

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890116

研究課題名(和文) 転移性腎細胞癌における診断、治療選択に有用なバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Discovery of biomarker due to personalized medicine for metastatic renal cell carcinoma patients

研究代表者

植村 元秀 (Uemura, Motohide)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40631015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：腎細胞癌臨床検体を用いて、正常腎および癌部よりRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行い、腎癌組織に特異的に発現上昇を認めたmiR-629について機能解析を進めた。miR-629阻害剤は細胞増殖能には影響を与えないが、細胞遊走能抑制効果を認めた。miR-629の標的候補としてSmad4を抑制するTrim33が予測された。miR-629阻害剤によりTrim33の発現の上昇を認め更に、miR-629阻害剤により形態学的に腎癌細胞株はより上皮に近い形態に変化したことから上皮間葉転換への関与が示唆された。これらの機能を阻害することで、新規核酸治療のターゲットとなりうるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：To identify a therapeutic candidate target molecule for ccRCC, we analyzed the microRNA (miRNA) expression in ccRCC clinical specimens. miRNA microarray and real-time PCR analyses revealed that miR-629 expression was significantly upregulated in ccRCC compared to the adjacent non-cancerous renal tissue. Functional inhibition of miR-629 by miRNA inhibitor suppressed cell migration and invasion. MiR-629 directly targeted TRIM33, which inhibits the TGF-beta/Smad signaling pathway. MiR-629 inhibitor significantly suppressed TGF-beta-induced Smad activation by upregulating TRIM33 expression. Moreover, miR-629 inhibition attenuated the effect of TGF-beta on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related factors in ccRCC cell lines. In clinical ccRCC specimens, downregulation of TRIM33 was observed with the association of both pathological stages and grades. Our findings indicate that miR-629 is a potent regulator of the TGF-beta/Smad signaling pathway via TRIM33 in ccRCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 マイクロRNA マイクロアレイ 上皮間葉転換

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム情報発現系における新たな調節・制御分子としてマイクロRNA(miRNA)が注目されている。miRNAは蛋白質に翻訳されない non-codingRNA であり翻訳阻害あるいは RNA 干渉により標的分子を阻害することから、がん遺伝子やがん抑制遺伝子と同様にがんの発生・分化における分子機序に深く関与すると考えられている。また、最近になって癌細胞が自らの miRNA をエキソソームと呼ばれる封入体に封入して血液、尿中に分泌していることが明らかになっており、尿や血液中に存在する miRNA を癌の検出のためのマーカーとして使用する報告がなされてきた。本研究においては腎細胞癌特異的な miRNA 発現解析を行い、更に、血液中に分泌された候補 miRNA の検出、定量を行い、予後不良とされている転移性腎細胞癌患者の治療選択、治療効果判定に用いることのできる実用的バイオマーカーとして開発し、臨床応用をめざす。

### 2. 研究の目的

本研究は転移性腎細胞癌における診断、治療選択に有用なバイオマーカーの開発を主眼として開始された。具体的には以下の2つを目的とした。

- (1) 腎細胞癌患者より採取した臨床検体を用いて腎細胞癌特異的マイクロRNAを同定する。
- (2) 同定した腎細胞癌特異的マイクロRNAを血液中で検出、定量を行い実用的バイオマーカーとして臨床応用する。

### 3. 研究の方法

個性診断および新規個別化治療法の確立を念頭におき、miRNA の機能的スクリーニングに腎細胞癌特異的 DNA メチル化解析、mRNA 発現解析を組み合わせる絞込みを行い、腎細胞癌特異的 miRNA の同定を行った。具体的には mRNA、miRNA、DNA メチル化をマイクロア

