

博士論文

長鎖非コード RNA HOTAIR は IGFBP2 を介して腎癌進展に寄与する

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座泌尿器科学分野

方山 博路

目次

- I. 要約
- II. 研究背景
- III. 研究目的
- IV. 研究方法
- V. 研究結果
- VI. 考察
- VII. 結論
- VIII. 謝辭
- IX. 参考文献
- X. 図
- XI. 表
- XII. 図説明

略語集

BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
FPKM	fragments per kilobase of exon per million fragments mapped
HOTAIR	HOX Antisense Intergenic RNA
H3K27	histone H3 Lys-27
HE	hematoxylin eosin
IHC	immunohistochemistry
IGFBP2	Insulin growth factor-binding protein 2
ISH	<i>In situ</i> hybridization
lncRNA	long non-coding RNA
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ncRNA	Non-coding RNA
NOG	NOD/Shi-scid-IL2R ^{nu} l

PRC 2 polycomb repressive complex 2

RCC renal cell carcinoma

TCGA the cancer genome atlas

I 要約

タンパク質をコードしない非コード RNA は転写や翻訳に関与する重要な分子であり、その臨床的意義が注目されている。長鎖非コード RNA に属する HOX Antisense Intergenic RNA (HOTAIR) は数多くの癌種で転移・予後との相関が報告されているが、その詳細な機序については不明な点が多い。私の研究室では、HOTAIR 高発現症例は胃癌・肺癌において予後が悪いことを報告した。

本研究では、腎細胞癌における HOTAIR の役割を検討した。宮城県立がんセンターで手術を行った 64 例の淡明細胞型腎癌患者の腫瘍部・周囲組織を用いて、real-time PCR 法により HOTAIR の発現を調べ、臨床データとの関連を検討した結果、HOTAIR 発現は核異型度、静脈浸潤、リンパ節転移、肺転移、臨床病期と相関し、HOTAIR 高発現群は予後不良であった。さらに、The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータを用い、HOTAIR 発現が高いと予後不良であることが外部コホートにおいても確認できた。以上の結果から、腎癌において HOTAIR は転移、予後に関わることが示唆された。

HOTAIR の腎癌における役割をさらに解析するために、ヒト腎癌細胞株を用いて、HOTAIR 過剰発現および発現抑制株を作成し、遊走能を評価したところ、

HOTAIR は遊走能を亢進することが分かった。HOTAIR 過剰発現株と対照となる細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行い、HOTAIR による遊走能亢進の原因となる標的遺伝子を探索した結果、HOTAIR 過剰発現細胞において Insulin growth factor binding protein 2 (IGFBP2) 発現が著明に亢進していることがわかった。PCR および Western blotting でも同様の結果を確認し、臨床検体でも HOTAIR 発現と IGFBP2 発現は有意に相関していた。siRNA を用い IGFBP2 を抑制すると、HOTAIR によって増強した遊走能が低下することを確認した。

腎細胞癌の標本において、低異型度と高異型度が混在する腫瘍部を連続切片で評価したところ (HOTAIR : *in situ* hybridization, IGFBP2 : 免疫染色)、高異型度の部分では両者の発現が認められたが、低異型度の部分ではどちらも低発現であり、両者は共局在していることが示唆された。さらに、IGFBP2 の高発現症例は予後不良であることが臨床検体および TCGA で示された。HOTAIR および IGFBP2 の両者が共に高発現な群は最も予後が不良であった。

以上の結果から、HOTAIR は IGFBP2 発現亢進を介して腎がん進展に寄与することが示唆された。

II. 研究背景

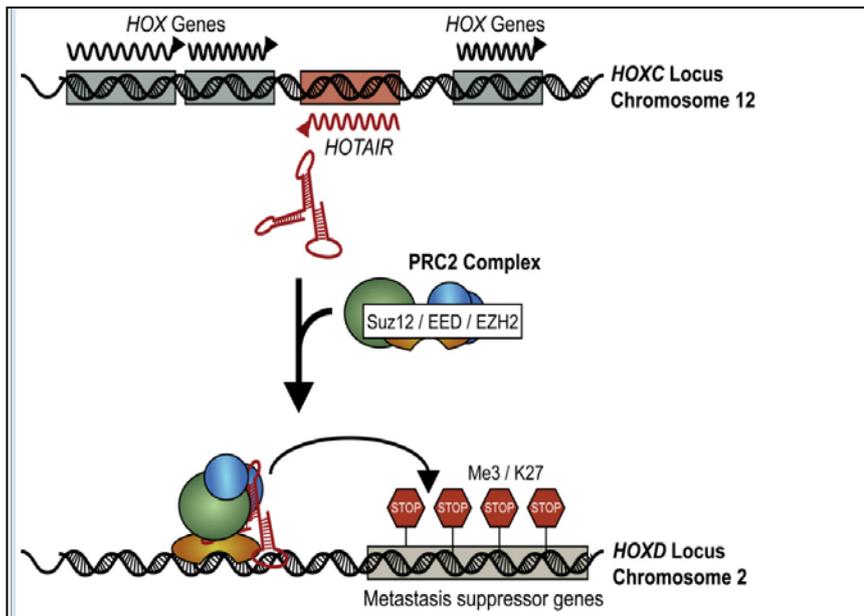
腎細胞癌 (Renal cell carcinoma, RCC) は全悪性腫瘍の約 3% を占めており、泌尿器科癌の中でも予後不良な癌である [1]。腎癌と診断された患者の 3 分の 1 は遠隔転移を伴い、根治的手術を受けた患者の 20-30% は術後に転移や再発を認める [2]。転移性 RCC の予後は生存期間中央値がおおよそ 13 か月と予後不良である [3]。転移性 RCC の治療に関しては、近年分子標的治療薬が導入され、サイトカイン療法しか選択肢がなかった時代より生存率は改善した。しかし、耐性化などの問題で最終的に死に至ることが避けられないのが現状であり、転移性腎癌に対する新たな標的の同定および治療戦略が必要である [4]。

近年、タンパク質をコードしている遺伝子は全染色体の DNA のわずか 2% であるが、それを大幅に上回るゲノム上の約 43% の DNA が RNA へと転写されていることが報告された [5, 6]。これらのタンパクに翻訳されない ncRNA (non-coding RNA) は、RNA そのままの形で機能を果たし、遺伝子発現の様々な段階で重要な制御因子として機能することが明らかになってきた。ncRNA のうち、20 数塩基程の短い miRNA (micro RNA) は遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合し転写を抑制して遺伝子発現を制御することが報告され [7]、さらには細胞の分化や増殖、免疫、発癌などの多様な生命現象に関与していることが明らかになっ

た[8, 9]。一方、マイクロアレイや次世代シーケンサーによる遺伝子解析技術により、既知のタンパクコード遺伝子とは重なり合わずに遺伝子間領域に存在する 100~200 塩基以上の高分子の lncRNA(long non-coding RNA)が多数同定された[10]。lncRNA はタンパク質と複合体を形成し、クロマチン制御を介して遺伝子発現を調節する機能をもつことが知られているが、その詳細な機序はまだ不明な点が多い。一方、癌の増殖・転移・進展に関わる lncRNA が近年多数同定されている [11]。lncRNA は正常組織でも多様な細胞機能の調節を行っており、特定の臓器や特定の癌種で発現していることから、新規の予後予測マーカーになるのではないかと着目されている。

HOTAIR は Homeobox C gene (HOXC)クラスター遺伝子領域で発現している全長約 2.2kb の lncRNA として発見され、HOXC クラスターの非コード領域から転写され、その転写産物は PRC2 (polycomb repressive complex) と結合し、HOXD クラスター付近において H3K27 のトリメチル化を促進し、多くの遺伝子に対して転写抑制効果を示すといわれている[11, 12]。

近年、HOTAIR の発現が乳癌[13]、直腸癌[14]、子宮頸癌[15]、非小細胞肺癌[16]、胃癌[17]など様々な癌種の転移や予後不良と関連することが報告されてい



Working model of the role of HOTAIR.

(Gibb et al. Molecular Cancer 2011)

る。しかし、HOTAIR が
 どのようなメカニズムで
 癌の転移や予後に関わる
 のかは不明な点が多く、
 HOTAIR の下流遺伝子と
 して多くの分子が同定さ

れている。乳がんにおいては

PRC2 に依存して転移、浸潤

を HOTAIR が増強することが報告されている[13]。

食道癌での報告では、HOTAIR は WIF-1 発現を抑制し、Wnt/ β -catenin シグナル経路を活性化することで遊走能を亢進する[18]。子宮頸癌では、HOTAIR は Notch pathway を標的にして腫瘍増殖と浸潤を促進する[15]。しかし、RCC においては HOTAIR がどのような作用機序をもつのかは不明な点が多い。そこで、私は RCC における HOTAIR の発現とその特性について研究を行った。

研究の過程で、HOTAIR の発現は予後と相関し、癌の移動能に関わることを示唆された。そこで、HOTAIR がどのような機序で移動能に関わるのか調査す

るため網羅的検索を行い、HOTAIR 過剰発現株でコントロールに対して発現が亢進している Insulin growth factor binding protein 2 (IGFBP2)に着目した。

インスリン様成長因子結合蛋白 2 型 (IGFBP2)はインスリン様成長因子 (IGF) に特異的に結合する蛋白の 1 種である。IGF 結合タンパクファミリーは全部で 6 種類あり、IGF 1 および IGF2 と結合することで IGF の代謝活性を調節していることが知られている。近年、IGFBP2 は多くの癌種において、腫瘍細胞および血清中で発現が亢進していることが報告されている[19-21]。神経膠腫細胞において、IGFBP2 は IGF 結合経路とは独立して oncogenic に働き、Matrix metalloprotease 2 (MMP2) の転写を亢進することで癌増殖や浸潤に関わることも報告されている[22]。IGFBP2 はインテグリン α と結合し、その下流経路を活性化させることで細胞の運動性を高めることも報告されている[23]。外因性の IGFBP2 は、インテグリン B1 シグナルによって活性化される ERK 経路を通じて神経膠腫細胞の増殖能、浸潤能を高める[24]。このように、IGFBP2 が IGF と結合するだけでなく、様々な経路で oncogenic な作用を持つことが分かってきた。しかし、RCC において、IGFBP2 がどのように働き、腎癌細胞で IGFBP2 がどのように調節されているかは明らかでない。

Ⅲ. 研究目的

腎癌における HOTAIR の発現とその役割を、臨床情報との関連性の検討および分子生物学的アプローチによる細胞株を用いた検討から明らかにする。

Ⅳ. 研究方法

① 臨床検体

対象は 2007 年 4 月から 2015 年 3 月までに宮城県立がんセンター泌尿器科で手術を行い、病理医により淡明細胞型腎細胞癌と診断された 64 例である。切除後に癌部の組織と非癌部の腎組織を摘出し、Tissue Bank センターにて速やかに-80℃で凍結保存し、各検体は匿名化した番号を付して管理された。いずれも術前加療（化学療法・放射線治療）のない初回治療例であり、TNM 分類・病期分類は腎癌取り扱い規約第 4 版に準じて評価した。

なお本研究における検体の使用は、宮城県立病院機構宮城県立がんセンター臨床研究倫理委員会において「25-54：泌尿器領域癌の診断マーカー及び悪性化に関与する分子の検索」（2013 年 9 月 6 日）として承認を受け、術前に医師より各患者に検体の保存と管理、各研究目的への使用と個人に特定する情報の守秘について説明し、書面にて同意を得ている。

