

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893113

研究課題名(和文) 淡明細胞型腎細胞癌におけるmiR-629の高発現と核酸創薬に向けた機能解析

研究課題名(英文) Analysis of highly expressed miR-629 in clear cell renal cell carcinoma

研究代表者

神宮司 健太郎 (Jingushi, Kentaro)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80707571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、ccRCCにおいてmiR-629が正常部位に比べ癌部で高発現していることを見出した。腎癌細胞株を用いた検討の結果、miR-629がTGF- $\beta$ シグナル抑制因子TRIM33のタンパク質量を減少させることにより、Smad2/3とSmad4の結合を促進させ、TGF- $\beta$ シグナル伝達経路を活性化させることが明らかとなった。組織免疫染色による検討の結果、TRIM33タンパク質量が正常腎部位に比べ腎腫瘍部位にて癌悪性化と共に減少していた。これらの結果よりmiR-629は、TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の活性化により、細胞遊走能・細胞浸潤能といった腎癌悪性化に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This is the first study showing significant upregulation of miR-629 in ccRCC specimens by quantitative real-time PCR analysis. We demonstrate that miR-629 downregulates TRIM33 expression, leading to the association of Smad2/3 and Smad4 and then to the promotion of the TGF $\beta$ /Smad signaling pathway. Moreover, we clarify that TRIM33 is significantly downregulated in ccRCC tissues compared with that in the adjacent noncancerous renal tissues, which seems to correlate with pathologic stages and grades. Our findings show that miR-629 is a potent regulator of the TGF $\beta$ /Smad signaling pathway and accelerates ccRCC cell motility and invasion.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：miR-629 TGF- $\beta$ シグナル伝達経路 ccRCC

1. 研究開始当初の背景

**(1) 淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)と miR-629**  
腎癌は成人腎において最も一般的な腫瘍であり、ccRCC は腎癌において最も多く発症する組織型である。いくつかの分子標的治療薬が ccRCC 患者に用いられているが、十分満足される治療効果には至っていない。そこで ccRCC における新規分子標的を探索する目的で miRNA に着目し、ccRCC 臨床検体を用いて miRNA-microarray 解析を行なった。その結果、正常腎と比べ癌部において高発現が認められる miR-629 を見出した。ccRCC 細胞株を用いた機能解析の結果、miR-629 は細胞遊走能及び細胞浸潤能の亢進に関わることが明らかになった。また、miR-629 の標的分子として Tripartite motif containing 33(TRIM33) を同定した。さらに、ccRCC 病理組織において、TRIM33 発現が病期及び悪性度に相関して低下していることを明らかにした。

**(2) TRIM33 による TGF- シグナル伝達経路の制御**

TRIM33 は TGF- シグナル伝達経路の抑制因子であり、癌抑制因子として報告されている (*J Clin Invest.* 2011;121(6):2361-70)。また、上皮間葉転換(EMT)においても重要な働きをもつことが報告されている (*EMBO Rep.* 2011;12(7):665-72) が、ccRCC における TRIM33 の生理的意義は明らかとなっていない。一方 TGF- シグナル伝達は、遊走能・浸潤能・EMT において重要なことが知られている。しかし、腎癌においてはその生理的意義は十分に明らかにされてはいない。申請者は既に miR-629 阻害剤が TGF- による ccRCC 細胞の間葉系様への形態変化を抑制することを明らかとしている。よって、miR-629 が TRIM33 の発現を抑制することによって TGF- シグナル伝達経路を調節している可能性が考えられる。TRIM33 に関して3つの機能が報告されている。

2. 研究の目的

淡明細胞型腎細胞癌(clear cell renal cell carcinoma: ccRCC)における新規標的分子を探索するために microRNA(miRNA)に着目し、ccRCC 臨床検体を用いて miRNA-microarray 解析を行なった。その結果、正常腎と比べ癌部において高発現が認められる miRNA として miR-629 を見出した。また miR-629 は TGF- シグナル伝達経路の抑制因子として報告されている TRIM33 を標的とし、細胞遊走能及び細胞浸潤能を亢進させることも突き止めた。さらに、ccRCC 臨床検体を用いた免疫組織化学染色により TRIM33 発現が病期及び悪性度依存性に有意に減少していることも明らかとした。そこで本申請研究は、ccRCC における miR-629 の生理的意義、シグナル解析を核酸創薬に向けて行なうことを目的としている。

3. 研究の方法

**miR-629 は ccRCC における TGF- シグナル伝達経路を調節するのか?**

(1)miR-629 阻害剤が Smad 活性に与える影響を検討する。(2)miR-629 阻害剤が TGF- による Smad2/3 及び Smad4 の核内移行に与える影響を、細胞免疫染色・細胞分画・免疫沈降法により評価する。(3)複数の ccRCC 細胞株を用いて、miR-629 発現量と TRIM33 発現量及び TGF- に対する Smad 活性化の相関性を検討する。

