

論文内容の要旨

Analysis of expression patterns of microRNAs that are closely associated with renal carcinogenesis

(腎細胞癌に関連する microRNA 発現パターンの解析)

(塩見叡, 菅井有, 石田和之, 刑部光正, 露久保敬嗣, 加藤陽一郎, 高田亮, 小原航)

(Frontiers Oncology 平成 31 年 3 月掲載)

I. 研究目的

腎癌は悪性腫瘍全体の約 3%を占め、診断時に他臓器浸潤や転移がみられない場合には予後が良好である。一方で、腎癌の約 40%の症例はその進行（転移）により死亡し、他の泌尿器系腫瘍に比べ死亡率が高い。腎癌は組織型分類が重要で、組織型によって予後が推定され治療法が決定されるが、実際のところ組織型だけでは予後を推定する因子としては不十分である。近年では、腎癌で最も頻度の高い淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC, clear cell renal cell carcinoma)において様々な生物学的マーカーが報告されているが確立されたものは認められず、腎癌における新たな予後予測因子の探索は現在も進められている。

microRNA(miRNA)は遺伝子の発現や細胞周期関連タンパクの調節・制御に関わる小さな RNA 配列である。癌遺伝子や癌抑制遺伝子のメッセンジャーRNA に結合することでその作用を調節している。miRNA には癌促進遺伝子的機能を有する onco miRNA と、癌抑制遺伝子的機能を有する suppressor miRNA の 2つが存在し、様々な癌腫において両者の存在が同定されつつある。さらに、近年では miRNA の発現異常が癌の予後、ステージ、転移や再発に関連するとの報告もみられる。従って、miRNA は予後を推測するだけでなく、再発を予測する分子生物学的マーカーとして治療選択にも関わる可能性がある。

近年では、腎癌における miRNA を含む分子生物学的マーカーの報告が認められ、miRNA の網羅的解析も行われている。しかし、miRNA の網羅的解析データは、解析に用いられたプラットフォームの違いや患者背景、症例数などにより必ずしも同様の結果は得られていない。一方、単一の miRNA の発現異常については、淡明細胞型腎細胞癌において予後と関連しているとの報告が相次いでいる。しかし、個別の miRNA の発現状況が再発を予測し得るかについては明らかになっていない。

本研究は、1) 正常腎と比較した腎細胞癌における miRNA の発現状況を明らかにする、2) miRNA の発現異常と異時性転移など臨床経過との関連を明らかにする、3) 個別の miRNA の発現状況が予後予測の生物学的マーカーになる可能性について検討する、ことを目的とした。

II. 研究対象ならび方法

1. 対象

2011～2017 年度に岩手医科大学附属病院泌尿器科で腎摘除術を施行し、病理学的に淡明細胞型腎細胞癌と診断され、術後化学療法を施行していない 96 例を対象とした。

2. 検体収集

摘出された検体より採取した新鮮凍結検体(腫瘍部, 非腫瘍部)を miRNA 解析に用い、またホルマリン固定後の検体より新鮮凍結検体採取部位の断面を含む病理組織標本を

作製した。

3. miRNA 解析方法

腎癌にて報告のある miRNA 16 種類 (Onco miRNA: miR-155, miR-122, miR-185, miR-106b, miR-106a, miR-21, miR-34b, miR-210, Suppressor miRNA: miR-200c, miR-30a-5p, miR-218, miR-429, miR-200a, miR-200b, miR-141, miR-135a) を使用した。非腫瘍部と腫瘍部の凍結標本を用いて mirVana™ miRNA Isolation kit にて total RNA を抽出した。抽出した RNA から TaqMan® microRNA RT kit にて cDNA (complementary DNA) を作成し、cDNA に対しリアルタイム PCR 法を用い非腫瘍部に対する腫瘍部の相対定量解析を行った。

4. データの解析

- 1) 各 miRNA の発現量を基に、階層的層別化解析を行った。
- 2) 得られた各 subgroup と臨床病理所見、予後 (異時性転移) との関連を検討した。
- 3) それぞれの subgroup を特徴づける miRNA の発現状況を解析した。
- 4) miRNA の個別化解析を行い発現異常と予後との関連を検討した。

5. 統計解析

Fisher exact test; Kruskal-Wallis; Tukey-Kramer method, Bartlett test; Cox proportional hazards model を用いた。

III. 研究結果

1. 淡明細胞型腎細胞癌は 16 種類の miRNA の発現量に基づいた網羅的層別化解析により 3 つの subgroup に分類され、subgroup 3 は subgroup 1, 2 よりも異時性に転移する頻度が高かった。
2. Fuhrman grade, 腫瘍壊死の有無, 静脈浸潤の有無, pT 因子とで行った多変量解析において、subgroup 3 は術後の異時性再発に最も関連していた。
3. Subgroup 3 は subgroup 1, subgroup 2 と比較して suppressor miRNA である miR-135a の発現量が有意に低下していた。
4. 各 miRNA の発現量を個別化解析したところ、miR-135a の発現量の低下が最も術後異時性再発に関連していた。また、Fuhrman grade, 腫瘍壊死の有無, 静脈浸潤の有無, pT 因子とで行った多変量解析において、miR-135a の発現量の低下は最も優れた術後再発を予測する因子であった。

IV. 結 語

ccRCC は miRNA による階層的層別化解析により subgroup 1~3 に分類された。そのうち、subgroup 3 は miR-135a の発現量低下によって特徴づけられ、他の臨床病理学的因子とで行った多変量解析において最も優れた予後予測因子であった。また、ccRCC の摘出検体における miR-135a の発現量低下は、術後の異時性転移の予測因子となることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 西塚 哲 (医歯薬総合研究所：医療開発研究部門)

副査 講師 刑部 光正 (病理診断学講座)

副査 講師 加藤 陽一郎 (泌尿器科学講座)

腎細胞癌では高率に転移が起きるが、組織分類のみによる治療に加えて分子レベルでの治療方針の指標が切望されていた。本研究論文では、腎癌との関連が報告されている 16 種類のマイクロ RNA (miRNA) に着目し、腎細胞癌 (明細胞癌) 検体を用いて、それらの発現パターンをもとに臨床病理学的因子との関連を解析し、さらに予後予測マーカーの同定を試みた。96 例の腎細胞癌検体における 16 種類の miRNA 発現パターンについて階層クラスタリングを行い 3 つのサブグループに分類した。サブグループ 3 では他の 2 つと比較して高率に異時性の転移が起こっており、tumor suppressor miRNA である miRNA-135a-5p の発現が有意に低下していた。他の臨床病理学的因子との比較においても、miRNA135a-5p の発現低下は術後再発を予測する優れたマーカーであることが示唆された。

本研究論文は、再発の制御が重要である腎細胞癌の治療方針に新たな知見をもたらす可能性のある有意義な研究である。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

採取した検体の病理学的所見、階層クラスタリング、多変量解析などの研究手法、腎細胞癌治療法へ与える影響などについて諮問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) Case of complete response to neoadjuvant therapy using nivolumab in a patient with metastatic renal cell carcinoma (nivolumab による術前化学療法により完全奏功を示した転移性腎細胞癌の 1 例) (五十嵐大樹 他 9 名と共著)
International Journal of Urology, 25 巻, (2018) :p630-632.
- 2) 悪性リンパ腫を合併した精索脂肪肉腫の 1 例 (塩見 叡 他 9 名と共著)
泌尿器外科, 31 巻, 3 号 (2018) : p329-332.