② RNA 抽出、cDNA 作成

凍結検体からの全 RNA 抽出には ISOGENE (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用い、細胞株からの抽出には mirVana miRNA isolation Kit (Ambion, Life Technologies, CA) を用いた。抽出後にアガロースゲルを用いた電気泳動にて明瞭な 28S および 18SRNA バンドを検出し、RNA の品質を確認した。RNA 濃度は NanoDrop ND-1000 Spectorophotometer (NanoDrop Technologies, DE) にて測定し、各々 1 μ g の全 RNA を PrimeScript[®] 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Bio, Siga, Japan) を用いて、cDNA へと逆転写反応を行った。

③ real-time PCR

各臨床検体と各細胞株における HOTAIR の発現は GAPDH を内因性コントロールとした比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法)³¹⁾ を用いた real-time PCR によって測定した。

Real-time PCR は LightCycler 480 system (Roche Applied Science, IN) にて測定し、反応には LightCycler 480 Probes Master kit (Roche Applied Science) を用いた。サーマルサイクリングは反応液との活性化を 95 $^{\circ}$ C 2 分、PCR45 回増幅 (熱変性:95 $^{\circ}$ C 15 秒間、アニーリング・伸長反応:60 $^{\circ}$ C 1 分間) で行った。プライマーの配列を表 1 に示す。

また同患者における癌部での HOTAIR 発現値を非癌部腎組織での HOTAIR の発現値と比較した値（癌部/非癌部）を相対的発現値として解析した。疾患特異的生存をアウトカムとした ROC カーブに基づき、カットオフ値を 1.2 とした。1.2 以上の群を高発現群、1.2 より低い群を低発現群として 2 群に分類した。

④ TCGA データの解析

TCGA Data Portal (<https://gdc-portal.nci.nih.gov/>)からデータをダウンロードし、521 例の淡明細胞型腎細胞癌と診断された患者を同定した。HOTAIR 発現と予後を解析した。HOTAIR の発現量は、FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)を用いて定量した。腫瘍部の HOTAIR が FPKM 値で 0.3 より低い群を低発現群、0.3 以上の群を高発現群として 2 群に分類した。疾患特異的生存率の算定には Kaplan-Meier 法を用い、有意差の検定は Log-rank test を用いた。IGFBP2 の発現については FPKM のカットオフ値を 6 として同様の解析を行った。

⑤ 使用細胞株

3 種類のヒト淡明細胞型腎細胞癌細胞株 ACHN, A498, Caki-1 (JCRB 細胞バンクより分与) を用いた。レトロウイルスパッケージング細胞株 (Platinum-A

細胞) は東京大学医科学研究所北村俊雄教授より供与された。細胞培養は 10% FBS と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco/Life technologies, Carlsbad, USA) を用い、5% CO₂、37°C の加湿環境下で継代培養した。保存は -80°C にて凍結保存した。

⑥ 組み換えプラスミドベクターの作成

ヒト HOTAIR の coding region はヒト HOTAIR (addgene Cambridge, MA) の全長を cDNA の鋳型として両端に EcoRI の制限酵素サイトを持った DNA を PCR 法により増幅し、FastDigest®EcoRI (Thermo Fisher Scientific, MA) にて制限処理後、pBabe-hygro-Vector のマルチクローニングサイトにサブクローニングし、組み換えベクター (pBabe-hygro HOTAIR) を作製した。

⑦ HOTAIR 安定強制発現株の樹立

腎癌細胞株 ACHN に pBabe-hygro HOTAIR を以下の方法で導入した。Opti-MEM I (Gibco/Life technologies Co.) 600 μL に HOTAIR 発現ベクター DNA を 10 μg を加え、FuGENE-6 (Roche Applied Science) 20 μL を添加混合後に、レトロウィルスパッケージング細胞株 (Platinum-A 細胞) の培養液に滴下した。48 時間 (37°C で 24 時間、32°C で 24 時間) 培養後にウィルス液を回収し、

0.45 μ m フィルターにて濾過して ACHN 細胞株へ滴下した。32 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後にハイグロマイシンで選別し、HOTAIR 安定強制発現株を樹立した。同様に HOTAIR の cDNA を含まない pBabe-hygro Vector (Empty vector) を ACHN 細胞株に遺伝子導入してコントロール細胞株を作製した。作製した各々の細胞株からの全 RNA を抽出し cDNA 化の後、real-time PCR にて HOTAIR の発現を確認した。同様の操作を、別の腎癌細胞株 A498 にも行った。

⑧ siRNA を用いた RNA 干渉法による HOTAIR,IGFBP2 の発現抑制

本研究で用いた腎癌細胞株の中で最も HOTAIR 発現が亢進していた細胞株 Caki-1 を用いて、HOTAIR に対する 2 種類の siRNA si-HOTAIR #1 (FLJ41747HSSS160170), si-HOTAIR #2 (FLJ41747HSSS160171), Negative control として、si-NC (12935-300) 、(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いた。siRNA はすべて 12.5 nM の濃度で Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Life Technologies) を用いて細胞に導入した。導入後、48 時間経過後にノックダウン効率を real-time PCR を用いて確認した。同様に IGFBP2 の抑制を ACHN-HOTAIR、A498-HOTAIR に対して行った。使用した siRNA は、si-IGFBP2 #1 (HSS142627) および si-IGFBP1 #2 (HSS142629)の 2 種類で、

si-NC との比較で IGFBP2 発現が抑制されていることを real-time PCR および Western blotting で確認した。

⑨ 細胞増殖能の解析 (MTT Assay)

細胞増殖能は Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を添付文書通りに用いて評価した。96 ウェルプレート各ウェルに 1×10^3 個の細胞を蒔き、5%CO₂、37°C の加湿環境下で 0、24、48、72、96 時間培養した。各々培養後に試薬を添加し 2 時間培養し、吸光度測定は VersaMax (Molecular Devices, CA) を用いて、450 nm の吸光度で測定した。

⑩ 細胞遊走能の解析 (Two chamber Assay / Scratch Assay)

(1) Two chamber Assay

24 ウェルプレートに 10%FBS を含む DMEM を入れ、その上に 8 μ m pore size の Cell Culture Insert (BD Bioscience) を設置した。インサート内に無血清 DMEM で調整した 5×10^4 個の細胞浮遊液を蒔き、5% CO₂、37°C の加湿環境下で 48 時間培養した。培養後にインサートの内側の細胞を除去、洗浄し、Diff-Quik 染色液 (sysmex, Kobe, Japan) を用いて染色した。その後、インサート

のメンブレンを切り出し、プレパラートに封入した。メンブレン外側に遊走した細胞数をカウントした。

(2) Scratch Assay

各細胞を 24 ウェルプレートに蒔き、ほぼコンフルエントの状態ですら 3 時間 5 μ g/ml のマイトマイシン処理後に 200 μ L 用のピペットチップの先端で直線状に引っかき、培養細胞を剥離した。培養液を FBS を含まない DMEM に交換し 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C の加湿環境下で 24 時間培養した。顕微鏡下で剥離した間隙への遊走細胞の占有面積を観察計測した。

⑪ 免疫不全マウス NOG マウスを用いた造腫瘍能試験

動物実験は、宮城県立がんセンター動物実験施設管理委員会の承認を受けて行った。免疫不全マウスである NOD/Shi-scid-IL2R γ null (NOG) マウス (実験動物中央研究所、神奈川) のメス 6 週齢を使用した。飼育室への搬入後 1 週間を環境適応期間として飼育した後に実験に使用した。ACHN-HOTAIR とコントロール (Empty Vector) のそれぞれ 1 \times 10⁴個を 100 μ L PBS (phosphate buffered saline) で調整し、マウスの背部に皮下注射を行って移植した。移植後のマウスは週に 1 回腫瘍径を測定した。腫瘍体積(V) は、 $V \text{ (mm}^3\text{)} = [\text{長径}] \times [\text{短径}]^2 \times 1/2$

の近似式として算出した。

⑫ 尾静注による肺転移モデル、腎被膜移植による肺転移モデルの作成

皮下移植モデルと同様に 6 週齢のメス NOG マウスを準備し、東北大学動物実験専門委員会の承認と規定に遵守して行われた。ACHN 細胞株の HOTAIR 強制発現株とコントロール株の各細胞 1×10^4 個を 100 μ L PBS で調整し、各細胞株につき 4 匹のマウスに癌細胞を尾静脈注射で移植した。24 週間飼育後に肺転移を評価した。肺を摘出し、腫瘍形成の有無と転移巣数を確認し、4%パラホルムアルデヒドに固定後、パラフィン包埋した。包埋した切除標本から 2 μ m の薄切片を作製し、キシレンで脱パラフィン処理、エタノールで脱水処理を行い、HE (hematoxylin eosin) 染色を行った。同様に ACHN-HOTAIR およびコントロール細胞 1×10^5 個を 20 μ L マトリゲルで調整し、マウスの腎被膜に移植した移植してから 14 週後に肺転移を尾静注モデルと同様に評価した。

⑬ ウェスタンブロット法

細胞を PBS で一回洗浄したのち、氷冷した細胞溶解液 (20 mM Tris、2.5 mM Sodium Pyrophosphate、150 mM NaCl、1 mM Disodium β -Glycerophosphate Pentahydrate、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid、1 mM

14-bis[(acetyloxy) methyl] ester、1% Triton-X) に懸濁後、5分超音波処理を行った。処理後、10,000 x g で遠心を行い、上清を解析に用いた。上清のタンパク量は、protein assay kit (Bio Rad、USA) を用いて測定し、各サンプルあたり 20 μ g のタンパクを SDS-loading buffer (100 mM Tris-Cl pH 6.8、4% sodium dodecyl sulfate、0.2% bromophenol blue、20% glycerol、2% β -mercaptoethanol) に混合し、100°C で 5 分熱処理し、SDS-PAGE に用いた。SDS-PAGE 用のゲルは、和光純薬製のスーパーセップ TM エース (5-20%) を用いた。泳動後、分離したタンパクは 20%メタノール含有のトリスグリシン緩衝液を使用して 0.45 μ m の PVDF 膜 (Millipore、USA) へ転写した。PVDF 膜は、0.1%Tween 含有 TBS (T-TBS) で希釈した 5%BSA (ウシ血清アルブミン、抗リン酸化タンパク質の抗体のみ) もしくは 5%脱脂粉乳を用いて一時間ブロッキングした後、4 °C、12 時間以上振とうして一次抗体と反応させた。Cell signaling 社の抗体は 0.1%Tween 含有 TBS (T-TBS) で希釈した 5%BSA で希釈し、その他の抗体は T-TBS で希釈した。一次抗体はすべて 1/1,000 に希釈して使用した。反応後、PVDF 膜を三回洗浄した後、horseradish peroxidase 標識抗ウサギあるいは抗マウス IgG 抗体 (いずれも Cell signaling) を二次抗体

として 0.5%脱脂粉乳で 1/1,000 に希釈し、室温で一時間振とうし PVDF 膜と反応させた。再度 T-TBS で三回洗浄し、West Pico chemiluminescent substrate kit (Pierce、USA) を反応させた。発光反応を CCD カメラ (Fuji film、Japan) で検出し、得られたバンドは ImageJ を用いて定量化を行った。使用した抗体を以下に示す。α-tubulin 抗体 : Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, B-5-1-2 IGFBP2 抗体 : (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, C-18).

