

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591759

研究課題名（和文） マイクロRNAによる泌尿器科癌の癌（抑制）遺伝子制御の研究

研究課題名（英文） Regulation of oncogenes or tumor suppressor genes in Urological cancer by micro RNA

研究代表者

富田 善彦（TOMITA YOSHIHIKO）

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90237123

研究成果の概要（和文）：腎細胞癌で発現低下している miR-199a と miR-101 の強制発現は、それぞれ GSK3 β と EZH2 の発現と細胞増殖を抑制した。両者の腫瘍細胞への導入は新規治療法となる可能性がある。また ATBF1 の発現抑制と腎細胞癌の悪性度の正の相関がみられ、hsa-miR-203, hsa-miR-194, hsa-miR-204 の関与が疑われ、これらの阻害も新規治療法の可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Enforced expressions of miR-199a and miR-101, of which expressions are inhibited in renal cell cancer (RCC), leads to suppression of GSK3 β and EZH2 resulting in reducing cancer cell proliferation. Re-introduction of miR-199a and/or miR-101 might be a beneficial treatment strategy. Reduced expression of ATBF1 is correlated with more malignant character of RCC. hsa-miR-203, hsa-miR-194, hsa-miR-204 are proposed as suppressors of ATBF1 might be novel targets for another new treatment modality.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：マイクロナ、泌尿器科癌、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 二重鎖 RNA は遺伝子発現を抑制する
二重鎖 RNA (dsRNA) が遺伝子の発現を調節することが Napoli らによって植物の系で 1990 年に発見されたが (Plant Cell., 2, 279-289, 1990), この現象は, C. elegans (線虫) や Drosophila (ハエ) でも存在することが明らかになった (Nature, 391, 806-811, 1998, ditto, 404, 293-296). 哺

乳類細胞では, 二重鎖 RNA (30 塩基対以上) は非特異的なインターフェロンによる反応が起きることが多いために, 同様の現象があるかどうかについては懐疑的であったが, 21-22 塩基対の RNA (short interfering RNA, siRNA) が同様に標的遺伝子の発現を抑制することが明らかになった (Nature, 411, 494-498, 2001, Science, 296, 550-553, 2007).

(2) 細胞内のマイクロ RNA は遺伝子発現を調節している

このことは、siRNA が特定の標的遺伝子発現を減弱させる tool となりうることを示しており、癌細胞で高発現している遺伝子を標的とすれば、治療手段となる可能性があり、現在、研究が行われているわけである。一方、この現象の生理的意義について細胞内の微小な RNA の研究が継続された結果、遺伝子発現を調節する microRNA(miRNA) が存在することが明らかになった。

初めて同定された miRNA は *C. elegans* での *lin-4*, *let-7* で、この遺伝子変異が発生の障害をもたらすことが明らかになった (Cell, 75, 843-854, 1993, Nature, 403, 901-906, 2000). その後、哺乳類細胞でも次々に miRNA が同定され、その機能は、発生の制御、細胞の増殖と死、さらに、発癌にも関係していることが明らかになった。ヒトにおいては、この miRNA は全遺伝子数の 3% に相当する数が存在すると想定されているが、2008 年 11 月現在、700 個強のヒト miRNA が同定されている (miRBase Sanger Inst.). そして、この miRNA のシーケンスから想定して 30% 以上の遺伝子が発現の制御を受けていると考えられる (Cell, 120, 15-20, 2005). dsRNA が遺伝子抑制効果を発現する場合や細胞質の miRNA 前駆体が成熟 miRNA となり効果を示す際には、いずれも Dicer と呼ばれる酵素によりプロセッシングを受けるが、この際には、ヒトの細胞の場合には Ago, TRBP というコンポーネントとともに RISC(RNA-induced silencing complex)をつくり、二重鎖のうち使用されない側 (passenger strand) を分解し、標的 mRNA と結合することになる。この際に、標的 mRNA と完全に相補的であればこれを分解し、ミスマッチがあれば遺伝子の翻訳の抑制 (translational repression) がおきるようになることが明らかになっている。このように、現時点で (2008 年 11 月 1 日) miRNA の効果発現機構は相当程度解明されてきており、このシステムの異常の有無についても検討が可能と考えられる。

