

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18583

研究課題名(和文)腎癌予後不良性遺伝子群を包括的に標的とする癌抑制性miRNAの同定

研究課題名(英文)Identification and analysis of tumor suppressive miRNAs in RCC

研究代表者

神宮司 健太郎 (Jingushi, Kentaro)

大阪大学・薬学研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：80707571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本検討により、腎癌予後不良性遺伝子群を標的にするmiR-124-3p、miR-192-5pが癌細胞だけでなく、線維芽細胞に対しても抑制的に働くことがin vitroで示された。また、癌関連線維芽細胞のVEGFA発現抑制を介して両miRNAが、血管内皮細胞も標的としうることが示唆された。今後、生体内においても(in vivo)単一細胞種ではなく癌微小環境構成細胞に広く作用することで、強力な抗腫瘍作用が得られるのかを検証していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの癌における創薬研究は単一細胞種を標的としたものである。腎癌においても、癌細胞や血管内皮細胞において恒常的に活性化されている癌シグナル経路をターゲットにした創薬、また近年では腫瘍内免疫細胞をターゲットにした創薬が展開されているが、その効果はどの薬剤においても十分ではない。単一細胞種のみを標的とした場合、複雑にクロストークしている癌微小環境に大きなインパクトを与え、強力な抗腫瘍作用を得るのは難しい。本検討で着目したmiRNAは、癌細胞のみならず癌促進性に働く間質細胞に対しても抑制的に働くため、これまでの創薬ターゲットよりも強力な抗腫瘍作用を発揮できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found that miR-124-3p and miR-192-5p function as tumor suppressive miRNAs by targeting renal cancer cells and fibroblasts in vitro. Moreover, miR-124-3p and miR-192-5p strongly inhibited the expression of VEGFA in cancer-associated fibroblasts, suggesting that these miRNAs indirectly target endothelial cells in renal cancer. In vivo experiments should be addressed to verify the potential of miR-124-3p and miR-192-5p on tumor growth.

研究分野：癌、細胞外小胞、miRNA,

キーワード：癌抑制性miRNA 癌微小環境 腎癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌における単一細胞種を標的とした創薬研究の問題点

癌組織は、癌細胞をはじめとして様々な間質細胞(免疫細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞など)によって癌微小環境を構築している。癌微小環境内において個々の細胞種は、サイトカインやエクソソームによって複雑にクロストークすることで、癌の進展や転移において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

これまでの癌における創薬研究は単一細胞種を標的としたものである。腎癌においても、癌細胞や血管内皮細胞において恒常的に活性化されている癌シグナル経路をターゲットにした創薬、また近年では腫瘍内免疫細胞をターゲットにした創薬が展開されているが、その効果はどの薬剤においても十分ではない。単一細胞種のみを標的とした場合、複雑にクロストークしている癌微小環境に大きなインパクトを与え、強力な抗腫瘍作用を得るのは難しい。したがって、単一の細胞種を標的とした創薬ではその効果に限界が想定され、癌微小環境全体に抗腫瘍作用を発揮しうる標的分子が望まれる。

(2) 予後不良性遺伝子群は癌微小環境において広範囲の細胞種で高発現している

申請者は、in-house で得られた腎癌トランスクリプトーム情報と公共データベース TCGA(The Cancer Genome Atlas)を用いて、腎癌で高発現しておりかつその高発現が予後不良性である遺伝子群(552 遺伝子)の抽出に成功した。抽出遺伝子群が発現している細胞種を公共データベース Enrichr にて解析した結果、その高発現が予後不良性である遺伝子(予後不良性遺伝子群)は癌細胞だけでなく、間質細胞にも広く発現していることを見出した(図1)。

(3)腎癌と miRNA

microRNA (miRNA)は短い非コードRNAで、様々な細胞種で発現し、約200の標的遺伝子発現を抑制することが可能である。癌微小環境においてmiRNAは癌の悪性化に重要である。申請者は、腎癌における新規創薬標的分子を探索する目的でmiRNAに着目し、腎癌検体を用いたmiRNA-microarray解析を行っている。その結果、多くの腎癌で高発現しているmiRNAを同定するとともに、腎癌