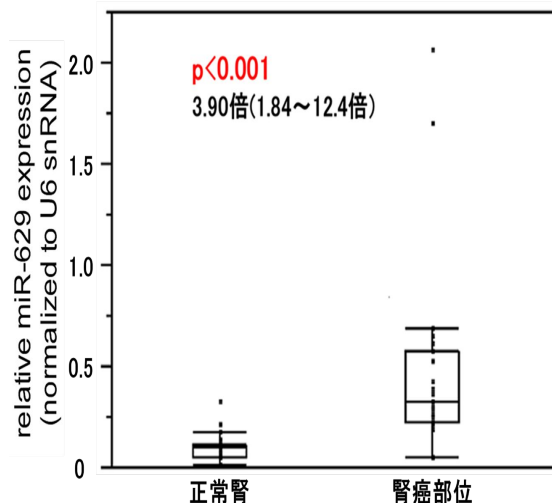
レイの手法を用いて解析を行った。

腎細胞癌患者血液から miRNA を抽出し約 800 の miRNA の発現解析を行うリアルタイム RCR をパネルを用いて、特異的に発現上昇を認める miRNA を同定を行った。腎細胞癌組織特異的に発現上昇を認めたものと共通する miRNA を、腎細胞癌患者の血液中より簡易的な方法であるリアルタイム RTPCR 法によって検出、定量することが可能かどうかを検証を行った。

### 4. 研究成果

当院で2010年7月から2012年8月の間に当院にて手術を施行した9例に対し、正常腎および腎癌組織のマイクロアレイ解析を行った。現時点においてmiRNAのマイクロアレイ解析は終了し、結果として過去に報告されたものと一部重複するmiRNA発現パターンが示され、使用した組織、RNA、マイクロアレイの運用、得られたデータの解析のすべてにおいて質の高いものであることが確認された。腎癌組織特異的に発現上昇を認めたmiRNAを同定し、その機能解析を行った。同定されたmiRNAのうち、miR-629に注目した。臨床検体23例を用い、リアルタイム PCRで定量することで正常腎に比べて腎癌組織では3.90倍(1.84~12.4倍) ( $p < 0.001$ )に発現上昇していたことを明らかにした。

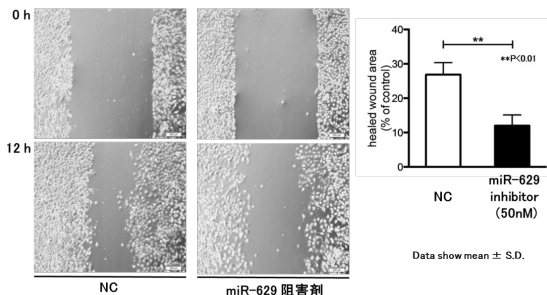
#### 正常腎と腎癌部位のmiR-629の発現



miR-629を高発現している腎癌細胞株である Caki-2を用い、miR-629阻害剤で細胞遊走能抑制効果、細胞浸潤抑制効果を認めたが、

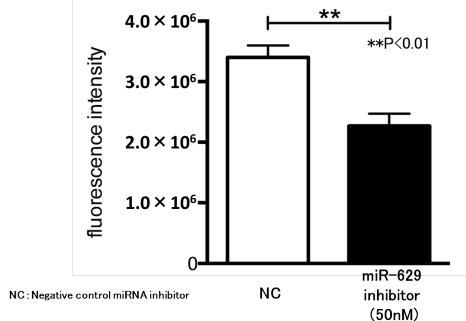
**miR-629阻害により  
遊走能は抑制された**

<Wound healing assay>



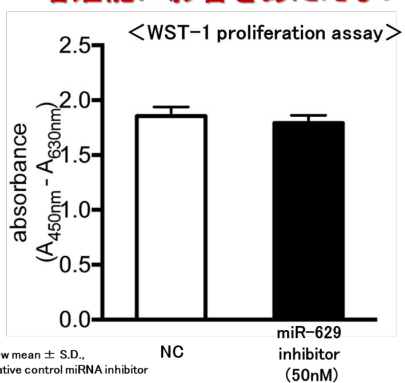
**miR-629阻害により  
浸潤能は抑制された**

<Cell invasion assay>



NC: Negative control miRNA inhibitor

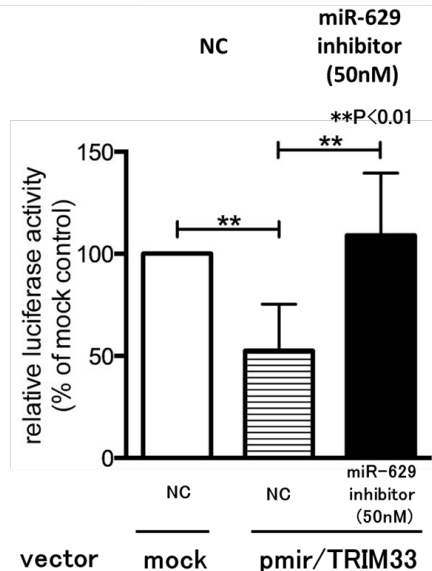
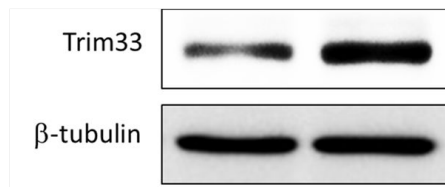
**miR-629の阻害は  
増殖能に影響をあたえない**



