学位論文（博士）

Long non-coding RNA PSMB8-AS1 as a potential biomarker for postoperative recurrence in patients with Fuhrman grades 1-3 clear cell renal cell carcinoma

（長鎖ノンコーディング RNA　PSMB8-AS1 は ファーマングレード１～３の 淡明細胞型腎細胞がんにおける 術後再発の潜在的なバイオマーカーである）

氏名　馬場　智枝子

所属　山口大学大学院医学系研究科

医学専攻　泌尿器科学講座

令和８年６月

目次

1. 要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3

2. 背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3

3. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

4. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

5. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9

6. 謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11

7. 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11

8. 図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

1. 要旨

長鎖非コードRNA（lncRNA）は、発がん過程における重要な調節因子として注目されている。本研究では、腎細胞がん（RCC）における lncRNA PSMB8-AS1 の腫瘍促進作用および予後的意義を検討した。 lncRNA マイクロアレイ解析の結果、PSMB8-AS1 は疾患進行および免疫チェックポイント阻害剤（ICI）耐性に関連する候補分子として同定された。そこで、RCC 患者 192 例から採取した腫瘍組織および隣接正常腎組織における PSMB8-AS1 の発現を解析した。

in vitro 機能解析では、PSMB8-AS1 の腫瘍細胞における増殖および侵襲能への影響を評価した。さらに、バイオインフォマティクス解析およびルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、miR-204-5p／miR-211 と転写因子 TFAP2A との相互作用を検証した。

その結果、PSMB8-AS1 は淡明細胞型腎細胞がん（ccRCC）組織において有意に高発現しており、高発現は予後不良と相関していた。ノックダウン実験では、PSMB8-AS1 が腫瘍細胞の増殖および侵襲を促進することが明らかとなった。機構的には、PSMB8-AS1 は競合的内因性RNA（ceRNA）として機能し、miR-204-5p／miR-211 を吸着することで TFAP2A の発現を増強していた。

以上の結果から、PSMB8-AS1 は ccRCC の進展に寄与する腫瘍促進性 lncRNA であり、術後再発を予測する有望なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

2. 背景

腎細胞がん（RCC）は世界の全悪性腫瘍の約 2%を占め、前立腺がんおよび膀胱がんに次いで三番目に多い泌尿器悪性腫瘍である [1]。米国では、2023 年に推定 81,800 例の新規発症と 14,890 例の死亡が報告されている [2]。5 年生存率は病期により大きく異なり、I 期では 81%であるのに対し、IV 期では 8%にまで低下する [3]。特に転移例や再発例では予後不良が依然として大きな課題となっている。

全身療法の進歩により治療成績は改善してきた [4]。インターフェロン（IFN-α）やインターロイキン-2（IL-2）などのサイトカイン療法は一部の患者に有効であるが、チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）や mTOR 阻害薬を含む分子標的治療の導入により治療選択肢は拡大した。さらに近年では、PD-1/PD-L1 経路を標的とする免疫チェックポイント阻害剤（ICI）が抗腫瘍免疫を回復させることで臨床的有用性を示している [5]。

一方、長鎖非コード RNA（lncRNA）は 200 塩基以上でタンパク質をコードしない転写産物と定義され、がんの発生・進展に関与することが次第に明らかとなっている [6]。NEAT1、HOTAIR、TUG1、MALAT1、PVT1 を含む複数の lncRNA が RCC の予後と関連することが報告されている [7]。

本研究に先立つスクリーニングとして、極めて悪性度の高い RCC 亜型である集合管がん（collecting duct carcinoma: CDC）の lncRNA マイクロアレイ解析を行ったところ、ICI 治療に不応性を示した腫瘍において PSMB8-AS1 が有意に高発現していることを見出した。

CDC と淡明細胞型腎細胞がん（ccRCC）は腎ネフロンの異なる部位に由来するものの、ICI 耐性という状況下では分子学的特徴が重複する可能性がある。この知見は、ccRCC における PSMB8-AS1 の機能的役割および予後的意義を検討する動機となった。

本研究では、192 例の ccRCC 患者コホートにおける PSMB8-AS1 の発現を解析し、その臨床的意義を評価するとともに、miRNA や TFAP2A を含む下流標的との相互作用に着目して、その生物学的機能を明らかにすることを目的とした。