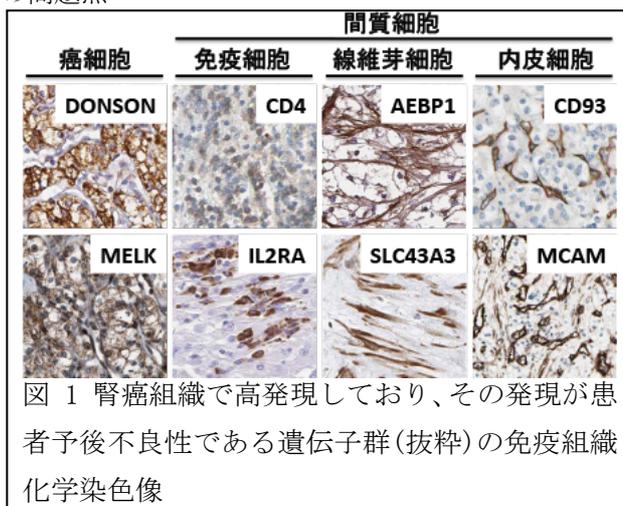


図1 腎癌組織で高発現しており、その発現が患者予後不良性である遺伝子群(抜粋)の免疫組織化学染色像

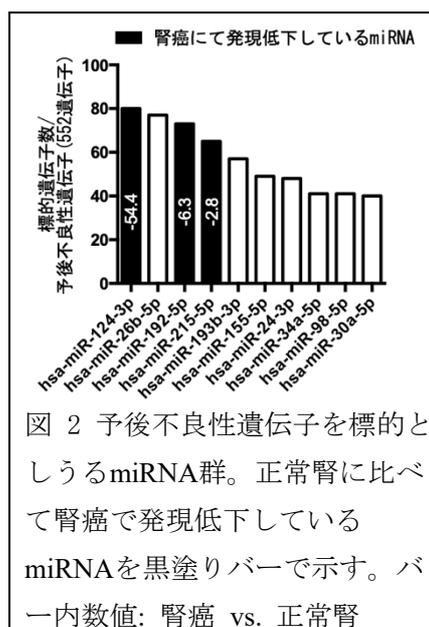


図2 予後不良性遺伝子を標的としうるmiRNA群。正常腎に比べて腎癌で発現低下しているmiRNAを黒塗りバーで示す。バー内数値: 腎癌 vs. 正常腎

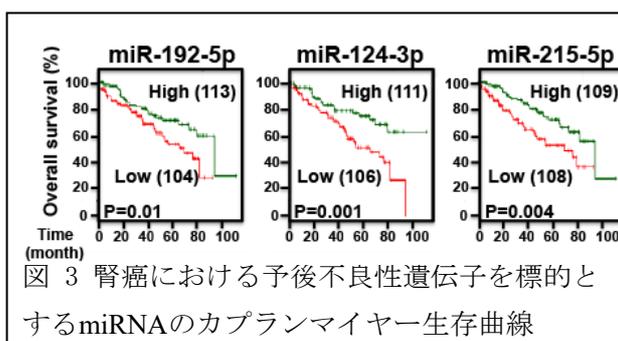


図3 腎癌における予後不良性遺伝子を標的とするmiRNAのカプランマイヤー生存曲線

で発現低下している miRNA も同定した。さらに、これら腎癌において発現低下している複数の miRNA が、上記(1)の腎癌予後不良性遺伝子群を広く標的としうることを見出した(候補 miRNA, 図 2)。また興味深いことに、miR-124-3p、miR-192-5p、miR-215-5p 高発現患者群は、低発現患者群に比べ有意に予後良好であった(図 3)。以上より、候補 miRNA を用いて腎癌予後不良性遺伝子群を同時に発現抑制することにより、単一細胞種ではなく癌微小環境に広く強力な抗腫瘍作用を与えることが可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究にて同定した複数の腎癌低発現 miRNA の腎癌における抗腫瘍作用の有無を明らかにすることで、腎癌微小環境を標的とした新規創薬標的分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

予後不良性である 552 遺伝子の大部分を標的とし、かつ腎癌組織にて最も発現低下している miR-124-3p、miR-192-5p に着目する。① miR-124-3p、miR-192-5p が実際に予後不良性遺伝子群の発現を抑制するの可否を検証する。腎癌に対する候補 miRNA の薬理作用を②腎癌細胞、③間質細胞に分けて解析する。

