

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590485

研究課題名(和文)腎臓明細胞癌で異常発現するmiR-210の機能解析

研究課題名(英文)Biological analysis of miR-210 which is deregulated in clear cell renal cell carcinoma.

研究代表者

中田 知里(Nakada, Chisato)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60379625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：miR-210過剰発現が腎臓の発生・進行に関わる可能性を検討することを目的とし、miR-210標的遺伝子の特定、miR-210過剰発現が腎臓発症を引き起こすか否か(トランスジェニックマウスの樹立と病理学的解析)の2点を検討した。

培養細胞とmiR-210-Tgマウスを用いた網羅的発現解析より、細胞分裂異常を引き起こす標的遺伝子Aを見出した。miR-210-Tgマウスを96週齢まで観察した。腎臓の発症は認められなかったが、若年より慢性的な炎症が観察され、加齢に伴って腎機能が低下した。本研究で、miR-210過剰発現が腎臓発生母地である尿細管上皮に障害を与えることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously, I have reported that miR-210 is constitutively upregulated in clear cell renal cell carcinoma because of the deregulation of VHL-HIF axis. To elucidate whether the upregulation of miR-210 is involved in the tumorigenesis and/or progression of renal cell carcinoma, I addressed the following two issues, 1) the identification of the target genes of miR-210 and 2) the observation of biological effect of miR-210 upregulation on renal tubules in vivo. Research results; A miR-210 target gene which is conserved as target between human and mouse was identified by microarray analysis. MiR-210 transgenic mice which express miR-210 in renal proximal tubules were established and histopathologically analyzed. Tg-mice kept alive without specific symptoms and development of renal carcinoma at least for 96 weeks. The chronic inflammations were observed in kidneys of young Tg-mice, and their renal function was diminished with aging. The overexpression of miR-210 may damage the renal tubules.

研究分野：実験病理学

キーワード：microRNA トランスジェニックマウス 腎臓

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎細胞癌は、発生率は3%と低いが、5年生存率は依然として低い予後不良の疾患である。近年、蛋白質をコードしていないsmall RNA (microRNA) が messenger RNA の分解と翻訳を制御し、細胞増殖、分化、アポトーシスを含む生物学的プロセスに重要な働きをすることが明らかとなっている。癌においても、microRNA の異常発現が癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常発現を介して、発癌や進行に関与することが示唆され注目された。私はこの点に着目し、腎細胞癌における miRNA 発現をマイクロアレイ (Agilent G4470A) を用いて Sanger miRBase 9.1 に登録されている 470 個の Human miRNA の発現を解析し報告した (Nakada et al. J Pathol 2008)。Clear cell carcinoma (CCC 16 症例)、chromophobe renal cell carcinoma (ChCC 4 症例) と正常腎組織 (6 例) における miRNA 発現を比較したところ、CCC では 43 個の miRNA が発現変動しており、miR-155、-210 など 6 個が発現上昇し、miR-141、-200c など 37 個が発現低下していた。

(2) 腎細胞癌において、症例の 70% を占める亜型「淡明細胞癌 (Clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)」ではおよそ 8 割の症例で癌抑制遺伝子 VHL が不活化しており、腎癌発症に関与していると考えられている。VHL 蛋白質はユビキチン E3 リガーゼであり、通常酸素濃度において、転写因子 HIF1 を基質としてユビキチン化し、これの分解を促進しているが、変異などにより不活化すると HIF1 が細胞内に蓄積し、VEGF、PDGF、TGF などの発現を亢進させ、血管新生の促進や、癌細胞に growth advantage や survival advantage をもたらすと考えられている。2008 年に乳癌細胞において miR-210 が HIF1 によって発現調節されることが報告され、私は ccRCC における miR-210 過剰発現は HIF1 の蓄積によって引き起こされていると考えて、このことを腎癌細胞株に siRNA を導入して証明した (Nakada et al. J Pathol 2011)。つまり ccRCC において miR-210 過剰発現は VHL 不活化によってもたらされており、ひとつの分子病理学的な特徴であるといえる。さらに miR-210 発現上昇の生物学的意義を明らかにすることは、VHL-HIF 経路の脱制御による腎癌発症について新規メカニズムの解明につながると考えられた。

(3) そこで、腎癌細胞を含む様々な細胞に miR-210 を遺伝子導入し、機能解析をおこなった。興味深いことに、miR-210 を過剰発現させると細胞分裂期に多極紡錘体が形成され、分裂異常が引き起こされた (Nakada et al. J Pathol 2011)。多極紡錘体は、染色体分配異常を引き起こし染色体異常の原因となることが知られているが、実際に miR-210 過剰発現細胞で染色体数異常 (aneuploidy) が誘導されていることも確認し、報告した (Nakada et al. J Pathol 2011)。以上のことから私は「VHL-HIF1 経路の脱制御

によって引き起こされた miR-210 発現亢進は、多極紡錘体を誘導して染色体分配異常を引き起こし、細胞に染色体数異常を獲得させることによって腎癌発症・悪性化に関与している可能性がある」との仮説を立てた。そして以下の 2 点、1) miR-210 の標的遺伝子を特定し、多極紡錘体形成のメカニズムを明らかにすること、2) miR-210 を腎尿細管特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (miR-210-Tg マウス) を作製し、個体レベルで発癌に関与しているかを検証することで仮説を証明しようとした。