⑭ マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

HOTAIR 過剰発現株とコントロール株との遺伝子発現分布の比較は、ACHN 細胞を用いて行った。ACHN 細胞からの RNA の抽出は、RNeasy Mini Kits (Qiagen、カナダ) を用いて行った。また、マイクロアレイの解析はアジレント社の推奨方法に従い、SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K Microarray Kits (Agilent Technologies) 及び Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて行った。ハイブリダイゼーション後、Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) によりスライド上の蛍光シグナルを検出した。また、得られたシグナルは、Agilent Feature Extraction

Software (Agilent Technologies) によって数値化し、データの解析は R software を用いて行った。

⑮ ヒト腎組織を用いた RNA スコープによる *in situ* hybridization

HOTAIR 発現をヒト腎癌組織で検出するために、RNAscope 2.5 HD assay kit (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA) を用いて *In situ* hybridization (ISH) を行った。ホルマリン固定後、パラフィン包埋された組織を 7 μm に薄切し、プレパラートを作成した。前処理 (脱パラフィン、プロテアーゼ処置、賦活化) の後で HOTAIR 特異的プローブをハイブリダイズし、シグナル増幅処理を行い、組織上に赤いドットして HOTAIR 発現を検出した。シグナル増幅処理は、標的 RNA (HOTAIR) に対して ZZ プローブがハイブリダイズし、ZZ プローブに Amplifer が結合し、さらにラベルプローブが結合することで、RNA1 分子に対してシグナルを 8000 倍に増幅するものである。ハイブリダイズの質を評価するために、ネガティブコントロールのプローブ (DapB)、ポジティブコントロールのプローブ (PPIB) を用いた。

⑯ ヒト腎組織を用いた免疫染色

宮城県立がんセンター泌尿器で手術摘出されたヒト腎癌組織を用いて免疫組

織染色法を行い、IGFBP2 の発現を確認した。ホルマリン固定後、パラフィン包埋された組織を 3 μm に薄切し、プレパラートを作成した。脱パラフィン処理は、キシレン及び段階希釈したエタノール溶液を用いて行った。抗原賦活化溶液として pH 9.0 target retrieval solution (Dako, Denmark)、抗原賦活化は、東屋製のマイクロウェーブ (MI-77) を用い、96°C、出力 4 で 18 分間加熱した。賦活化後、ペルオキシダーゼ不活化のため、15 分間 0.3% の過酸化水素水でプレパラートの処理を行った。一次抗体処理は、希釈液として Antibody Diluent, Dako REAL™ (Dako) を用い、IGFBP2 抗体は 1/1,000 の希釈後、37°C で 12 時間反応を行った。その後、IGFBP2 染色を行ったプレパラートは、二次抗体処理前に mouse linker 溶液 (Dako) を 15 分間室温で処理した。二次抗体処理及び DAB 発色は、Dako の EnVision™ Detection Systems Peroxidase/ DAB, Rabbit/ Mouse を用いて行った。

⑰ 統計解析

全生存期間は Kaplan-Meier 法を用いてグラフ化し、有意差は Log-Lank 検定にて算出した。Kaplan-Meier 解析において、2 群に分類する際のカットオフ値は、ROC カーブを用いて感度と特異度が最大になる値を用いた。すべての実

験の統計学的検討には Mann-Whitney's U 検定を用いた。各種いずれの検定も P 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとし、図・表では*印で示した。統計解析には JMP 11 (SAS Institute, Cary, NC, USA) および GraphPad Prism software (Version 6.05; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)を用いた。

V. 研究結果

①-④ 腎癌臨床検体における HOTAIR の発現と臨床病理学的検討

腎癌 64 症例について癌部と同患者の非癌部における HOTAIR の発現を比較 Ct 法による real-time PCR にて解析した。すべての症例は病理学的に淡明細胞型腎細胞癌と診断されている。その結果、同患者の非癌部に比べ癌部で HOTAIR の発現値が 1.2 倍以上の HOTAIR 高発現症例は 64 例中 21 例(32.8%) に認められた (図 1A)。

HOTAIR の発現と臨床病理学的背景の関連を検討した。また、予後因子検討のため、疾患特異的生存率を検討した。HOTAIR 高発現群では低発現群に比べ有意に核異型度、静脈浸潤、N 因子、M 因子、Stage の関連を認めた。一方、HOTAIR の発現は年齢、性別、壊死組織の有無との関連を認めなかった(表 2)。また、HOTAIR 高発現群は疾患特異的生存期間が低発現群に比べ有意に短縮し

ていた(図 1 B)。TCGA のデータ解析においても、HOTAIR 高発現群は全生存期間が低発現群に比べて有意に短縮していた (図 1 C)。

⑤-⑦ HOTAIR 安定強制発現株の樹立

3 種類のヒト淡明細胞型腎細胞癌の細胞株について HOTAIR の発現を real-time PCR にて測定した(図 2)。続いて比較的 HOTAIR の発現が低い ACHN 細胞株および A498 細胞株にレトロウイルスベクターを用いて HOTAIR を導入し強制発現させた。real-time PCR にて HOTAIR の発現の誘導を確認し、コントロール細胞株に比べ ACHN は 6 倍、A498 は 30 倍の発現上昇を認めた(図 3A-B)。

⑧ siRNA による HOTAIR 発現抑制

Caki-1 細胞を用い、siRNA による HOTAIR 発現抑制を行い、real-time PCR にて HOTAIR の発現がコントロールに比べて 55-60%抑制されていることを確認した (図 3C)。

⑨ HOTAIR 発現と細胞増殖能の検討

HOTAIR 発現がどのように細胞増殖能に影響するか検討し、ACHN および A498 を用いて、HOTAIR 過剰発現株とコントロール株を比較したところ、増

殖能に差を認めなかった(図 4 A-B)。Caki-1 を用いて HOTAIR 発現抑制を行い、コントロールと比較したが、HOTAIR 発現を抑制しても細胞増殖能に変化を認めなかった (図 4C)。

⑩ HOTAIR 発現と細胞遊走能の検討

(1) Two chamber Assay

48 時間後にインサート外側に遊走した細胞数を検討した。コントロール株と HOTAIR 強制発現株を比較し、HOTAIR 強制発現株で有意に多くの遊走細胞数を認め、遊走能の亢進が示唆された(図 5A-B)。同様に、HOTAIR 発現抑制を行った細胞とコントロールを比較し、HOTAIR 発現抑制すると遊走細胞数は減少し、遊走能が減弱した (図 5C)。

(2) Wound Healing Scratch Assay

24 時間後に間隙に遊走した細胞面積の割合を検討した。コントロール株に比べ HOTAIR 強制発現株で、細胞の遊走により有意に間隙面積が狭小し、遊走能の亢進が示唆された(図 6A-B)。同様に HOTAIR 発現抑制を行った細胞とコントロールを比較し、HOTAIR を発現抑制すると面積は増大し、遊走能が減弱した。

(図 6C)

以上の結果から、ヒト腎癌細胞株において HOTAIR 発現は増殖能に影響しないが、遊走能に重要な影響をもつことが示唆された。

⑪ 皮下移植モデルでの HOTAIR の発現と腫瘍形成能の検討

*In vivo*における HOTAIR 発現による癌細胞の腫瘍形成能を検討するために、免疫不全マウス (NOG マウス) への皮下移植を行った。ACHN を用いた HOTAIR 強制発現株(n=8)とコントロール株(n=8)を各々移植し、経時的に腫瘍形成を観察した。HOTAIR 強制発現株はコントロール株と比較して有意に腫瘍体積の増加を認め、HOTAIR 発現により腫瘍形成能が促進されることが示唆された(図 7)。

⑫ 尾静注、同所移植による転移モデルでの HOTAIR 発現と転移能の検討

臨床像を反映する腫瘍の進展・転移能を検討するため、免疫不全マウスへの癌細胞の尾静注による転移モデルを作成した。ACHN 細胞株の HOTAIR 強制発現株(n=4)とコントロール株(n=4)を各々尾静注後、24 週目に肺への転移を肉眼的・顕微鏡的に確認した(図 8A-B)。別な実験系で転移能を評価するため、ACHN 細胞株の HOTAIR 強制発現株(n=4)とコントロール株(n=3)を用いて、腎被膜の脂肪組織に細胞を注入し、同所移植による肺転移モデルとして 14 週後に肺への

転移を肉眼的、顕微鏡的に確認した（図 9A-B）。尾静注転移モデル、同所移植による転移モデルともに、HOTAIR 過剰発現株はコントロール株と比較し、有意に肺転移数が増加した。以上の結果から、*in vivo*における検討で、HOTAIR は腫瘍造成能、転移能に関わることが示された。

②-③ EMT 関連遺伝子の検討

HOTAIR は多くの遺伝子を調節し、多様な細胞機能を修飾することが知られており、特に上皮間葉転換（EMT）を調節することが知られている[13]。腎癌細胞株において、HOTAIR 強制発現またはノックダウンさせることで EMT に関連する代表的な遺伝子（SNAIL, N-Cadherin, TWIST, VIMENTIN）の発現に変動があるかを real-time PCR を用いて検討した。腎癌細胞株（ACHN,A498,Caki-1）において、HOTAIR の発現と EMT 関連遺伝子の発現は関連を認めなかった（図 10A-D）。

⑬-⑭ マイクロアレイ解析を用いた網羅的遺伝子解析

臨床検体、*in vivo*, *in vitro* の検討から、HOTAIR 発現が遊走能に影響し、転移能が亢進することで予後不良となることが推測された。そこで、HOTAIR がどのような作用機序で転移能を亢進させるのかを調べるため、マイクロアレ

イ解析を用いて HOTAIR の強制発現により影響を受ける変動遺伝子を網羅的に検討した。HOTAIR 強制発現株 (n=3) でコントロール株(n=4)に比べて発現が亢進している遺伝子を順に並べた heat-map を図 11A に示す。これらの遺伝子の中で、癌浸潤に働く遺伝子として報告されている IGFBP2 に着目した。

real-time PCR およびウェスタンブロッティングでコントロール株に比べて HOTAIR 強制発現株で IGFBP2 が発現亢進していることを確認した(図 11 B-C)。

これらの結果から、ヒト腎癌細胞株において IGFBP2 が HOTAIR の下流遺伝子である可能性が示された。

⑧-⑩ IGFBP2 を介して HOTAIR は遊走能に関与する

HOTAIR 発現により遊走能が亢進するメカニズムにおいて、その下流に IGFBP2 が位置するか調べるために、HOTAIR 過剰発現株に対して siRNA を用いて IGFBP2 発現を抑制した(図 12 A-B)。MTT 試験による増殖能の検討では、IGFBP2 発現抑制で若干増殖能は抑制された (図 13A)。Two chamber Assay および Scratch assay による遊走能の検討では、IGFBP2 を抑制することで、HOTAIR 発現亢進 (ACHN-HOTAIR) により増強されていた遊走能は明らかに減少し、コントロール細胞 (ACHN-EV) と同程度まで減少した (図 13 B-C)。

以上のデータにより、HOTAIR 発現によって惹起される遊走能亢進は IGFBP2 発現に依存的であることが示された。

⑮-⑯ 臨床検体における IGFBP2 と HOTAIR 発現の相関

臨床検体において、HOTAIR 発現と IGFBP2 発現が相関するか検討した。前述した 64 例の淡明細胞型腎細胞癌の癌部、非癌部の RNA を用いて、IGFBP2 発現を real-time PCR で評価し、HOTAIR 発現との相関を検討した。HOTAIR 発現と IGFBP2 発現は正の相関を認めた（表 3、フィッシャーの正確検定）。