(1) 腎癌細胞に対する候補 miRNA の薬理作用を評価する

腎癌細胞株(786-0、Caki-1、Caki-2、ACHN 細胞)における 2 種の候補 miRNA の発現量を測定し、最も発現量の低い細胞株に候補 miRNA mimic をトランスフェクションすることにより、候補 miRNA を過剰発現させた際の *in vitro* 表現型解析(細胞増殖、遊走能、浸潤能アッセイ)を行う。

(2) 候補 miRNA による標的候補遺伝子群への発現抑制作用を検証する

腎癌細胞株 ACHN 細胞に対して候補 miRNA mimic(miR-124-3p、miR-192-5p)をそれぞれトランスフェクションし、得られた total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行う。

(3) 間質細胞に対する候補 miRNA の薬理作用を評価する

間質細胞に対する候補 miRNA の有効性を検証する。上記 552 遺伝子の含有率が高く、その取り扱いが比較的容易である血管内皮細胞、線維芽細胞に着目する。

① 血管内皮細胞を用いた *in vitro* 表現型解析

血管内皮細胞 HUVEC に対して候補 miRNA mimic をトランスフェクションし、管腔形成に対する影響を血管新生アッセイにより評価する。

② 線維芽細胞を用いた *in vitro* 表現型解析

線維芽細胞は腫瘍内にて血管新生促進因子 VEGFA や癌細胞の浸潤を促進する MMP-9 を産生することで癌促進性に働いている。そこで、線維芽細胞株 Balb/c 3T3 細胞に対して候補 miRNA mimic をトランスフェクションし、上記癌促進因子の発現を評価する。

4. 研究成果

(1) 腎癌細胞に対する候補 miRNA の薬理作用を評価する

腎癌細胞株では 4 種(786-0、ACHN、Caki-1、Caki-2 細胞)全てにおいて正常腎組織と比較し、2 種の候補 miRNA の発現は顕著に低かった(図 4)。以降の検討には ACHN 細胞を用いた。ACHN 細胞に対して miR-124-3p、miR-192-5p の完全相補配列をルシフェラーゼ遺伝子 3' UTR に組み込んだレポーターベクターを用いて、両 miRNA mimic をした際のルシフェラーゼアッセイを行なった。Negative control mimic をトランスフェクションした場合に比べて、両 miRNA mimic をトランスフェクションした際に顕著なルシフェラーゼ活性の低下が見られたことから、両 miRNA mimic が腎癌細胞で作用していることが確認できた(図 5)。2 種の候補 miRNA mimic によって、ACHN 細胞の細胞増殖能(図 6)、遊走能(図 7)、浸潤能が低下した(図 8)。また、786-0 細胞においても細胞増殖能、遊走能の低下がみられた(図 9)。

(2) 候補 miRNA による標的候補遺伝子群への発現抑制作用を検証する

腎癌細胞株 ACHN 細胞に対して候補 miRNA mimic(miR-124-3p、miR-192-5p)をそれぞれトランスフェクションし、得られた total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行なった。その結果、データベース解析において得られた候補 miRNA 標的 138 遺伝子のうち、約半数の 71 遺伝子に発現抑制が確認できた(図 10)。実際に候補 miRNA mimic によって発現抑制が見られた遺伝子には、先の表現型解析を説明しうる遺伝子が多数存在した(細胞増殖能: TMEM45A、細胞遊走能: CDCP1、細胞浸潤能: PLOD3、QSOX1、DLGAP5)。

(3) 間質細胞に対する候補 miRNA の薬理作用を評価する

① 血管内皮細胞を用いた in vitro 表現型解析

血管内皮細胞 HUVEC に対して候補 miRNA mimic をトランスフェクションし、管腔形成に対する影響を血管新生アッセイにて評価した。候補 miRNA mimic による HUVEC 細胞の管腔形成能は変化が見られなかった(図 11)。