**miR-629 は ccRCC において上皮間葉転移(EMT)に関与しているのか?**

(1)miR-629 阻害剤が EMT 関連因子の発現に与える影響を、ウェスタンブロット法及びリアルタイム PCR 法により検討する。(2)TGF- による遊走能・浸潤能亢進作用への miR-629 阻害剤の効果を検討する。

4. 研究成果

**(1) miR-629 阻害剤による Smad 活性への影響の検討**

Caki-2細胞に miR-629 阻害剤をトランスフェクションすることにより、TGF- 依存性 Smad 活性が低下した。また、この効果は TRIM33 siRNA により減弱したことから、miR-629 は TRIM33 依存的に Smad 活性を促進させていることが示唆された(図1)。

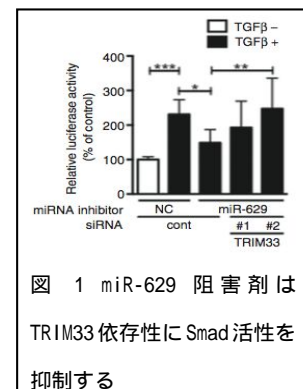


図1 miR-629 阻害剤は TRIM33 依存性に Smad 活性を抑制する

**(2) TGF- による Smad2/3 及び Smad4 の核内移行に対する miR-629 阻害剤の影響**

Caki-2細胞に miR-629 阻害剤をトランスフェクションすることにより、TGF- 依存性 Smad2/3 の核内移行が抑制された(図2)。また、免疫沈降法により miR-629 が TGF- 依存性 Smad2/3 と Smad4 の結合を促進することも明らかにした(図3)。

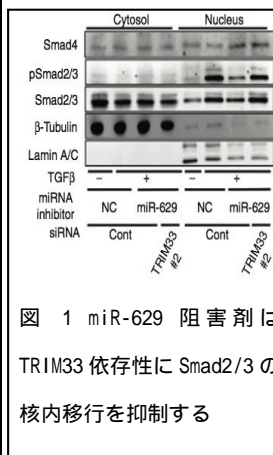


図2 miR-629 阻害剤は TRIM33 依存性に Smad2/3 の核内移行を抑制する

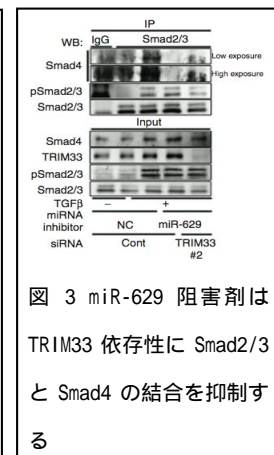


図3 miR-629 阻害剤は TRIM33 依存性に Smad2/3 と Smad4 の結合を抑制する

**(3) ccRCC における miR-629 及び TRIM33 発現量と TGF- $\beta$  による Smad 活性化の相関性有無の検討**

ccRCC 細胞株 (786-O、Caki-1、Caki-2、ACHN 細胞) において、miR-629 と TRIM33 発現量は逆相関の関係にあった。また、TGF- $\beta$  による Smad 活性の上昇は TRIM33 発現量と逆相関の関係にあったことから (図 4)、ccRCC 細胞株において miR-629 は、TRIM33 を介して TGF- $\beta$  /Smad シグナル伝達経路のシグナル強度を上昇させていることが示唆された。

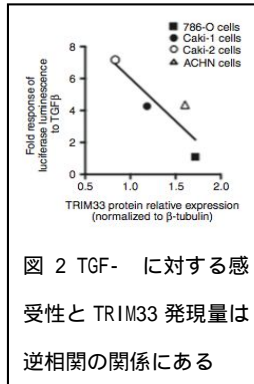


図 2 TGF- $\beta$  に対する感受性と TRIM33 発現量は逆相関の関係にある

**(4) miR-629 阻害剤による EMT 関連因子発現への影響**

TGF- $\beta$  によって EMT 関連因子 (N-cadherin、Slug、Snail、ZEB1) の発現上昇がみられ、間葉形様への形態変化がみられたが、miR-629 阻害剤によりこれら TGF- $\beta$  による効果は減弱した。一方、miR-629 mimic は、TGF- $\beta$  の効果 (EMT 関連因子の発現変化) を促進した (図 5)。

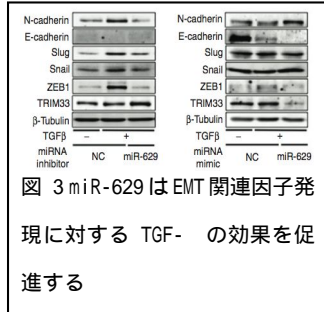


図 3 miR-629 は EMT 関連因子発現に対する TGF- $\beta$  の効果を促進する

**(5) TGF- $\beta$  による遊走能・浸潤能亢進作用への miR-629 阻害剤の影響**

TGF- $\beta$  によって遊走能・浸潤能亢進作用がみられたが、miR-629 阻害剤によりこれら TGF- $\beta$  による効果は減弱した。一方、miR-629 mimic は TGF- $\beta$  による遊走能・浸潤能亢進作用を促進した (図 6、図 7)。