次に、ヒト腎癌細胞組織を用いて、HOTAIR の発現（ISH）と IGFBP2 の発現（IHC）に相関があるか調査した。同一標本内の腫瘍部で、核異型度が低い（G1-2）部分と高い（G4）部分が混在する症例で検討した。低異型度の部分では IGFBP2 および HOTAIR 発現は少ないが、高異型度の部分では、両者とも発現が亢進していた（図 14）。

①-④ IGFBP2 と予後の検討

real-time PCR を用いた、64 症例の淡明細胞型腎細胞癌での検討では、IGFBP2 発現が高いと予後不良であった（図 15A）。TCGA による 521 例の淡明細胞型腎細胞癌での検討でも、IGFBP2 が高いと予後が不良であった（図 15B）。

64 症例を HOTAIR と IGFBP2 に関してそれぞれ高発現群、低発現群に分けると、両者とも高発現している群が最も予後不良であった。HOTAIR 低発現かつ IGFBP2 高発現の群は、両者とも低発現の群と予後が変わらなかった（図 15C・D）。以上のデータから、HOTAIR によって調節される IGFBP2 の発現が、腎癌進展に重要な役割をもつことが示唆された。

VI. 考察

本研究では、HOTAIRが腎細胞癌の進展において重要な機能を有していることを明らかにした。HOTAIR過剰発現株は *in vivo* における腫瘍造成能の評価ではコントロールと比べて増殖が速かったが、*in vitro* におけるMTT試験での増殖能の評価ではコントロールと同等であった。尾静注や同所移植での肺転移モデルでも、転移巣数はHOTAIR過剰発現株で有意に多かった。マウス皮下での増殖速度はHOTAIR過剰発現株で高い傾向にあり、*in vivo* においては定着後の増殖能も亢進させると思われたが、HOTAIRの主な機能は肺への定着能を亢進させることだと考えられた。臨床症例でHOTAIRの発現がT因子ではなくN因子・M因子と相関することも、この結論を支持する。臨床検体での検討において、HOTAIR発現は遠隔転移やリンパ節転移と相関しており、HOTAIRが定着

能および浸潤能を亢進させることが示唆された。腎細胞癌において、HOTAIRを抑制すると *in vitro* において遊走能が減少したという報告もあり、我々の研究結果を支持する結果である[25]。HOTAIR以外にもRCCにおいて多くの lncRNA (MALAT1、CADM1-AS1、GAS5等) が細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、転移浸潤に関わる報告があり、治療ターゲットとして注目されている。

本研究では、腎細胞癌において、HOTAIR および IGFBP2 が予後因子であることも明らかにしており、HOTAIR-IGFBP2 経路が、腎癌治療における新たな治療ターゲットとなる可能性がある。HOTAIR 低発現-IGFBP2 高発現群は、HOTAIR 高発現-IGFBP2 高発現群よりも予後が良好であった。これは、HOTAIR に依存した IGFBP2 の発現が、より腎癌の進展に寄与することを示唆している。IGFBP2 が腫瘍で過剰発現していることは、神経膠腫[26]、乳癌[27, 28]、卵巣癌[29]、前立腺癌[30]、直腸癌[31]、胃癌[32]、肺癌[33]、白血病[34]、神経膠細胞[35]など多数の報告がある。近年の研究では、IGFBP2 の上昇は全生存期間を短縮させるという報告もある[36-38]。IGFBP2 が癌遺伝子として働く作用機序としては、複数の報告がある。神経膠腫において、IGFBP2 はインテグリン α と相互作用することで細胞の移動能に関わり、

IGFBP2/integrin/ILK/NF- κ B シグナル経路が *in vivo* において癌進展に寄与することが報告されている[39]。腎細胞癌において、IGFBP2 が癌浸潤に関わる詳細な機序は不明であるが、IGFBP2 が癌進展に重要な役割をもつと考えられる。

HOTAIR が多くの遺伝子を調節し、多様な細胞機能を修飾することが知られており、特に上皮間葉転換 (EMT) を調節することが多数報告されている[13]。

食道扁平上皮癌において、HOTAIR は Wnt/ β -catenin 経路を活性化し[18]、胃癌では HOTAIR を抑制すると MMP1 と MMP3 の調節を介して EMT が抑制される[40]。乳がんにおいては、HOTAIR は TGF β 1 処理することで EMT を亢進する[41]。その一方で、HOTAIR が EMT の経路とは無関係に癌進展に働くという報告もあり、HOTAIR が癌進展に関わる詳細な機序は明らかにされていない。

腎癌の代表的な癌抑制遺伝子である von Hippel-Lindau 遺伝子変異と HOTAIR 発現は現時点で明らかな関連は指摘されていない。本研究では、HOTAIR 発現は EMT 関連遺伝子 (SNAIL, N-Cadherin, TWIST, VIMENTIN) の発現に影響しなかった。尿路上皮癌において、EMT 関連遺伝子を含む HOTAIR の下流遺伝子の動きは細胞株によっても異なると報告されている[42]。本研究において Caki-1 細胞株では ACHN 細胞株よりも HOTAIR 発現が高いこ

とが確認されたが、IGFBP2 発現は ACHN 細胞株と Caki-1 細胞株はほぼ同じだった。Caki-1 細胞株における HOTAIR は IGFBP2 経路とは別の経路で移動能に関わっている可能性があり、これは細胞株の違いによって生じたと考えられた。本研究での結果では、腎細胞癌において HOTAIR は主に細胞の遊走能に関与し、その下流遺伝子としては、IGFBP2 と関連した経路が重要であると考えられた。HOTAIR がどのような機序で IGFBP2 発現を調節するのかは判明しておらず、今後の研究課題である。

以上の結果を総括すると、本研究は HOTAIR の下流遺伝子として新たに IGFBP2 を同定した。HOTAIR-IGFBP2 経路は腎細胞癌において遊走能に関与し、この経路が腎癌進展に深く関わっていることが明らかとなった。HOTAIR-IGFBP2 経路を抑制する薬物は、転移性腎癌に対して有効な、全く新しいがん分子標的療法をもたらすと考えられ、今後この経路がどのように調節されるのか研究を進めていきたい。

VII. 結論

腎細胞癌において、HOTAIR は IGFBP2 を介して癌進展に寄与することが示された。

VIII. 謝辞

本研究を進めるにあたり御指導を賜りました東北大学医学系研究科連携講座がん幹細胞学分野佐藤賢一教授に深謝致します。研究の機会を頂いた東北大学外科病態学泌尿器科学分野の荒井陽一教授、臨床検体の摘出保存に御協力頂いた宮城県立がんセンター泌尿器科栃木達夫診療課長、川村貞文医長に感謝致します。また実験指導・助言を賜りましたがん幹細胞研究部玉井恵一部長、臨床検体の品質管理に Tissue Bank センターの佐藤郁郎センター長、小室邦子技術員、技術的指導に関して望月麻衣研究技師、中村真央研究技師、横山美沙技術員、渋谷莉恵技術員の御支援、御協力に感謝申し上げます。

IX. 参考文献

1. Brian I Rini, S.C.C., Bernard Escudier, *Renal cell carcinoma*. *lancet*, 2009. **373**: p. 1119-1132.
2. Motzer, R.J., N.H. Bander, and D.M. Nanus, *Renal-cell carcinoma*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(12): p. 865-75.
3. Cohen, H.T. and F.J. McGovern, *Renal-cell carcinoma*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(23): p. 2477-90.
4. Coppin, C., et al., *Targeted therapy for advanced renal cell cancer (RCC): a Cochrane systematic review of published randomised trials*. *BJU Int*, 2011. **108**(10): p. 1556-63.
5. Birney, E., et al., *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. *Nature*, 2007. **447**(7146): p. 799-816.
6. Shabalina, S.A. and N.A. Spiridonov, *The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences*. *Genome Biol*, 2004. **5**(4): p. 105.
7. Ruvkun, G., *Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world*. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 797-9.
8. Calin, G.A., et al., *Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(3): p. 215-29.
9. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
10. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. *Nature*, 2009. **458**(7235): p.

- 223-7.
11. Gibb, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 38.
 12. Rinn, J.L., et al., *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
 13. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
 14. Kogo, R., et al., *Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers*. Cancer Res, 2011. **71**(20): p. 6320-6.
 15. Kim, H.J., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression*. Int J Oncol, 2015. **46**(2): p. 521-30.
 16. Nakagawa, T., et al., *Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(2): p. 319-24.
 17. Endo, H., et al., *Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77070.
 18. Ge, X.S., et al., *HOTAIR, a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma, inhibits WIF-1 expression and activates Wnt pathway*. Cancer Sci, 2013. **104**(12): p. 1675-82.
 19. Myers, A.L., et al., *IGFBP2 modulates the chemoresistant phenotype in esophageal adenocarcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 25897-916.

20. Hawsawi, Y., et al., *Deregulation of IGF-binding proteins -2 and -5 contributes to the development of endocrine resistant breast cancer in vitro.* Oncotarget, 2016: p. 32129-32143.
21. Gao, S., et al., *IGFBP2 Activates the NF-kappaB Pathway to Drive Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasive Character in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.* Cancer Res, 2016: p. 6543-6554.
22. Wang, H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes.* Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4315-21.
23. Wang, G.K., et al., *An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin alpha5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility.* J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14085-91.
24. Han, S., et al., *Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin beta1-ERK pathway.* Br J Cancer, 2014. **111**(7): p. 1400-9.
25. Chiyomaru, T., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells.* J Biol Chem, 2014. **289**(18): p. 12550-65.
26. Zheng, S., et al., *DNA hypermethylation profiles associated with glioma subtypes and EZH2 and IGFBP2 mRNA expression.* Neuro Oncol, 2011. **13**(3): p. 280-9.
27. Busund, L.T., et al., *Significant expression of IGFBP2 in breast cancer compared with benign lesions.* J Clin Pathol, 2005. **58**(4): p. 361-6.
28. Probst-Hensch, N.M., et al., *IGFBP2 and IGFBP3 protein expressions in human breast cancer: association with hormonal factors and obesity.* Clin

- Cancer Res, 2010. **16**(3): p. 1025-32.
29. Lancaster, J.M., et al., *High expression of insulin-like growth factor binding protein-2 messenger RNA in epithelial ovarian cancers produces elevated preoperative serum levels.* Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(4): p. 1529-35.
 30. Ambrosini-Spaltro, A., et al., *IGFBP2 as an immunohistochemical marker for prostatic adenocarcinoma.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011. **19**(4): p. 318-28.
 31. Mishra, L., et al., *Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancers.* Growth Horm IGF Res, 1998. **8**(6): p. 473-9.
 32. Zhang, L., et al., *Expression of IGFBP2 in gastric carcinoma and relationship with clinicopathologic parameters and cell proliferation.* Dig Dis Sci, 2007. **52**(1): p. 248-53.
 33. He, Y., et al., *Aberrant expression of proteins involved in signal transduction and DNA repair pathways in lung cancer and their association with clinical parameters.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31087.
 34. Kuhn, A., et al., *High expression of IGFBP2 is associated with chemoresistance in adult acute myeloid leukemia.* Leuk Res, 2011. **35**(12): p. 1585-90.
 35. Becher, O.J., et al., *IGFBP2 is overexpressed by pediatric malignant astrocytomas and induces the repair enzyme DNA-PK.* J Child Neurol, 2008. **23**(10): p. 1205-13.
 36. Liou, J.M., et al., *Plasma insulin-like growth factor-binding protein-2 levels as diagnostic and prognostic biomarker of colorectal cancer.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(4): p. 1717-25.