② 線維芽細胞を用いた in vitro 表現型解析

線維芽細胞株 Balb/c 3T3 細胞に対して候補 miRNA mimic をトランスフェクションし、細胞増殖能に対する作用を評価した。両 miRNA mimic により Balb/c 3T3 細胞の増殖は顕著に抑制された(図 12)。癌細胞などから放出される TGF- β により線維芽細胞は癌関連線維芽細胞に分化することが報告されている。そこで、TGF- β による癌関連線維芽細胞への分化に対する候補 miRNA の作用を評価した。TGF- β によって癌関連線維芽細胞マーカーである α SMA 発現が上昇したが、両 miRNA mimic によって減弱した。また、血管新生促進因子 VEGFA や癌細胞の浸潤を促進する MMP-9 発現も TGF- β によって上昇したが、両 miRNA mimic によって減弱した(図 13)。

本検討により、腎癌予後不良性遺伝子群を標的にする miR-124-3p、miR-192-5p が癌細胞だけでなく、線維芽細胞に対しても抑制的に働くことが in vitro で示された。また、癌関連線維芽細胞の VEGFA 発現抑制を介して両 miRNA が、血管内皮細胞も標的としうることを示唆された。今後、生体内においても(in vivo)単一細胞種ではなく癌微小環境構成細胞に広く作用することで、強力な抗腫瘍作用が得られるのかを検証していく予定である。

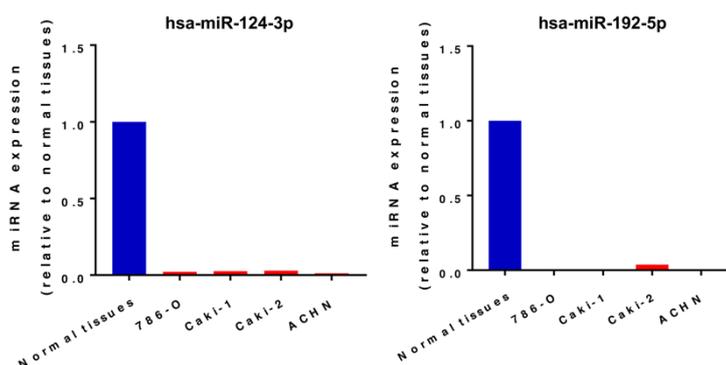


図 4 腎癌細胞株における候補miRNAの発現

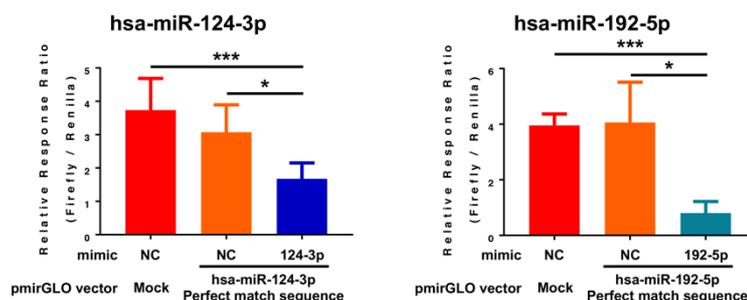


図 5 ACHN細胞における候補miRNA完全相補配列を用いたルシフェラーゼアッセイ

Data are mean \pm S.D. of six independent experiments. *p < 0.05, ***p < 0.001 Dunnett's tests