3. 方法

【CDC 由来サンプルを用いた lncRNA マイクロアレイ解析】

RCC 組織において高発現し、疾患の進展や再発に関与する可能性のある lncRNA を同定するため、悪性度の高い RCC 亜型である集合管がん（collecting duct carcinoma: CDC）のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体を用いてマイクロアレイ解析を実施した。解析には、ICI 治療に 6 か月以上良好に反応した患者 1 例と、治療早期に不応性を示した患者 1 例の腫瘍組織および隣接正常腎組織を用いた。特に、ICI 不応例の腫瘍組織で上昇している lncRNA に着目した。

FFPE 切片はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、腫瘍部および正常部を同定した後、マイクロダイセクションを行った。RNA 抽出には Maxwell RSC RNA Tissue Kit（Promega, Madison, WI, USA）を使用した。RNA 量は NanoDrop One 分光光度計（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で測定し、RNA の品質は DV200 値により評価した。

各サンプル 100 ng の total RNA を用い、Arraystar Human LncRNA Expression Array V5.0（ArrayStar Inc., Rockville, MD, USA）により lncRNA 発現プロファイリングを実施した。本アレイは 39,317 種のアノテーション済み lncRNA を網羅している。RNA の標識およびハイブリダイゼーションは製造元のプロトコールに従って行った。スライドは Agilent G2505C スキャナーで読み取り、シグナル強度は Agilent Feature Extraction ソフトウェアを用いて抽出した。

得られたデータには quantile normalization を適用し、t 検定により差次的発現解析を行った。fold change > 2.0 かつ p 値 < 0.05 を有意と判定した。可視化には階層的クラスタリングおよび主成分分析（PCA）を用いた。

【臨床検体】

本研究は、2005 年から 2023 年の間に山口大学医学部附属病院において腎部分摘除術または根治的腎摘除術を受け、病理学的に淡明細胞型腎細胞がん（ccRCC）と診断された 192 例の患者を対象とした。臨床データおよび生物学的検体の研究利用は、2018 年 10 月 24 日から 2023 年 3 月 31 日の期間に実施した。患者背景は **S1 Table** に示す。

すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを取得した。本研究は山口大学医学部の倫理審査委員会の承認（承認番号：H30-089-3）を受けて実施され、ヘルシンキ

宣言の原則に準拠した。

【細胞培養および試薬】

本研究では、ヒト腎細胞がん（RCC）細胞株である 769-P（CRL-1933）および ACHN（CRL-1611）、ならびに正常腎近位尿細管上皮細胞株 RPTEC(PCS-400-010)を American Type Culture Collection（ATCC）より入手した。RCC 細胞株は 10% fetal bovine serum（FBS）を添加した Gibco RPMI 1640 培地（Thermo Fisher Scientific）で維持し、RPTEC 細胞は Renal Epithelial Cell Growth Medium BulletKit（Lonza, Basel, Switzerland）を用いて培養した。すべての細胞は 37° C、5% CO_2 加湿インキュベーター内で培養した。

【RNA 抽出および定量的 RT-PCR】

FFPE 由来腫瘍組織および隣接正常組織からの total RNA 抽出には miRNeasy FFPE Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を使用した。細胞株からの RNA 抽出には miRNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いた。逆転写反応は PrimeScript RT Reagent Kit（Perfect Real-Time; Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて実施した。

定量的 PCR（qPCR）は、TaqMan Fast Advanced Master Mix および特異的 TaqMan プローブ（Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA）を用い、QuantStudio 3（Thermo Fisher Scientific）で行った。内在性コントロールとして ACTB および RNU48 を使用した。相対発現量は $2^{-\Delta Ct}$ 法により算出した。miRNA の解析には TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific）を使用した。

【siRNA を用いたノックダウン】

ACHN 細胞および 769-P 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、PSMB8-AS1 特異的 siRNA（si-PSMB8-AS1）またはネガティブコントロール siRNA（si-NC）を Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen; Thermo Fisher Scientific）を用いてトランスフェクションした。使用した siRNA は Silencer Select（Ambion, CA, USA）より購入した。