37. Inman, B.A., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 2: an androgen-dependent predictor of prostate cancer survival*. Eur Urol, 2005. **47**(5): p. 695-702.
38. Guo, C., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-2 level is increased in blood of lung cancer patients and associated with poor survival*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74973.
39. Holmes, K.M., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF-kappaB network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3475-80.
40. Xu, Z.Y., et al., *Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer*. Int J Biol Sci, 2013. **9**(6): p. 587-97.
41. Padua Alves, C., et al., *Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines*. Stem Cells, 2013. **31**(12): p. 2827-32.
42. Heubach, J., et al., *The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells*. Mol Cancer, 2015. **14**(1): p. 108.

X. 図

図 1 腎細胞癌における HOTAIR 発現

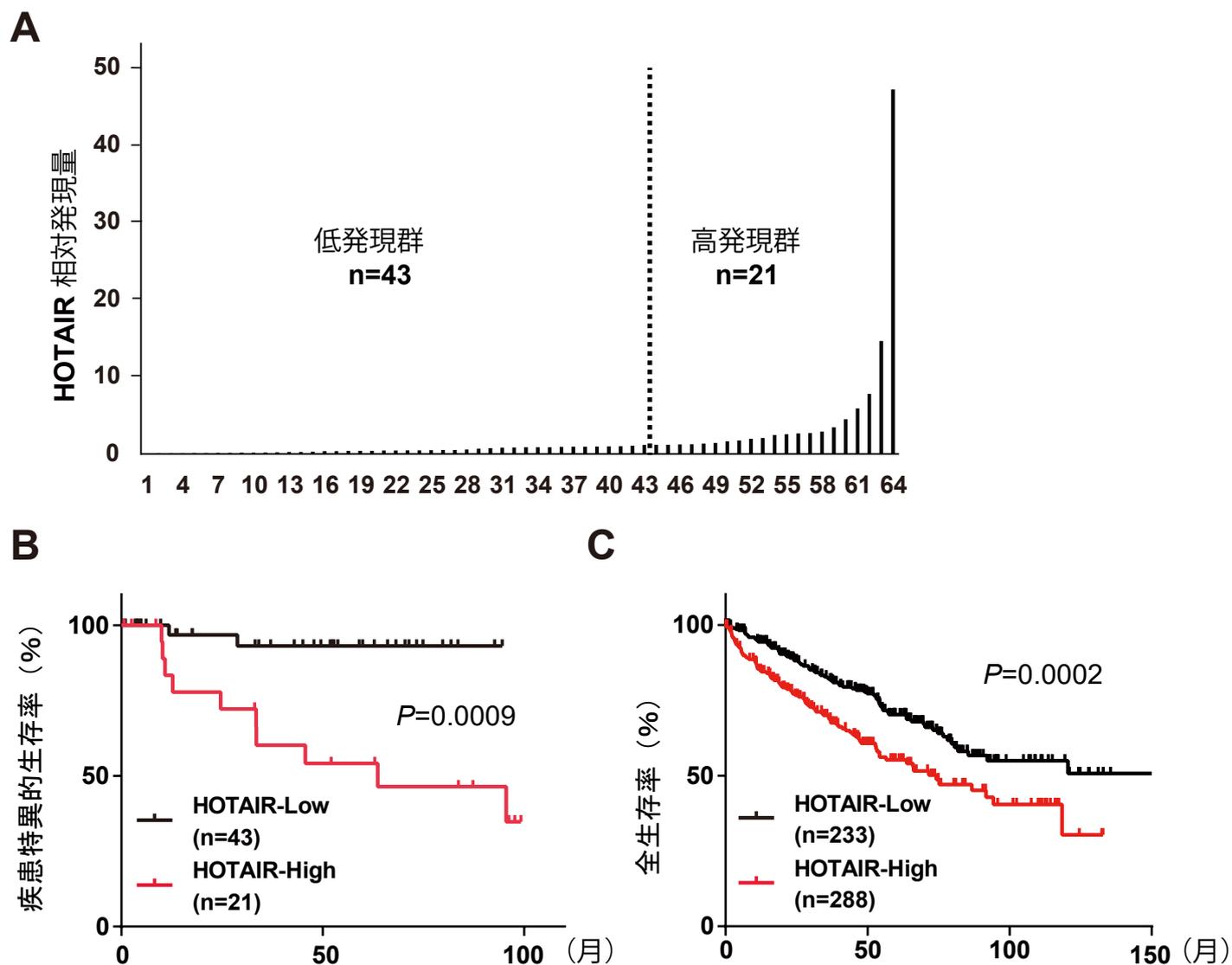


図 2 ヒト腎癌細胞株での HOTAIR 発現

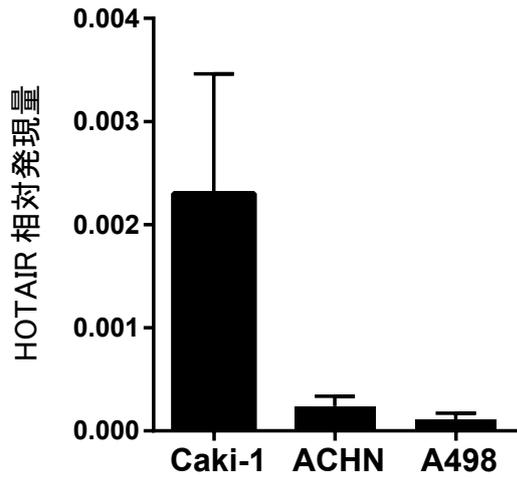


図 3 HOTAIR 過剰発現株の作成、si RNA による HOTAIR 発現抑制

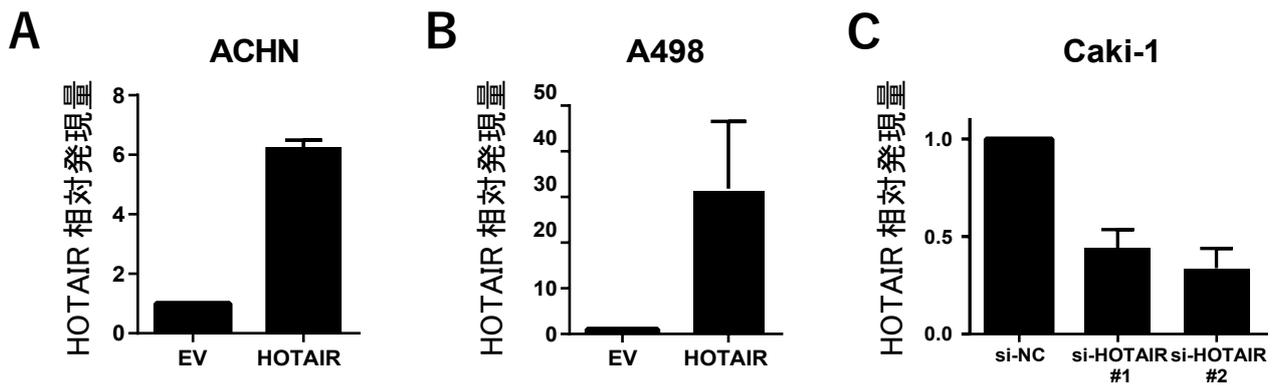


図 4 HOTAIR 発現と細胞増殖能の検討

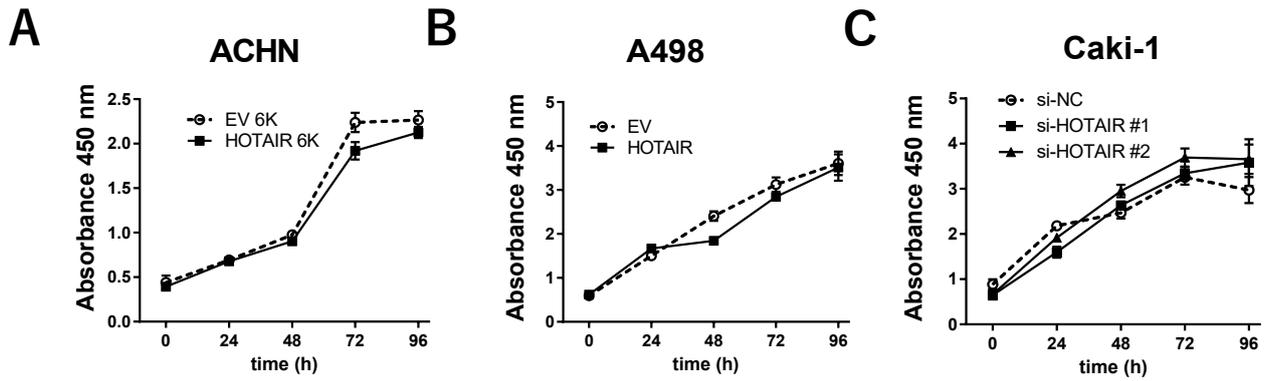


図 5 HOTAIR 発現と遊走能 (Two chamber assay) の検討

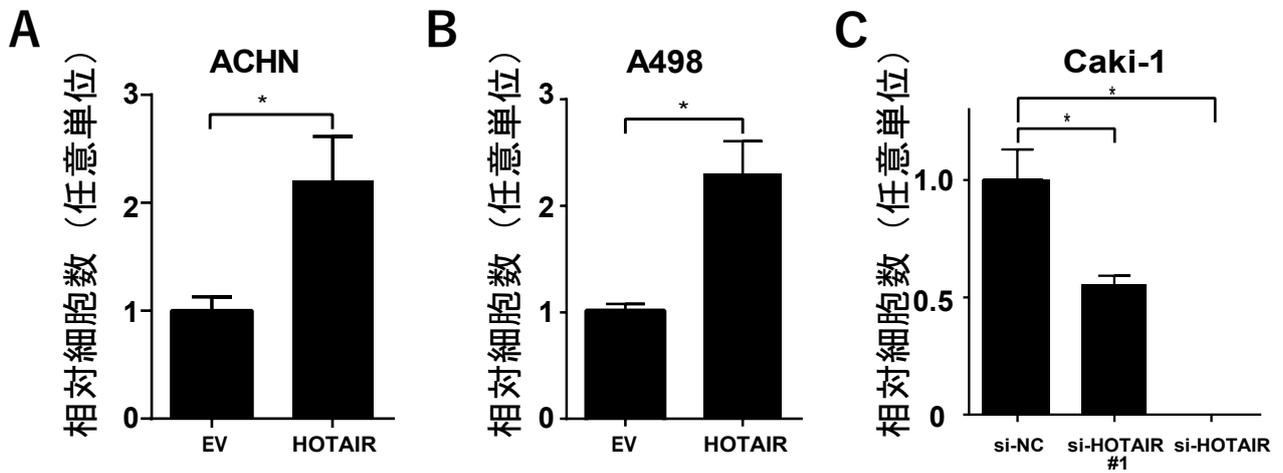


図 6 HOTAIR 発現と遊走能 (Scratch assay) の検討