Data show mean ± S.D., NC: Negative control miRNA inhibitor

細胞増殖抑制効果は認めなかった。miRNA関連のデータベースを用いてmiR-629の標的候補の一つにSmad4を抑制するTrim33が予測された。miR-629阻害剤によりTrim33の発現の上昇を認め、ルシフェラーゼアッセイにより、

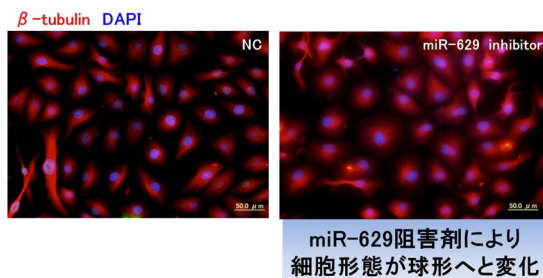
**miR-629はTrim33を標的としていた**



Data show mean ± S.D., NC: Negative control miRNA inhibitor

Trim33が標的遺伝子であることを確認した。更に、miR-629阻害剤により形態学的により上

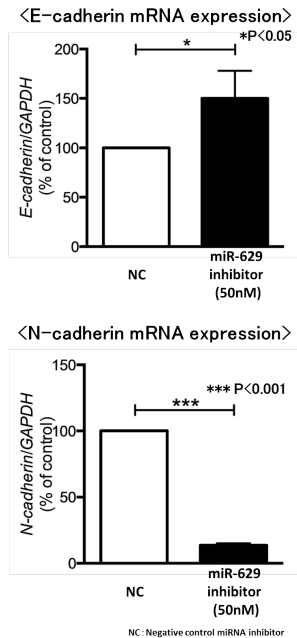
**miR-629阻害により  
上皮間葉転換(EMT)は抑制された**



皮に近い形態に変化したことから上皮間葉転換への関与が示唆された。

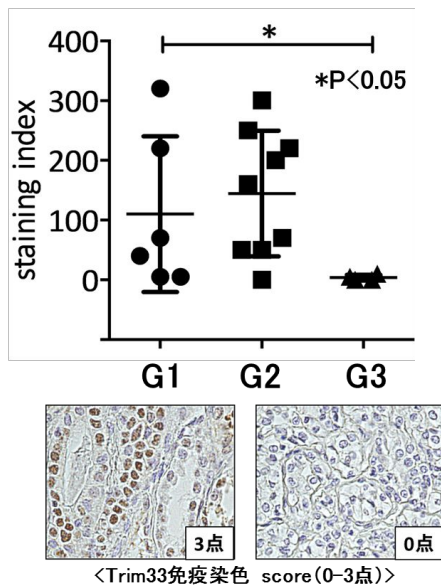
また、miR-629阻害剤によりE-cadherinの発現は上昇し、N-cadherinの発現が減少していることが確認され、形態学的変化のみではないことを確認できた。

**miR-629の阻害剤により  
E-cadherin発現は亢進し、  
N-cadherin発現は抑制された**



miR-629阻害剤はTGF- $\beta$ によるSmadの活性化をTrim33依存性に抑制した。さらに、免疫染色により臨床腎細胞癌検体においてTRIM33の発現が減少していることも明らかにした。こ

**Trim33の発現はgradeと相関していた**



これらの結果から、腎細胞癌ではmiR-629がTRIM33依存性にTGF- $\beta$ シグナル伝達経路を活性化することで上皮間葉転換に関与しており、バイオマーカーとしての臨床応用の可能性が期待されるだけでなく、miR-629を標的とした架橋型人工核酸が腎細胞癌の分子標的治療薬

となる可能性が示された。本研究成果により平成26年度基盤研究(C)における新たな課題「腎癌における血液中バイオマーカーとなるmiRNA網羅的探索と新規核酸治療薬の開発」へと研究を進展させることができ、本研究は意義のあるものであったと評価している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件) 掲載予定  
〔学会発表〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

植村 元秀 (UEMURA Motohide)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40631015