【PSMB8 ノックダウン後の TFAP2A 過剰発現（レスキュー実験）】

PSMB8 ノックダウンにより誘導される表現型変化が TFAP2A の過剰発現により回復可能かを検討するため、TFAP2A 発現ベクターを用いて TFAP2A の発現を回復させた。具体的には、まず RNAiMAX トランスフェクション試薬を用いて製造元のプロトコールに従い PSMB8 特異的 siRNA を細胞に導入した。6 時間後、X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent を用いてヒト TFAP2A 発現プラスミド（pRP-CAG-hTFAP2A; VectorBuilder）をトランスフェクションした。ネガティブコントロールとして空ベクターを使用した。

TFAP2A の過剰発現は、細胞増殖アッセイおよび侵襲アッセイなどの後続の機能解析を行う前に RT-qPCR により確認した。

【細胞増殖実験】

トランスフェクション後の細胞を 96 ウェルプレートに播種し、24 時間、48 時間、72 時間後に CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を添加した。さらに 2 時間インキュベートした後、各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダー (iMark; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて 490 nm にて測定した。

【細胞侵襲アッセイ】

細胞の侵襲能は CytoSelect 24-well Cell Invasion Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いて評価した。血清無添加培地に懸濁した細胞 (1.0×10^6/mL) を Matrigel コート済みインサートの上室に播種し、下室には 10% FBS を含む培地を添加した。インキュベーション後、下室側に侵襲した細胞を染色し、560 nm における吸光度を測定することで定量した。

【ルシフェラーゼレポーターアッセイ】

miRNA と TFAP2A の直接的相互作用を検証するため、TFAP2A の 3′ UTR (野生型および変異型) を pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) にクローニングした。3′ UTR ルシフェラーゼアッセイ用プラスミドの作製は既報に従って行った[8]。プライマー配列には PmeI および XbaI の制限酵素認識配列を含めた。

ACHN 細胞および 769-P 細胞に対し、これらのコンストラクトと合成 miR-204/211 mimic を Lipofectamine 2000 を用いて共トランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。結果は 3 回の独立実験の平均値 ± SD として示した。

使用したプライマー配列は以下のとおりである：

TFAP2A forward primer:

5′ AAACTAGCGGCCGCTAGTtcTTGCCCCCTTTGACCTTCcT 3′

TFAP2A reverse primer:

5′ CTAGAgGAAGGTCAAAGGGGGCAAgaACTA 3′

mutant TFAP2A forward primer:

5′ AAACTAGCGGCCGCTAGTtcCTTGGCGCTCTTCGGCCGcT 3′

mutant TFAP2A reverse primer:

5′ CTAGAgCGGCCGAAGAGCGCCAAGgaACTAGCGGCCGCTAGTTT 3′

【バイオインフォマティクス解析】

PSMB8-AS1 に結合する miRNA を同定するため、Ensembl トランスクリプト (ENST05220043563.1; 3310 bp) を入力として miRanda を用いた。Homo sapiens の成熟

miRNA 配列は miRBase から取得した。miRNA とその標的 mRNA（TFAP2A など）の結合予測には TargetScan および miRDB を使用した。ペアリングスコア ≥ 160 かつ結合エネルギー ≤ −20 kcal/mol をカットオフ値として解析を行った。

【統計解析】

PSMB8-AS1 発現の高値群と低値群のカットオフ値は、無増悪生存期間（PFS）に基づく受信者動作特性（ROC）解析を用いて決定し、Youden 指数により最適閾値を設定した。カテゴリ変数の比較にはカイ二乗検定を用い、連続変数については適宜 Student の t 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。腫瘍組織と隣接正常組織のペアデータの解析には Wilcoxon 符号付順位検定を用いた。

生存解析は Kaplan-Meier 法により推定し、群間比較には log-rank 検定を用いた。PFS の独立予測因子を評価するため、多変量 Cox 比例ハザード回帰分析を実施した。すべての統計解析は JMP Pro 16 ソフトウェア（SAS Institute, Cary, NC, USA）を用いて行い、統計学的有意水準は $P < 0.05$ とした。

4. 結果

【RCC における候補 lncRNA としての PSMB8-AS1 の同定】

マイクロアレイ解析の結果、ICI 不応性 CDC サンプルにおいて 1,342 種の lncRNA が上方制御されていることが明らかとなった（Fig 1A）。これらの候補の中から、PSMB8-AS1 は、ICI 応答例・不応例の双方で一貫して高発現していたこと、他候補と比較して fold change が大きかったこと、さらに RCC における機能的知見が限られていたことを理由に、詳細解析の対象として選択した。