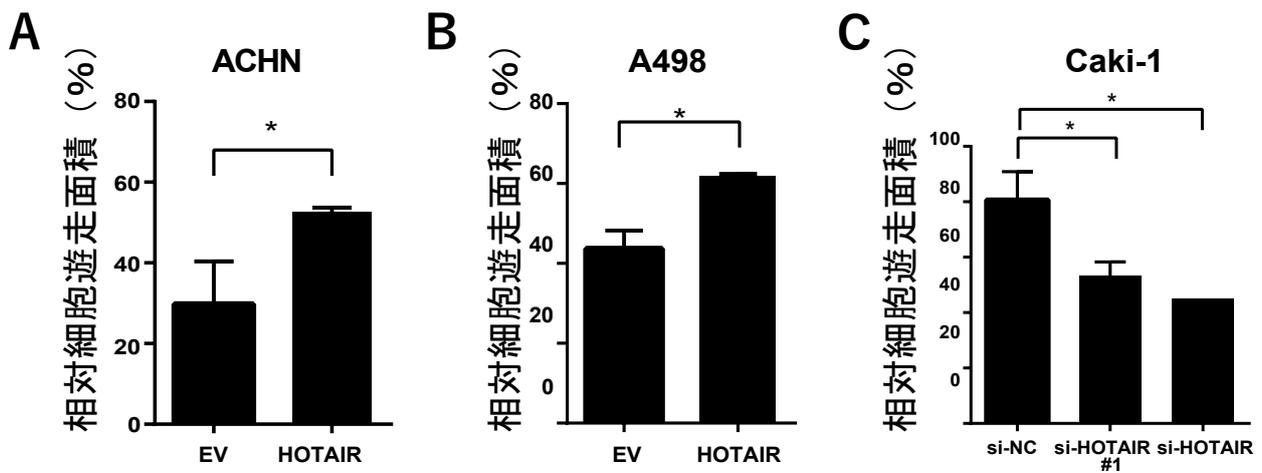


図 7 皮下移植モデルを用いた HOTAIR 発現と腫瘍形成能の検討

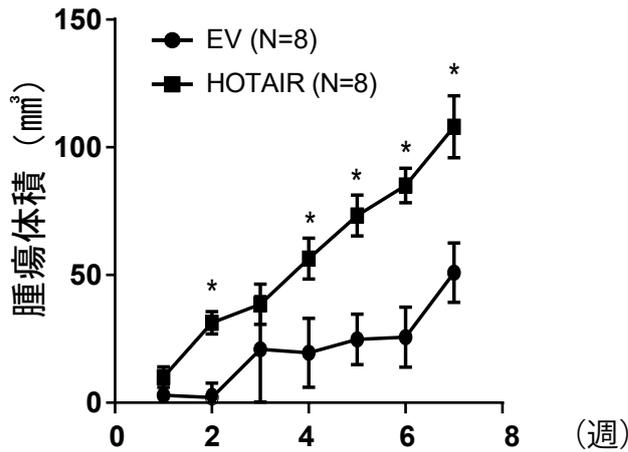


図 8 尾静注による肺転移モデルでの HOTAIR 発現と転移能の検討

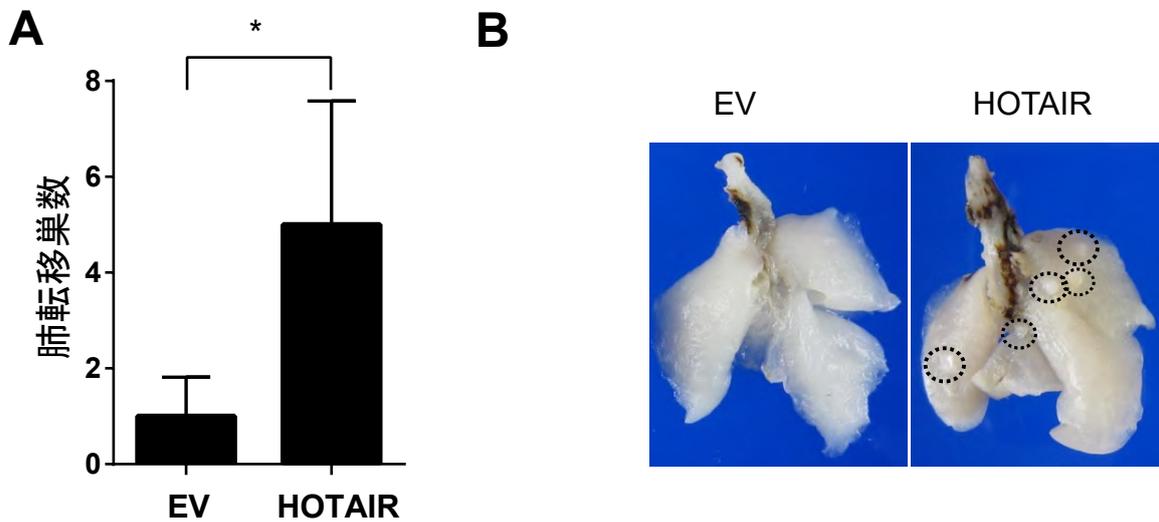


図 9 同所移植による肺転移モデルでの HOTAIR 発現と転移能の検討

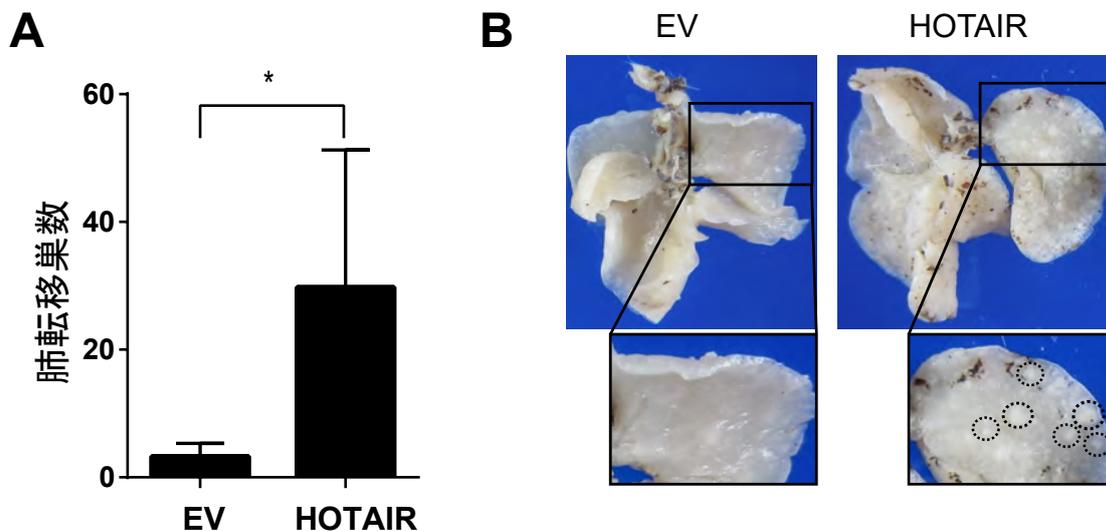


図 10 EMT 関連遺伝子の検討

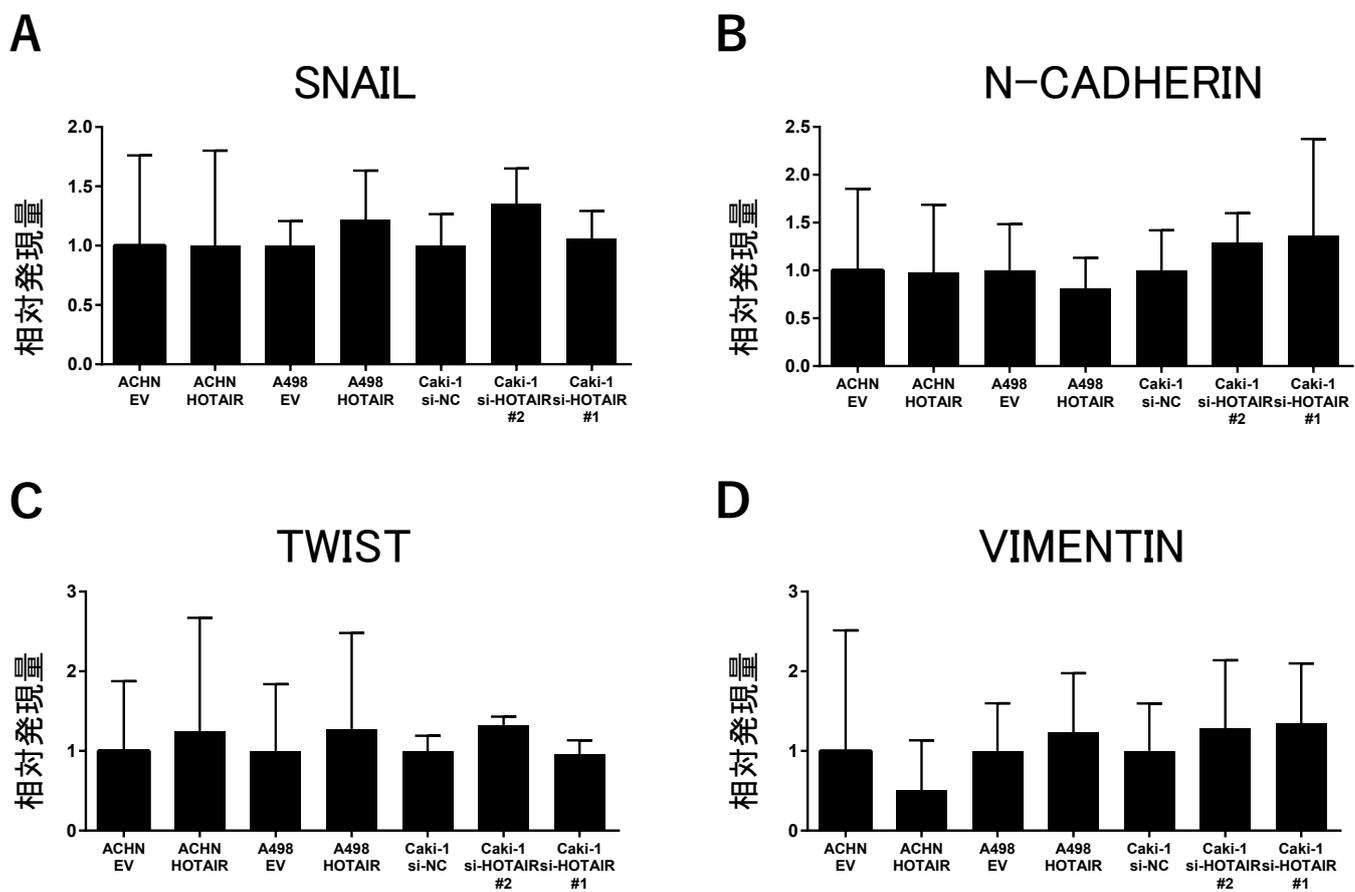


図 11 HOTAIR の下流遺伝子の探索

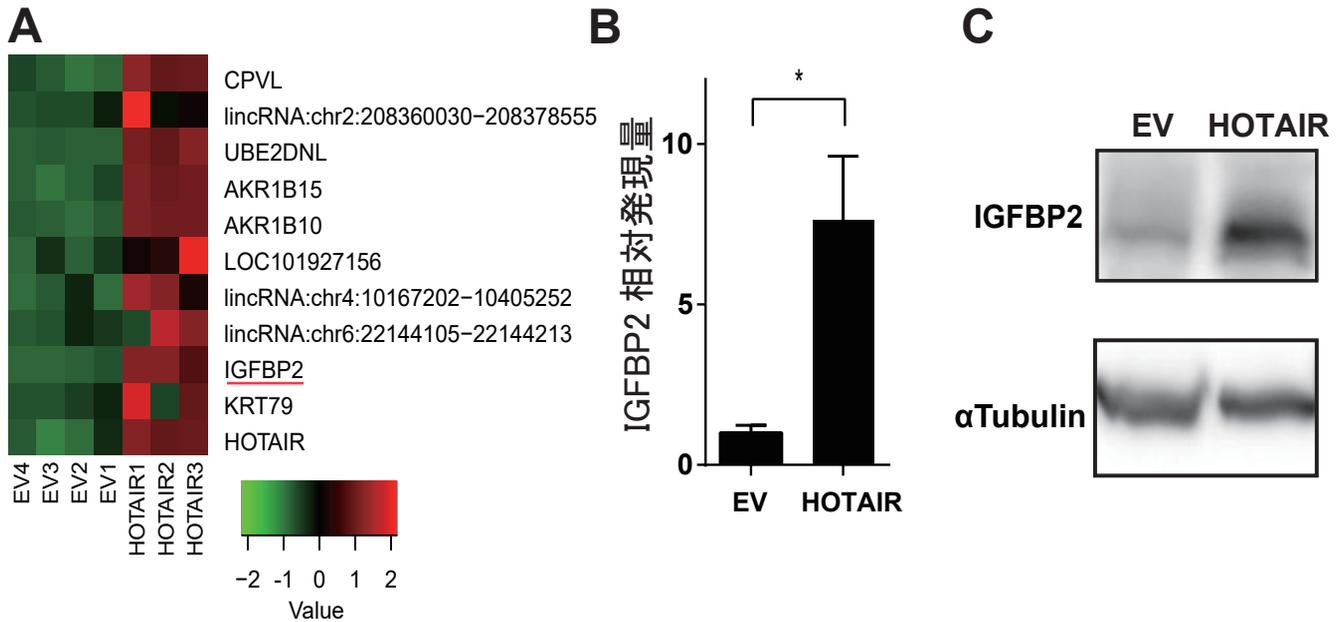


図 12 siRNA による IGFBP2 発現抑制

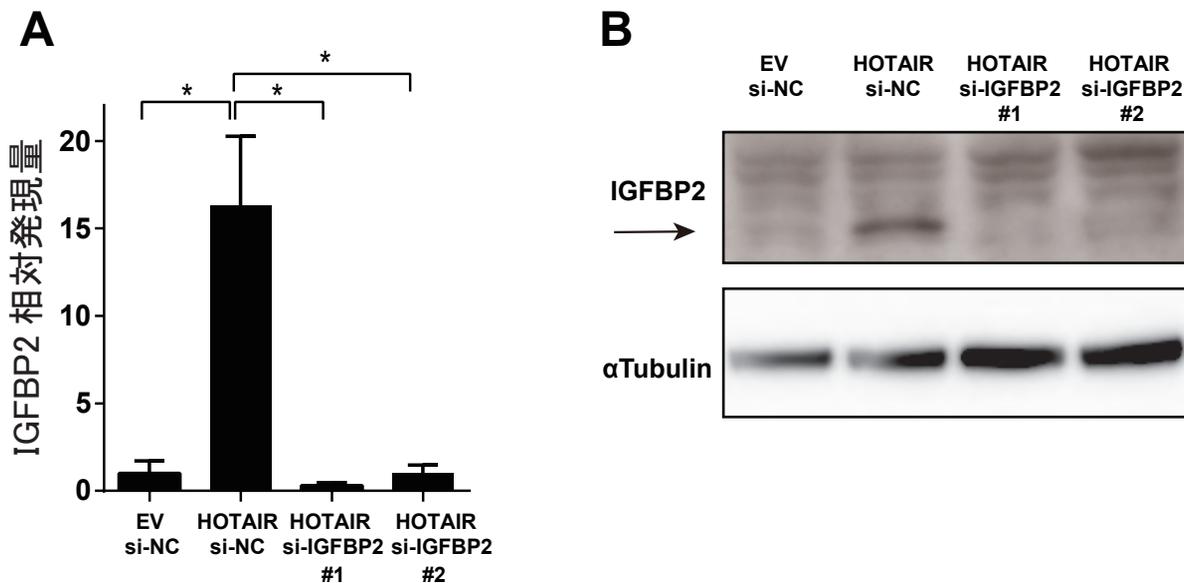


図 13 IGFBP2 発現抑制下の増殖能、遊走能の検討

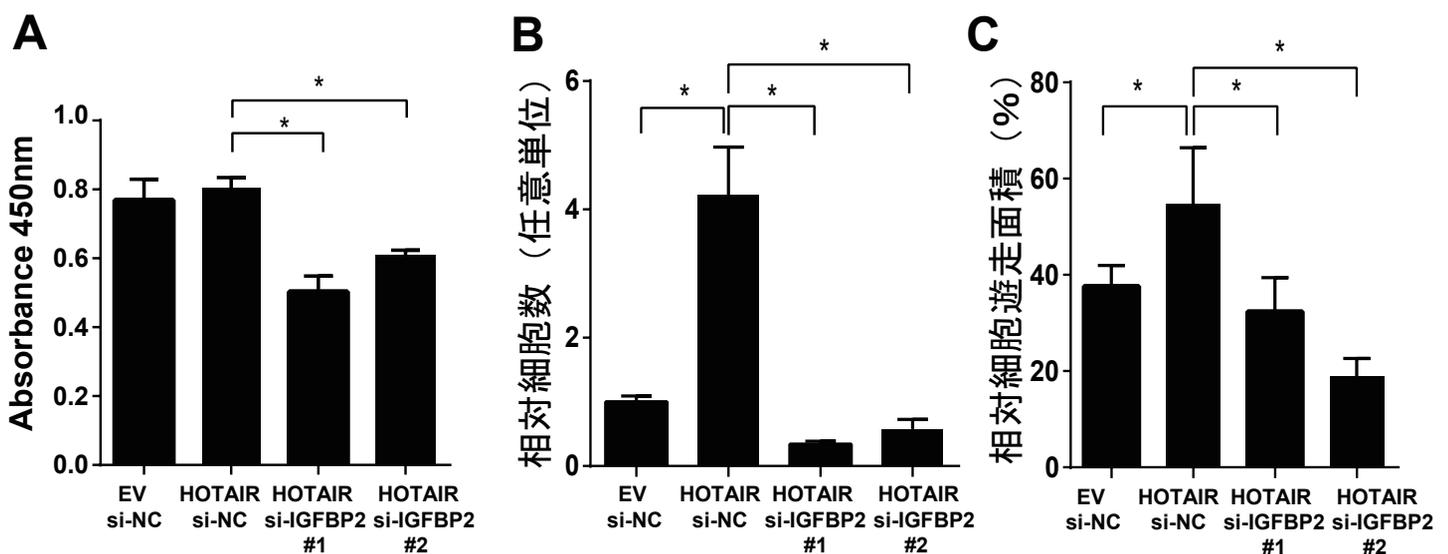


図 14 臨床検体における HOTAIR と IGFBP2 発現

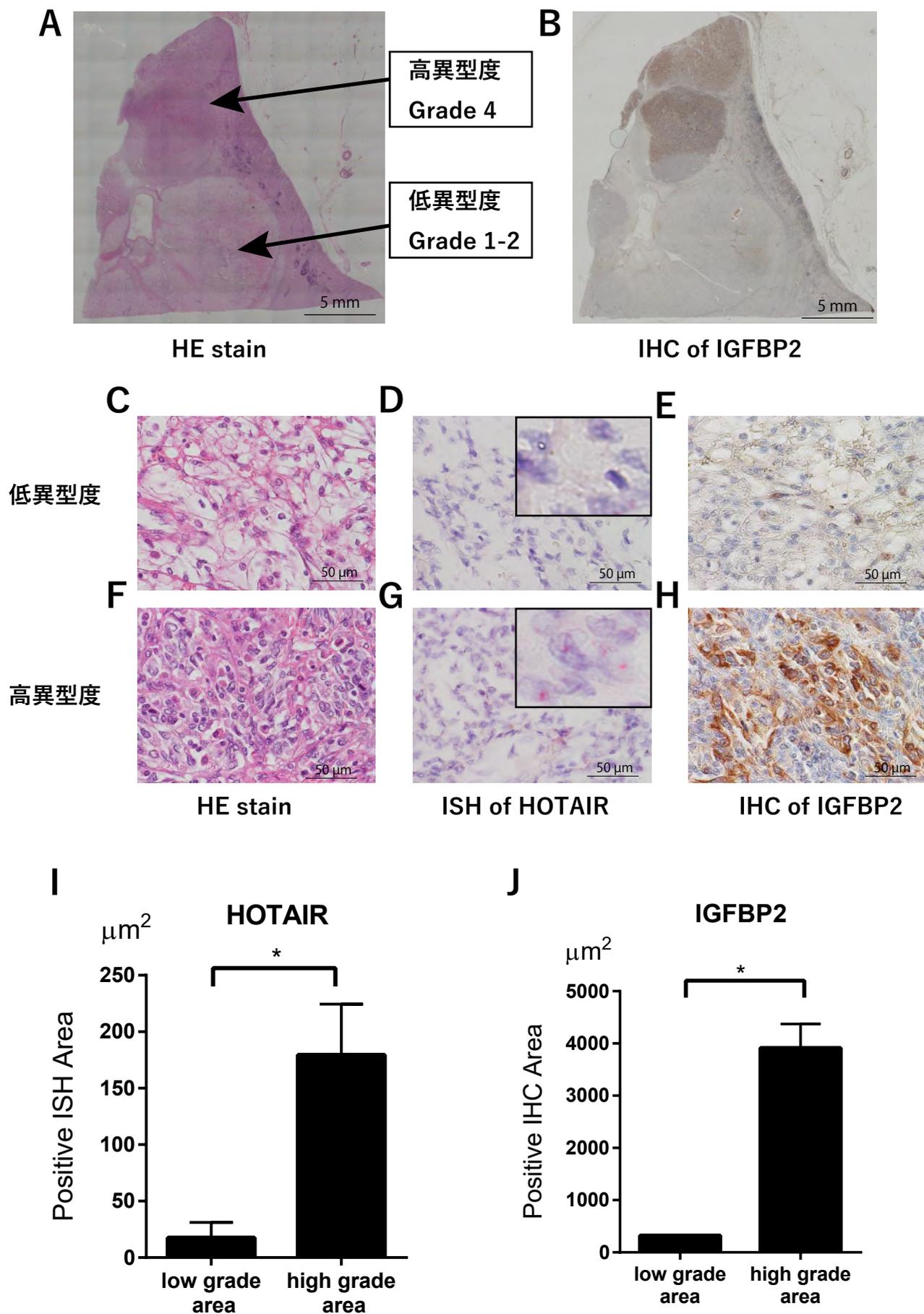
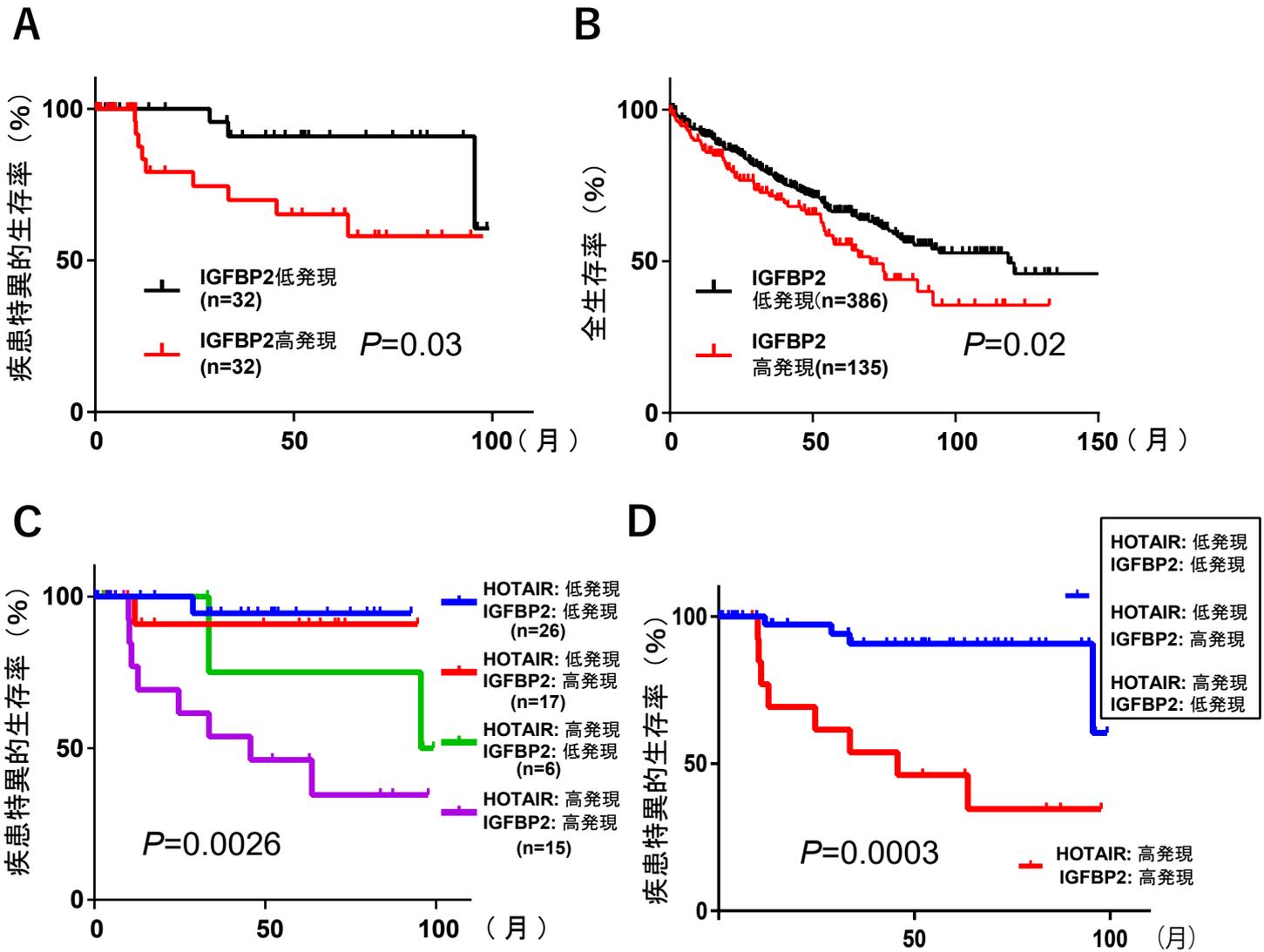


