

# 学位論文要約

## Identification of microRNAs involved in resistance to sunitinib in renal cell carcinoma cells

(腎細胞癌細胞におけるスニチニブ抵抗性に関するmicroRNAの同定)

スニチニブは、進行性腎細胞癌患者に対する第一選択の治療薬として用いられ、血管内皮増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することで、血管新生、腫瘍細胞増殖を抑制している。しかし、無増悪生存期間は11ヶ月と臨床上の効果は限られている。microRNAは、標的mRNAの非翻訳領域に結合することで翻訳、遺伝子発現を制御し、発癌や癌の悪性化進展に関与している。本研究ではスニチニブ耐性腎癌細胞株を作製し、スニチニブ耐性を規定するmicroRNAを検索した。

### 方法

腎細胞癌細胞株 (ACHN、RCC23) をスニチニブ含有培養液で継続して培養、徐々にスニチニブ濃度を上げ、各細胞の50% Inhibitory Concentration (IC50) でも安定して増殖するスニチニブ耐性腎癌細胞株 (SR-ACHN、SR-RCC23) を作製した。親株とスニチニブ耐性腎癌細胞株に対して、それぞれmicroarray解析を施行し、2種のスニチニブ耐性腎癌細胞株で共通して上昇または低下しているmicroRNAを同定、定量リアルタイムPCRを行い検証した。また、それらmicroRNAのターゲットmRNAやターゲット分子経路を、バイオインフォルマティクスツールを用いて検索した。

### 結果

細胞毒性試験の結果、ACHNとRCC23のIC50はそれぞれ10  $\mu$ M、14  $\mu$ Mであった。細胞毒性試験においてSR-ACHN、SR-RCC23は、ACHN、RCC23と比較しスニチニブに対して有意に高い耐性を示した。microarray解析の結果、SR-ACHN、SR-RCC23において、それぞれの親株と比較し発現量が上昇または低下したmicroRNAの内、共通して発現量が上昇したmicroRNAを5種類、低下したmicroRNAを4種類同定した。これら9種類のmicroRNAに対して定量リアルタイムPCRを行い、発現量が上昇した5種類のmicroRNAの内3種類、発現量が低下した4種類のmicroRNAでは4種類すべてで、microarray解析の結果と同様に発現量が上昇または低下していることを確認した。

## 考 察

これまでもmicroRNAとスニチニブ耐性に関係する報告は見られたが、いずれも臨床検体よりRNAを抽出し、その後のスニチニブ治療の治療成績により層別化したうえで、microRNAの発現量を比較したものであり、言わばスニチニブ治療の効果予測と考えられるmicroRNAが同定されてきた。一方、本研究ではスニチニブ耐性細胞株を作製し用いることで、スニチニブ耐性に至る過程で起きるmicroRNA発現の変化を観察した。また、細胞株を用いた検証であるため、スニチニブの主な作用である血管新生阻害作用の影響を受けることなく、スニチニブの細胞直接傷害作用とそれに関わるmicroRNAを観察できている。推定ターゲット遺伝子検索では、腎癌と関連の強い遺伝子として、microRNA-4430とPTEN、microRNA-18a-5pとHIF1 $\alpha$ が示された。Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1 $\alpha$ やPhosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN)は腎細胞癌の主要な分子経路であるphosphatidylinositol 3-kinase-Akt (PI3K-Akt) signaling pathwayと関係することから、microRNA-4430の上昇によるPTENの発現低下、microRNA-18a-5pの低下によるHIF1 $\alpha$ の発現上昇がスニチニブ耐性に関与する可能性が考えられた。Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway解析では、microRNA-18a-5pはリソソーム活性をターゲットとしたエンドサイトーシス経路と関係することが示唆された。諸家の報告ではスニチニブ存在下で継続して培養された細胞は、肥大化し、内部のリソソーム容量が増加、多量のスニチニブをリソソーム内に取り込むことでスニチニブ耐性を獲得することが報告されている。著者らの作製した2種のスニチニブ耐性腎癌細胞株においてもそれぞれの親株と比較し細胞が肥大化し、内部に黄色調の顆粒を多く含んでおり、同様の変化を生じている可能性が考えられた。

## 結 論

スニチニブ耐性腎癌細胞株SR-ACHN、SR-RCC23を作製した。microarray解析、定量リアルタイムPCRを行い、親株と比較しスニチニブ耐性腎癌細胞株において上昇または低下しているmicroRNAを7種類同定した。これらのmicroRNAを調節することによるスニチニブ耐性の改善が期待される。