## 2. 研究の目的

本研究は miR-210 の過剰発現が腎癌の発生・進行に関わる可能性を検討することを目的として、以下の 2 点を明らかにしたい

miR-210 過剰発現によって多極紡錘体を形成するメカニズム (標的遺伝子の特定)

miR-210 過剰発現が腎癌発症を引き起こすか否か (miR-210 トランスジェニックマウスの樹立と病理学的解析)

## 3. 研究の方法

(1) miR-210 の標的遺伝子を特定し、多極紡錘体形成のメカニズムを明らかにする

網羅的解析によりこれを特定する。腎癌細胞に miR-210 前駆体オリゴを導入し、マイクロアレイ解析により変動する遺伝子リストを得る。この中から microRNA 標的推測アルゴリズムを用いて絞り込み、siRNA を用いて候補遺伝子を抑制し、多極紡錘体形成を指標にして、標的を特定する。

(2) miR-210-Tg マウスを作製し、miR-210 過剰発現の影響を個体レベルで調べる

尿細管上皮特異的に miR-210 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製する (参考: Am J Physiol 15: 2050-2056, 2004)。系統樹立後、若年から経時的に腎組織について病理学的に観察する。腎癌が発生した場合は、マウス腎腫瘍とヒト腎癌の共通点を明らかにするためにマイクロアレイを用いてゲノム異常、遺伝子と microRNA 発現プロファイルを作製して比較する。

## 4. 研究成果

(1) miR-210 トランスジェニックマウス作製

近位尿細管特異的遺伝子 SGLT2 プロモーターと、その下流に mmu-mir-210、SV40polyA シグナル配列を挿入したプラスミドより、これらを切り出し、精製した DNA 断片を C57BL/6J

マウス受精卵 300 個にインジェクションした。F0 マウスが 27 匹誕生し、うち 5 匹が陽性マウスであった。3 匹より F1 マウスが得られ、3 系統を樹立した。サザンブロット解析を行い、2 系統は 1 コピー、1 系統は高コピーの DNA 断片が挿入されていることを確認した。

腎臓における miR-210 発現部位を確認するために in situ hybridization を行い、高コピー系統において、ほぼ近位尿細管特異的に発現していることを確認した。また qRT-PCR により、腎臓以外の臓器では発現誘導されていないことを確認した。しかしながら 1 コピーの 2 系統では in situ hybridization において陽性シグナルが認められなかったため、最終的に 1 系統で以後の解析を行うことにした。

## (2) マウス腎組織の病理学的解析

トランスジェニックマウスは生殖に問題はなく、メンデルの法則に則って誕生した。最長 96 週齢まで観察したが、WT と外見上の違いがなかった。8, 16, 37, 52, 78, 93 週齢のマウスより腎臓を摘出し、病理学的に観察した。

Tg マウスの腎臓では、8 週齢においてすでに炎症が認められ、リンパ球の浸潤があった。加齢に伴い、糸球体のう胞が観察されるようになり、尿細管の拡張も認められるようになった。その一方で、Ki67 陽性細胞の増加も認められた。腎機能評価のために、血清を回収してクレアチニン (CRE) と尿素窒素 (BUN) の測定を行ったところ、52 週齢以降でクレアチニンの軽度上昇が認められたことから、腎機能の低下が起きていると考えられた。

## (3) マウス腎組織を用いたマイクロアレイ解析

miR-210 過剰発現が腎臓の遺伝子発現に与える影響を調べるために、8 週齢のマウス腎臓より RNA を回収し、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。Tg マウスと野生型で異なる発現が認められた遺伝子には、マウスにおける miR-210 標的候補遺伝子が含まれていた。また、変動した遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行ったところ、炎症や腎不全に関連するシグナル経路が検出された。

## (4) 培養細胞を用いた miR-210 標的遺伝子の検索

miR-210 標的分子を特定するために、HEK293 不死化細胞、7860、Caki2、ACHN の腎癌細胞株に miR-210 前駆体オリゴあるいは miR-210 発現ベクターを導入して RNA を回収し、マイクロアレイを行った。細胞間で共通して変動する遺伝子を抽出し、さらに microRNA 標的検索アルゴリズム (TargetScan) を利用した絞込みをおこない、

22 個の候補遺伝子を見出した。この遺伝子群は、腎癌細胞 Caki2 において miR-210 を発現抑制すると発現上昇が認められたことから、miR-210 によって発現制御を受けていると推測された。以前に miR-210 の過剰発現によって細胞分裂異常が引き起こされることを報告しているが、今回見出した 22 個の遺伝子群には、細胞分裂を直接的に制御している分子 (サイクリンや CDK など) は含まれていなかった。