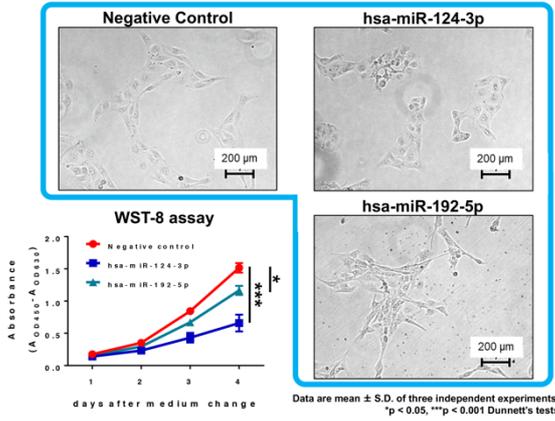


図 6 ACHN細胞の増殖能に対する候補miRNAの作用評価

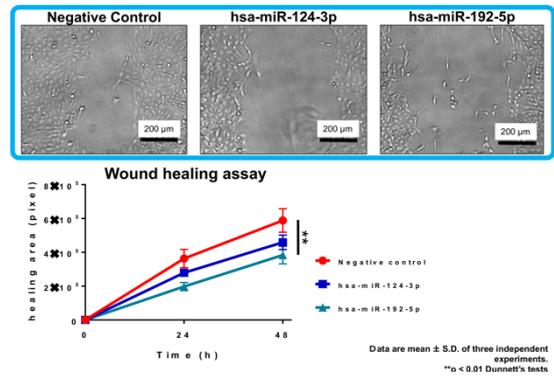


図 7 ACHN細胞の遊走能に対する候補miRNAの作用評価

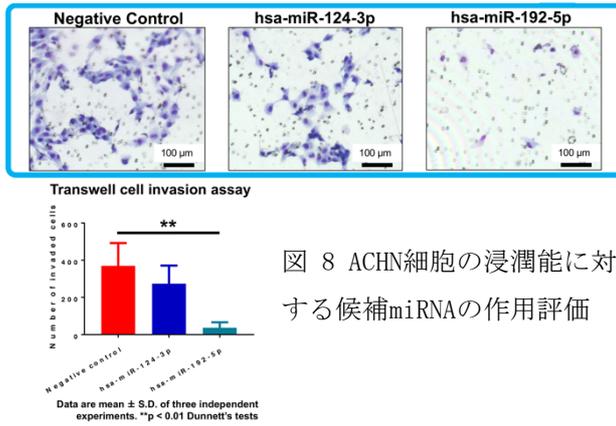


図 8 ACHN細胞の浸潤能に対する候補miRNAの作用評価



図 9 786-O細胞の増殖能、遊走能に対する候補miRNAの作用評価

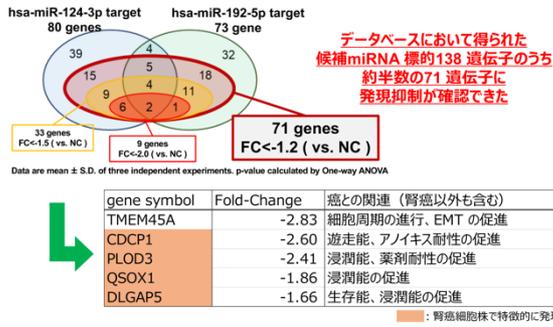


図 10 候補miRNA mimicを用いたマイクロアレイ解析結果

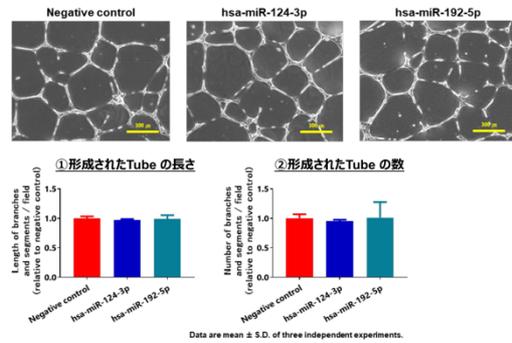


図 11 管腔形成能に対する候補miRNA mimicの作用評価

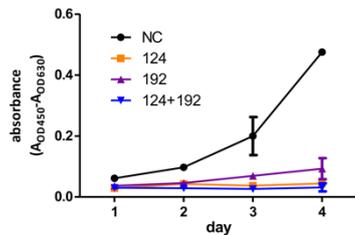


図 12 線維芽細胞の増殖能に対する候補miRNAの作用評価

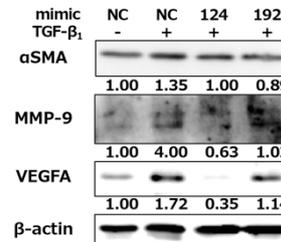


図 13 癌関連線維芽細胞の分化マーカー、VEGFA、MMP-9発現に対する候補miRNAの作用評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服部 功、神宮司 健太郎、長谷 拓明、北惠 郁緒里、上田 裕子、植村 元秀、野々村 祝夫、辻川 和丈
2. 発表標題 腎癌予後不良性遺伝子群を包括的に標的とする 癌抑制性miRNAの探索と評価
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
研究協力者	辻川 和丈 (Tsujikawa Kazutake)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	野々村 祝夫 (Norio Nonomura)	大阪大学 (14401)	

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
---------	---------