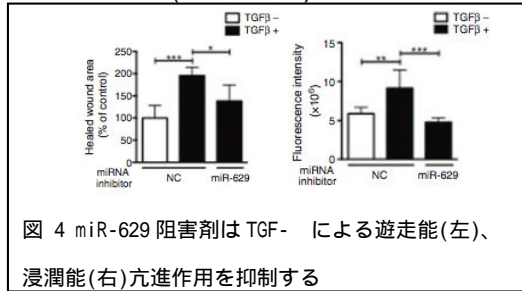


図 4 miR-629 阻害剤は TGF- $\beta$  による遊走能 (左)、浸潤能 (右) 亢進作用を抑制する

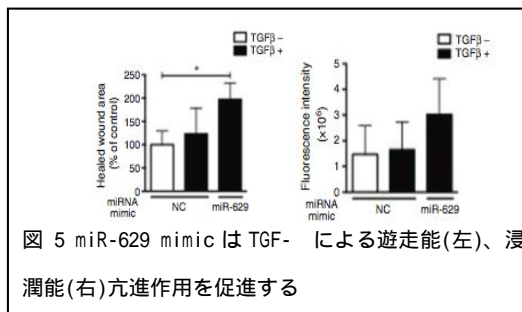


図 5 miR-629 mimic は TGF- $\beta$  による遊走能 (左)、浸潤能 (右) 亢進作用を促進する

**(6) TGF- $\beta$  による遊走能・浸潤能亢進作用への TRIM33 siRNA の影響**

miR-629 が TRIM33 を抑制することにより TGF- $\beta$  シグナル伝達経路を促進させ、遊走能・浸潤能を促進させている可能性が考えられる。そこで、TGF- $\beta$  による遊走能・浸潤能亢進作用に対する TRIM33 siRNA の効果を検討した。TRIM33 siRNA によって、TGF- $\beta$  による遊走能亢進作用は更に促進されたが、浸潤能亢進作用には影響はみられなかった (図 8)。

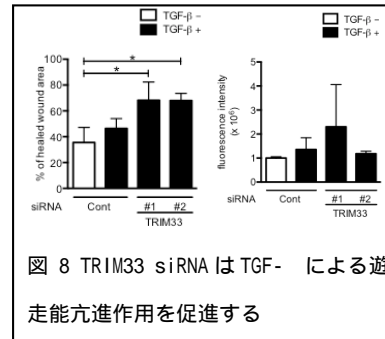


図 8 TRIM33 siRNA は TGF- $\beta$  による遊走能亢進作用を促進する

これらのことより、miR-629 は TRIM33 を介して遊走能を促進させるが、浸潤能に関しては別の標的因子を介して促進させている可能性が示唆された。

**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 1 件)

Kentaro Jingushi, Yuko Ueda, Kaori Kitae, Hiroaki Hase, Hiroshi Egawa, Ikumi Ohshio, Ryoji Kawakami, Yuri Kashiwagi, Yohei Tsukada, Takumi Kobayashi, Wataru Nakata, Kazutoshi Fujita, Motohide Uemura, Norio Nonomura, and Kazutake Tsujikawa. miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGF- $\beta$ /Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. Mol Cancer Res. 2015 Mar;13(3):565-74. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

学会名: 第 73 回日本癌学会学術総会  
発表者名: 神宮司 健太郎、江川 博、中田 渡、藤田和利、植村 元秀、野々村 祝夫、辻川 和文

演題: 淡明細胞型腎細胞癌において miR-629 は TRIM33 を介して TGF- $\beta$  /Smad シグナルを促進する

発表日: 2014 年 9 月 27 日

発表場所: パシフィコ横浜 (横浜)

学会名: AACR annual meeting 2014

発表者名: Kentaro Jingushi, Wataru Nakata, Yuko Ueda, Kaori Kitae, Kazutoshi Fujita, Motohide Uemura, Norio Nonomura, Kazutake Tsujikawa

演題: MiR-629 targets TRIM33 to promote TGF- $\beta$  /Smad signaling in clear cell renal

cell carcinoma

発表日：2014年4月9日

発表場所：San Diego Convention Center (San Diego)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b008/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

神宮司 健太郎 (Jingushi Kentaro)

研究者番号：80707571

(2)研究協力者

辻川 和丈 (Tsujikawa Kazutake)

野々村 祝夫 (Nonomura Norio)

植村 元秀 (Uemura Motohide)

藤田 和利 (Fujita Kazutoshi)