図 15 IGFBP2 発現と予後



XI. 表

表 1

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i>	tgaaggtcggagtcaacgg	agagttaaagcagccctggtg
<i>HOTAIR</i>	ggtagaaaaagcaaccacgaagc	acataaacctctgtctgtgagtgcc
<i>IGFBP2</i>	agcccaagaagctgcgaccac	ctgcccgttcagagacatcttgc

real-time PCR で使用したプライマーの配列

表 2

グループ		Low expression (n= 43)	High expression (n=21)	Pvalue
年齢	<60	29	13	0.787
	≥ 60	14	8	
性別	男性	27	17	0.16
	女性	16	4	
核異型度	I- II	40	13	0.004*
	III-IV	3	8	
壊死組織	—	36	17	0.78
	+	7	4	
静脈浸潤	—	31	8	0.014*
	+	12	13	
T 因子	T1-2	35	12	0.068
	T3-4	8	9	
N 因子	N0	43	16	0.003*
	N1-2	0	5	
M 因子	I- II	39	13	0.013*
	III-IV	4	8	
病期	I- II	32	7	0.003*
Stage	III-IV	11	14	

* p < 0.05

臨床病理学的因子と HOTAIR 発現の解析

表 3

N=64	HOTAIR-Low	HOTAIR-High	<i>P</i> -value*
IGFBP2-Low	20 (31%)	12 (19%)	0.04
IGFBP2-High	11 (17%)	21 (33%)	

*フィッシャーの正確検定

腎癌組織における HOTAIR 発現と IGFBP2 発現の相関

(両遺伝子とも、高発現および低発現のカットオフ値は中央値とした)

XII. 図の説明

図 1 腎細胞癌における HOTAIR 発現

(A) 腎癌患者の非癌部に対する癌部での HOTAIR 発現を比較すると (癌部/非癌部)、64 症例中 21 例 (32.8%) で 1.2 倍以上の発現を示す高発現例が存在した。(B) 64 症例における HOTAIR 発現と予後 (疾患特異的生存) を検討した。HOTAIR 高発現群は予後不良であった。(C) TCGA データ、521 例での HOTAIR 発現と予後 (全生存) を検討した。HOTAIR 発現が高いと予後不良であった。

図 2 ヒト腎癌細胞株での HOTAIR 発現

Real-time PCR を用いて各細胞株の HOTAIR 発現を検討した。Caki-1 が最も HOTAIR 発現が高く、ACHN と A498 は発現が低かった。

図 3 HOTAIR 過剰発現株の作成、si RNA による HOTAIR 発現抑制

(A) ACHN 細胞株における HOTAIR 過剰発現株とコントロール株 (EV) の作成。Real-time PCR での HOTAIR 過剰発現を確認。(B) A498 細胞株の HOTAIR 過剰発現株の作成。(C) Caki-1 細胞株における siRNA を用いた HOTAIR 発現抑制。EV: Empty Vector, si-NC: si-Normal Control

図 4 HOTAIR 発現と細胞増殖能の検討

Cell counting kit を用いて、HOTAIR 過剰発現株とコントロールを比較して細胞増殖能を検討した。細胞株は ACHN (A)、A498 (B) を用いたが、HOTAIR を過剰発現させても細胞増殖能に変化は認めなかった。同様に、Caki-1 細胞株において、siRNA を用いて HOTAIR 発現を抑制しても、増殖能に変化を認めなかった (C)。エラーバー：標準誤差、EV：Empty Vector, si-NC: si-Normal Control

図 5 HOTAIR 発現と遊走能 (Two chamber assay) の検討

Two chamber assay を用いて細胞遊走能を比較した。コントロールに比べ HOTAIR 過剰発現株で、有意に細胞遊走の亢進を認めた(A,B)。一方、siRNA を用いて HOTAIR 発現を抑制すると、細胞遊走は減弱した (C)。EV: Empty Vector, si-NC: si-Normal Control

図 6 HOTAIR 発現と遊走能 (Scratch assay) の検討

Scratch assay を用いて HOTAIR 過剰発現株とコントロールでの細胞遊走面積を比較した。Two chamber assay と同様に、コントロールに比べて HOTAIR 過剰発現株で、遊走面積の亢進を認めた (A,B)。siRNA を用いて HOTAIR 発

現を抑制すると、遊走面積は減弱した (C)。EV : Empty Vector, si-NC: si-Normal Control

図 7 皮下移植モデルを用いた HOTAIR 発現と腫瘍形成能の検討

HOTAIR 過剰発現株として ACHN を用い、皮下移植して腫瘍体積を経時的に評価した。コントロール(n=8)に比べ、HOTAIR 過剰発現株(n=8)は有意に腫瘍体積の増加を認めた。エラーバー：標準誤差、EV : Empty Vector

図 8 尾静注による肺転移モデルでの HOTAIR 発現と転移能の検討

HOTAIR 過剰発現株(n=4)として ACHN を用い、コントロール(n=4)と比較した。

尾静注を行い 24 週目に肺病変を評価したところ、HOTAIR 過剰発現株は有意に肺転移個数が増加していた (A)。肉眼的所見では、点線で肺転移巣を示す (B)。

EV : Empty Vector

図 9 同所移植による肺転移モデルでの HOTAIR 発現と転移能の検討

HOTAIR 過剰発現株(n=4)として ACHN を用い、コントロール(n=3)と比較した。

腎被膜下脂肪組織に移植を行い、14 週目に肺病変を評価したところ、HOTAIR 過剰発現株は有意に肺転移個数が増加していた (A)。肉眼的所見では、点線で多数の肺転移巣を示す (B)。EV : Empty Vector

図 10 EMT 関連遺伝子の検討

(A) SNAIL、(B) N-CADHERIN、(C) TWIST、(D) VIMENTIN の 4 つの EMT 関連遺伝子が、HOTAIR の発現と抑制で変動するか検討したが、明らかな変化を認めなかった。EV : Empty Vector, si-NC: si-Normal Control

図 11 HOTAIR の下流遺伝子の探索

HOTAIR 過剰発現株(n=3)とコントロール(n=4)を用いて、マイクロアレイ解析を行った。Heat map 図を図 A に示す。我々はこの中で癌浸潤に関わると報告されている IGFBP2 に着目した。Real-time PCR (B) およびウェスタンブロットティング (C) を用いて、HOTAIR 過剰発現株がコントロールに比べて優位に IGFBP2 発現が亢進していることを確認した。EV : Empty Vector

図 12 siRNA を用いた IGFBP2 発現抑制

siRNA を用い、ACHN 細胞株において、HOTAIR 過剰発現により発現が上昇した IGFBP2 を発現抑制した。IGFBP2 の発現が抑制されたことを、real-time PCR(A)、ウェスタンブロットティング (B) により確認した。EV : Empty Vector

図 13 IGFBP2 発現抑制下の増殖能、遊走能の検討

(A) IGFBP2 抑制による増殖能の検討では、Cell-counting kit を用いた。遊

走能の検討では、Two chamber assay (B)、Scratch assay (C)を用いた。IGFBP2を抑制することで、HOTAIR によって亢進した遊走能がコントロール (ACHN-EV) と同程度まで低下することが示された。EV : Empty Vector, si-NC: si-Normal Control

図 14 臨床検体における HOTAIR と IGFBP2 発現

同一の腫瘍内に、高異型度 (Grade 4)、低異型度 (Grade 1-2) の腫瘍組織が混在する症例を選び、HOTAIR を ISH で、IGFBP2 を IHC で発現を評価した (Grade : Fuhrman 分類)。切片の全体像を HE 染色 (A)、IGFBP2 の免疫染色 (B) で示す。強拡大で低異型度および高異型度の部分を HE 染色 (C,F)、ISH による HOTAIR 発現 (D,G)、IHC による IGFBP2 発現 (E,H) で比較した。低異型度の部分に比べて、高異型度の部分で HOTAIR および IGFBP2 は発現が亢進していた。HOTAIR は核内、細胞質どちらにも確認された。任意の 3 か所で HOTAIR 発現の程度 (I)、IGFBP2 の発現の程度 (J) を image J で定量化した。

図 15 IGFBP2 発現と予後

(A) 64 症例における IGFBP2 発現と予後 (疾患特異的生存) を検討した。

IGFBP2 高発現群は予後不良であった。(B) TCGA データ、521 例での IGFBP2 発現と予後（全生存）を検討し、IGFBP2 発現が高いと予後不良であった。(C) 64 症例での HOTAIR および IGFBP2 発現と予後の検討し、HOTAIR および IGFBP2 発現が高いと、予後が不良であった。(D) HOTAIR 高発現かつ IGFBP2 高発現群が、他の群と比べて統計学的に有意 ($P=0.0003$) に予後不良であった。