## (5) miR-210 標的候補遺伝子の機能解析

項目(4)より得られた 22 個の候補遺伝子の中に、miR-210-Tg マウスの腎臓においても発現低下が認められたもの (項目(3)参照)があった。そもそも mRNA において、ORF 領域に比べて 3' -UTR は種間であまり保存されていないことから、ヒトとマウスで共通の標的候補はとて少ない。今回 2 つのアレイ解析で共通して検出された遺伝子は、種を超えて標的として保存されているものであり、miR-210 過剰発現時の表現型に対して特に重要な役割を担っていると考えられる。

上述の共通する標的候補について、siRNA を用いた発現抑制を行ったところ、G2/M 期の延長を伴って細胞増殖が低下する gene-A を見出した。A について、発癌や癌転移などに関与しているといった報告はない。今後は、まず miR-210 過剰発現による表現型が gene-A の発現低下によるものであるかを検証する。3' -UTR の miR-210 結合配列を欠失あるいは変異させた Gene-A 発現ベクターを作製し、これを細胞に過剰発現させ、同時に miR-210 を導入した場合に、分裂期遅延や細胞増殖低下がレスキューされるかを検証する。また、尿細管細胞で発現低下させた場合にも分裂異常が確認されるかも検討する。その後、gene-A に結合するたんぱく質の同定や、gene-A の発現変動によって変動するシグナル経路の特定に進みたい。

## (6)まとめ

今回、培養細胞とトランスジェニックマウスを用いた網羅的発現解析より、発現低下により細胞分裂異常を引き起こす miR-210 標的遺伝子 A を見出した。今後は gene-A について細胞レベルでの機能解析 (項目(5)参照)を行う。

また、トランスジェニックマウスにおいて腎癌の発症は認められなかったが、慢性的な炎症が引き起こされていた。ヒト癌の発症に慢性炎症は深くかかわっていることが知られており、慢性炎症の原因の解明とその除去は、発癌の抑制に有効である。腎癌においても慢性炎症が発癌を促進するものである可能性は否定できない。そこで今後は、炎症を惹起するメカニズムを解析したい。また、miR-210 標的遺伝子 A の発現低下と炎症が関

係するか否かについても検証したい。

#### 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 9 件)

Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K.

Atrial Fibrillation-Mediated Upregulation of miR-30d Regulates Myocardial Electrical Remodeling of the G-Protein-Gated K<sup>+</sup> Channel, IK<sub>1</sub>ACH.

Circ J. 2016 May 13. In press. 査読有

Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M.

Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma.

Cancer Res. 2016 ;76(9):2612-2520. 査読有 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1846.

Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M.

Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway.

J Pathol. 2016 ;239(1):97-108. 査読有 doi: 10.1002/path.4706.

Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M.

Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma.

Cancer Sci. 2016 ;107(4):417-23. 査読有 doi: 10.1111/cas.12892.

Tsukamoto Y, Fumoto S, Noguchi T, Yanagihara K, Hirashita Y, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Matsuura K, Hamanaka R, Murakami K, Seto M, Inomata M, Moriyama M.

Expression of DDX27 contributes to

colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer.

Am J Cancer Res. 2015 ;5(10):2998-3014. 査読有

Narimatsu T, Matsuura K, Nakada C, Tsukamoto Y, Hijiya N, Kai T, Inoue T, Uchida T, Nomura T, Sato F, Seto M, Takeuchi I, Mimata H, Moriyama M.

Downregulation of NDUFB6 due to 9p24.1-p13.3 loss is implicated in metastatic clear cell renal cell carcinoma.

Cancer Med. 2015 ;4(1):112-24. 査読有 doi: 10.1002/cam4.351.

中田知里、守山正胤

遺伝子医学 MOOK 23号 臨床・創薬利用が見えてきた microRNA 第1章 microRNA 診断 10. 腎がんにおいて異常発現する miRNA とその機能 pp. 77-82 (2012 年) 査読無

Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M.

Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization.

PLoS One. 2013 ;8(2):e56165. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0056165.

Matsuo M, Nakada C (contributed equally 1st), Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Moriyama M.

MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2.

Mol Cancer. 2013 ;12:15. 査読有 doi: 10.1186/1476-4598-12-15.

〔学会発表〕(計 4 件)

森島真幸、岩田英理子、中田知里、塚本善之<sup>ほか</sup>  
心房細動におけるイオンチャネルリモデリングを制御する microRNA  
第 65 回西日本生理学会 (2014 年 10 月)  
琉球大学 (沖縄県中頭郡西原町)

甲斐友樹、松浦恵子、中田知里、塚本善之<sup>ほか</sup>  
SAV1 inhibits renal tumor growth in xenograft model.

第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月)  
横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

森島真幸、岩田英理子、中田知里、塚本善之<sup>ほか</sup>  
MicroRNA-dependent regulation of K<sup>+</sup> channel remodeling in human cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation.  
第 29 回日本不整脈学会学術大会・第 31 回日本心電学会学術集会 合同学術大会(2014 年 7 月)  
プリンスパークタワー東京(東京都港区)

塚本善之、松尾光浩、中田知里、野口剛<sup>ほか</sup>  
MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2.  
第 72 回日本癌学会学術総会(2013 年 10 月)  
横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 知里 (NAKADA CHISATO)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：60379625