移性腎癌患者の治療は大きな進歩を遂げたが、根治は期待できず、いずれは耐性化し増悪することが問題となっている。したがって、転移性腎癌に対する治療効果を高めるために、全く新しい治療標的を探索することは極めて切実な課題である。

本研究分担者の佐藤らは、タンパク質へ翻訳されずに機能する長鎖ノンコーディング RNA (Long non-coding RNA) の HOTAIR が、癌悪性化形質獲得に関与していることを示している。例えば、分化型胃癌の予後不良例に高発現していること (PLoS One, 2013)、非小細胞肺癌患者の術後再発期間短縮例で発現が亢進していること (BBRC, 2013)を報告している。HOTAIR を胃癌、肺癌の細胞株で高発現させると細胞移動能が亢進し、*in vivo* では転移能も亢進することも明らかにした。HOTAIR は HOX 遺伝子座で同定され、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基(H3K27)をトリメチル化して、その染色体座位 (HOX 遺伝子座)からの転写を特異的に不活性化させる。そのような機序で、HOTAIR は約 800 個の遺伝子の発現を制御している。それら遺伝子の中には癌抑制遺伝子や EMT 関連遺伝子など癌の転移に関与するものも多数含まれている。つまり、HOTAIR による癌悪性化の促進は、その発現による多数の癌抑制遺伝子の発現抑制と癌関連遺伝子の発現誘導によってもたらされている。HOTAIR という1つの遺伝子が驚くほど多くの分子発現をコントロールしているということである。実際に、その発現が乳癌、肝細胞癌、大腸癌、膵癌などの悪性腫瘍の転移や予後不良と関連することが報告され、HOTAIR の発現を誘導した細胞は細胞移動能や転移能が亢進する。ごく最近の検討でも多種類の癌で HOTAIR 高発現例は、有意に高頻度にリンパ節転移を示すことも明らかになっている。

腎癌における HOTAIR の発現や役割に関しては、正常腎細胞株にくらべ腎癌細胞株で HOTAIR 発現が上昇しているということ以外に不明な点が多い。そこで、私達は基礎検討として、腎癌の8割を占める組織型である淡明細胞癌64例の切除検体を材料に HOTAIR の発現と臨床病理学因子の関連を検討した。癌部とその症例の非癌部の HOTAIR の発現を real-time PCR にて解析し、癌部 / 非癌部の値と臨床病理学因子との関連を解析した。その結果、リンパ節転移、他臓器転移、核異型度と HOTAIR 発現程度は有意な相関を認めた。さらに、HOTAIR 高発現群は低発現群にくらべて術後の疾患特異的生存率が有意に低いことを明らかにした。腎癌において HOTAIR が悪性化に関与することは細胞株を用いた報告はあるものの、臨床検体で悪性度への関与を示すのは本研究が世界初である。

左図は HOTAIR を遺伝子導入して強制発現させた腎細胞癌株(HOTAIR)と HOTAIR を含まないベクターを導入した同じ腎癌細胞株(EV)を免疫不全マウス腎被膜に移植して肺転移能を検討した結果を示している。HOTAIR 強制発現腎癌細胞は有意に転移能が亢進していることを明らかにした。さらに、尾静脈投与においても同様な結果を得た。以上の結果から、HOTAIR が臨床検体および腎癌細胞株の両者においても悪性度を増強し、特に転移能亢進に関与していることが明らかとなった。しかし、HOTAIR がどのようにして腎癌細胞の悪性化形質獲得を助長させるのかについての機序は不明である。

そこで、HOTAIR 発現により、転移能が亢進する機序を探索するために、RNA microarray 解析を行った。HOTAIR 過剰発現株は、control に比べて、癌遺伝子として近年注目されている Insulin growth factor binding protein 2 (IGFBP2)、Aldo-Keto reductase family 1 member B 10 (AKR1B10)の発現が亢進していることを新たに見出した。PCR でも同様に HOTAIR 過剰発現株で IGFBP2, AKR1B10 が発現亢進していることを確認した。Si RNA を用いてそれぞれの遺伝子発現を抑制すると HOTAIR 過剰発現によって引き起こされた移動能亢進が抑制された。この結果から、IGFBP2 および AKR1B10 は HOTAIR の転移能亢進機序の下流に位置し、重要な役割を持つことが推測される。また、臨床検体の腎腫瘍に対して IGFBP2 免疫染色を行うと、予後不良因子である sarcomatoid differentiation と IGFBP2 の発現に相関があることを我々は新たに見出した。Sarcomatoid differentiation は vimentin 陽性の spindle cell の存在で診断されることから、IGFBP2 が vimentin を介した EMT に関与している可能性が高い。腎癌において IGFBP2 が sarcomatoid differentiation に関与する報告はまだなく、新たな治療対象となる可能性がある。