(3) マイクロ RNA は発癌とも関係している

これまでの検討からは miRNA のうち *let-7* は Ras 遺伝子の制御を行っていることが知られている。また *miR-17* は PTEN の抑制に働くと報告や、*miR-17-5p* や *miR-20a* が癌細胞増殖と関係しているとの報告がある。これらの事実、これまで、エピジェネティックな変化と捉えられてきた遺伝子発現の変化が、miRNA の機能の異常によりもたらされている可能性を示唆しており、この miRNA 機能の回復 (retrieve) は癌治療に結びつく可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに本研究チームが取り組んできた、泌尿器科癌の悪性度決定する分子 GSK3 β やアポトーシス関連分子の発現と、それらの発現制御に関係するであろうマイクロ RNA について、その発現を検討し、マイクロ RNA の発現制御が標的分子の発現修飾について研究することで、新たな治療法の開発に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の計画は以下の 4 つのステップにより構成される。ステップ・1, 泌尿器科癌、特に腎細胞癌における mRNA と miRNA の関係の検討。ステップ・2, 既知 miRNA の泌尿器科癌における発現の検討。ステップ・3, miRNA の機能の再構成による治療モデルの検討。ステップ・4, miRNA 発現の抑制による治療モデルの検討、である。

4. 研究成果

(1) 平成 22 年度

【目的】GSK3 β は、腎癌において核内に高発現し、NF- κ B を通じて、XIAP や Bcl-2 といった anti-apoptotic factor の発現を上昇させ、癌の発生や増殖を促進する。逆に GSK3 β を阻害するとその発生や増殖が抑制されることも示されている。データベース上では miR-199a はその塩基配列から GSK3 β の mRNA を抑制し、その発現を抑制することが予想され、新たな治療のターゲットとなる可能性がある。そこで我々は、実際に miR-199a が腎細胞癌において GSK3 β を抑制するかを調べた。

【方法】細胞株 (Caki1, ACHN, A498) に pre-miR-199a を導入し、72 時間後の GSK3 β の発現を western blotting で調べ、細胞の生存については MTS アッセイで測定した。臨床検体は 54 対の正常腎組織と腎細胞癌組織を用い、miR-199a の発現と GSK3 β の免疫染色の相関を調べた。

【結果】細胞株に対する miR-199a の導入群では、すべてにおいて control に対して GSK3 β の発現低下および XIAP, Bcl-2 の発現低下が確認された。MTS アッセイ、BrDU アッセイにおいても生存細胞数の減少を認めた。臨床検体では 54 例中 32 例 (59.2%) で miR-199a が発現低下しており、免疫染色との比較では発現に反比例して核内の GSK3 β が染色されない傾向にあった ($P=0.0272$)。

【結論】以上より、miR-199a の再発現は腎細胞癌において GSK3 β を抑制し、新たな治療のターゲットとなる可能性があると考えられた。

(2) 平成 23 年度

【目的】EZH2 は Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) のサブユニットの一つで、

ヒストン H3K9 や H3K27 のメチル化に関与し、遺伝子の epigenetic silencing、DNA のメチル化を通して、細胞の分化や増殖にかかわっている。

これまでに、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、大腸癌、膵癌、腎癌など、様々な癌で上昇の報告がなされている。しかし、腎細胞癌では、癌で発現が増強しているという報告がある一方、減少しているとの報告もあり、一定しない。EZH2 は、また、miR-101 に調節を受けることも知られており、miR-101 は EZH2 の 3' UTR から 59-65 塩基と 114-121 塩基の領域を標的としている。この研究で我々は、臨床検体を用いて、腎細胞癌での EZH2 の意義を明らかにするとともに、miR-101 と EZH2 に注目し、その機能制御の分子標的治療への応用の可能性について検討した。

【方法】臨床検体は免疫組織染色で 110 症例について検討した。細胞株は ACHN, KRC/Y, Caki1, Caki2, A704, A498, KH39, KU19-20。生細胞については MTS アッセイで測定した。

【結果】臨床検体での検討から、EZH2 は腎癌細胞の核で発現が上昇しており、EZH2 強発現群は EZH2 発現なし/弱発現群に比べて生存期間が有意に短いことが明らかになった。細胞株でも核で高発現していることが明らかになった。また、Pre-miR-101 を腎細胞癌細胞株に遺伝子購入すると EZH2 の発現が低下することが明らかになった。

【結論】以上より、腎細胞癌では EZH2 が子発現し、予後不良因子として考えられ、さらに miR-101 の導入がこの EZH2 の発現と細胞増殖を抑制することが考えられ、分子標的治療の良い標的分子となる可能性が示唆された。

(3) 平成 24 年度

【目的】ATBF1 (AT-binding transcription factor 1) または ZFX3 (Zinc finger homeobox 3) は 1200bp の長さをもつ遺伝子にコードされた蛋白で、細胞外器質に結合することでその局在が変化し、脳の形態形成にまで影響を与えることが知られている。また、ATBF1 に関係する分子である Snail と Slug は p53 により活性化され、細胞のアポトーシスに関与していることもしれられている。一般に、ATBF1 の核での低発現は腫瘍細胞の高い悪性度を示すと考えられ、前立腺癌症例では ATBF1 遺伝子が高頻度に欠損していることが知られている。さらに、肝細胞癌、大腸癌でも発現減少が報告されているが、腎細胞癌での発表は見られない。今回の研究では、ATBF1 の腎細胞癌での発現と臨床病理的な性格との関係の検討を行うとともに、microRNA の関与を中心に、発現抑制機構を検討し、その機能制御の分子標的治療への応用の可能性について検討することを目的とした。

【方法】臨床検体は免疫組織染色で ATBF1

の発現を 50 症例について検討した。ATBF1 の関与に関係する microRNA の探索に関しては TargetScan Human release 6.2 (2012) database search を行った。

【結果】臨床検体での検討から、正常腎組織に比較して ATBF1 の発現減少を認めた。また、その発現抑制に関係する可能性がある microRNA としては、hsa-miR-203, hsa-miR-194, hsa-miR-204 が考えられた。

【結論】以上より、腎細胞癌では ATBF1 の発現が抑制され、予後不良因子として考えられる。

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 2 件)

1. Sakurai T, Bilim VN, Ugolkov AV, Yuuki K, Tsukigi M, Motoyama T, Tomita Y: The enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a potential therapeutic target, is regulated by miR-101 in renal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422:607-614

DOI 10.1016/j.bbrc.2012.05.035.

(査読有)

2. Tsukigi M, Bilim V, Yuuki K, Ugolkov A, Naito S, Nagaoka A, Kato T, Motoyama T, Tomita Y: Re-expression of miR-199a suppresses renal cancer cell proliferation and survival by targeting GSK-3 β . *Cancer Letters.* 2012;315:189-197

DOI 10.1016/j.canlet.2011.10.008

(査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 槻木真明, 内藤整, ビリムウラジミル, 結城加織, 川添久, 櫻井俊彦, 細谷法之, 本山 侑一, 富田善彦: 腎細胞癌における miR-199a の低発現は、GSK-3 β を上昇させ、癌増殖に働く. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場; 2011 年 10 月 4 日

2. Masaaki Tsukigi, Vladimir Bilim, Kaori Yuuki, Andrey Ugolkov, Sei Naito, Hisashi Kawazoe, Toshihiko Sakurai, Noriaki Hoshoya, Narisawa Takahumi, Akira Nagaoka, Tomoyuki Kato, Mototsugu Oya, Teiichi Motoyama, Yoshihiko Tomita

Low miR-199a expression in Renal Cell Carcinoma (RCC) is related to malignant phenotype via upregulation of GSK-3 β . AUA. Annual Meeting, Washington D.C, USA Walter E. Washington

Convention Center ; May 15, 2011

3. 槻木真明, 内藤整, 結城加織, ビリームウラジミル, 川添久, 櫻井俊彦, 細谷法之, 成澤貴史, 黒田悠太, 菅野秀典, 西田隼人, 真島英太, 富田善彦 : mir199-5p は腎細胞癌 (clear cell carcinoma) において GSK3 β を抑制する. 第 99 回日本泌尿器科学会, 名古屋国際会議場 ; 2011 年 4 月 24 日

4. 櫻井俊彦, ビリームウラジミル, 結城加織, 槻木真明, 富田善彦 : 腎細胞癌における Enhancer of zeste homolog 2 の発現上昇は, microRNA101 の発現低下が関与している. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場 ; 2010 年 9 月 24 日

5. T. Sakurai, V. Bilim, K. Yuuki, M. Tsukigi, A. V. Ougolkov, Y. Yomita : Expression of enhancer of zeste homolog 2 in renal cell carcinoma and relationship to downregulation of micro RNA-101. ASCO, Chicago USA MCCORMICK PLACE ; Jun 7, 2010

6. Toshihiko Sakurai, Vladimir Bilim, Kaori Yuuki, Masaaki Tsukigi, Yoshihiko Tomita : ENHANCER OF ZESTE HOMOLOG 2 IS OVEREXPRESSED IN RENAL CELL CARCINOMA POSSIBLY DUE TO DOWNREGULATION OF MICRORNA-101. AUA Annual Meeting, san francisco, USA Moscone Convention Center ; May 30, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 善彦 (TOMITA YOSHIHIKO)

山形大学・医学部・教授

研究者番号 : 90237123