癌組織は多様な細胞集団によって構成されている。その中で、通常の癌細胞とは異なり、極めて少数の細胞でも癌を再構築できる細胞群の存在が示されており、癌幹細胞(cancer stem cell, CSC)と呼ばれている。この細胞は不均等分裂によって、自己と同じ細胞を作り出す自己複製能とともに、非癌幹細胞を生み出すといった多分化能を持つ。さらに、CSC の特徴として、高い腫瘍形成能を持ち、抗がん剤や放射線に耐性であることが示されている。一方、癌幹細胞では正常細胞や前駆細胞と比べ、解糖系ではなく TCA 回路よりエネルギーを獲得していることが示されている。つまり、癌幹細胞の性質維持には癌特異的な代謝が関与している。

また、癌細胞が進展するには生体に備わる免疫機構からの逃避が必要なことが示されている。通常、癌細胞は非自己として T 細胞をはじめとした免疫担当細胞より認識され、生体より除去される運命にある。Tumor associated macrophage(TAM)や骨髄由来免疫抑制細胞(Myeloid derived suppressor cell, MDSC)は生体免疫作用を減弱させ、癌細胞の進展を助長することが明らかとなっている。私たちは、肝

癌細胞で HOTAIR が TAM を誘導することを明らかにしている。

私たちは HOTAIR の他にも癌において機能性を持つノンコーディング RNA がないか検討を始めた。その結果、遺伝子 X には、タンパクとしての機能だけではなく、ある遺伝子の mRNA そのものにもノンコーディング RNA 様の機能があることに気がついた。

2. 研究の目的

遺伝子 X mRNA の一部分 (以下 XA とする) が癌細胞に与える影響を解析する。

3. 研究の方法

主に癌細胞株を用いて、機能解析を行った。

4. 研究成果

はじめに XA が機能性を有することをはっきりさせるために、遺伝子 X のタンパクノックアウト細胞 (1st および 2nd メチオニンをアラニンに置換した) と完全ノックアウト細胞 (遺伝子 X の全ローカスを欠損) を作成した。それらの細胞を用いてスフェア形成試験を実施した。その結果、タンパクノックアウト細胞ではほぼ変化がないのに対し、完全ノックアウト細胞ではスフェア形成能が著明に減少することが判明した。そこで、完全ノックアウト細胞に遺伝子 X の mRNA を部分的に戻す実験を行った。その結果、ある部分 (XA) を戻すとスフェア形成能が回復することが判明した。これらの実験から、XA には癌の悪性度を亢進させる作用があることが判明した。

私たちは癌に影響する新たなノンコーディング RNA を同定した。今後は、この分子機序を明らかにすると共に、遺伝子 X のノックアウトマウスを用いて、泌尿器悪性疾患に対する影響を明らかにしていく。

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katayama Hiromichi, Tamai Keiichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Mochizuki Mai, Yamaguchi Kazunori, Kawamura Sadafumi, Tochigi Tatsuo, Sato Ikuro, Okanishi Takamasa, Sakurai Kunie, Fujibuchi Wataru, Arai Yoichi, Satoh Kennichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Long non-coding RNA HOTAIR promotes cell migration by upregulating insulin growth factor binding protein 2 in renal cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12191-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Shibuya-Takahashi Rie, Nakamura-Shima Mao, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Kawamura Sadafumi, Yamaguchi Kazunori, Yasuda Jun, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Establishment of a Monoclonal Antibody That Recognizes Cysteine-Rich Domain 1 of Human CD271	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 6~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2019.0040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamai Keiichi, Nakamura-Shima Mao, Shibuya-Takahashi Rie, Kanno Shin-Ichiro, Yasui Akira, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Miura Koh, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Kawamura Sadafumi, Sato Ikuro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Satoh Kennichi	4. 巻 10
2. 論文標題 BEX2 suppresses mitochondrial activity and is required for dormant cancer stem cell maintenance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2045-2322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78539-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐藤 賢一 (Sato Kennichi) (10282055)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長 (81303)	
研究分担者	玉井 恵一 (Tamai Keiichi) (40509262)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・部長 (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------