【臨床検体における PSMB8-AS1 発現とその予後的意義】

PSMB8-AS1 の発現量は、同一患者から得られた腫瘍組織（T）と隣接正常組織（N）で比較した（Fig 1B; n = 173）。各点は個々のサンプルを示し、ペアとなる T と N は線で結んで示した。視覚化のため、発現量は正常組織に対する fold change として表示した。統計解析は ΔCt 値に基づき Wilcoxon 符号付順位検定を用いて行った。

さらに、ccRCC 患者 16 例の腫瘍組織(T)および隣接正常腎組織(N)における PSMB8-AS1、miR-204、TFAP2A の発現を定量的 RT-PCR により解析した（Fig 1C）。各点は個々の患者サンプルを示し、T と N は線で結んで示した。統計解析には Wilcoxon 符号付順位検定を用いた。NS は有意差なし、$P < 0.05$、$P < 0.01$、**$P < 0.001$、****$P < 0.0001$ を示す。

Kaplan-Meier 解析では、PSMB8-AS1 高発現群は有意に短い PFS を示した。層別解析においても、pT3/pT4 病期、リンパ節転移（N1/N2）、遠隔転移（M1）、Fuhrman grade 4、ならびに高 lncRNA 発現群において、PSMB8-AS1 高発現は不良な PFS と関連していた(Fig 2)。

ROC 解析では、全コホートにおける PFS および OS の予測に最適な PSMB8-AS1 のカッ

トオフ値は 17.4 と算出され、感度 80%、特異度 61.08% であった。早期病期（T1-T3、N0、M0、Fuhrman grade 1-3）に限定した解析では、より高いカットオフ値 48.55 がより高い予測精度を示し（感度 63.16%、特異度 81.71%）、早期患者における予後予測能の高さが示唆された。

OS に関しては、病理学的病期（pT3 + 4）、リンパ節転移および遠隔転移、Fuhrman grade で有意差が認められた一方、PSMB8-AS1 発現レベルでは有意差は認められなかった（Fig 3）。

【早期 RCC における予後的意義】

早期病期（T1-T3、N0、M0、Fuhrman grade 1-3）のサブグループにおいて、PSMB8-AS1 高発現群は有意に短い PFS を示した（log-rank P = 0.001）。ROC 解析では、カットオフ値 48.55 を用いることで、このサブグループにおける PSMB8-AS1 の予測能が確認された（Fig 4）。

【多変量解析】

Cox 比例ハザードモデルによる解析では、PSMB8-AS1 高発現は全コホートにおいて PFS の独立した予測因子であった（ハザード比［HR］：4.28、P = 0.00098；S2 Table A）。同様に、早期病期サブグループにおいても独立した予測因子として同定された（HR：3.43、P = 0.0115；S2 Table B）。一方、OS に関しては、PSMB8-AS1 を含むいずれの臨床病理学的因子も独立した予測因子とはならなかった（S3 Table）。

【RCC 細胞株における PSMB8-AS1 の機能的役割】

PSMB8-AS1 は、正常腎上皮細胞 RPTEC と比較して RCC 細胞株 769-P および ACHN で高発現していた（Fig 5A）。siRNA による PSMB8-AS1 のノックダウンは、両細胞株において細胞増殖および侵襲能を有意に抑制した（Fig 5B-5D）。

【PSMB8-AS1 による miR-204/211-TFAP2A 軸の調節】

バイオインフォマティクス解析により、PSMB8-AS1 が miR-204 および miR-211 の競合的内因性 RNA（ceRNA）として機能する可能性が示唆された。両 miRNA は正常細胞と比較して RCC 細胞株で有意に低発現していた（Fig 6A）。PSMB8-AS1 のノックダウンにより miR-204/211 の発現は回復した（Fig 6B）。

miR-204/211 の既知の標的である TFAP2A は RCC 細胞で高発現しており（Fig 6C）、PSMB8-AS1 ノックダウンによりその発現は低下した（Fig 6D）。ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、miR-204/211 が TFAP2A の 3′ UTR に直接結合することが確認された。RCC 細胞に miR-204/211 mimic と TFAP2A 野生型 3′ UTR ベクターを共トランスフェクションするとルシフェラーゼ活性は低下したが、変異型ベクターではこの抑制効果は消失した（Fig 6E）。

これらの結果は、PSMB8-AS1-miR-204/211-TFAP2A の調節軸が RCC の進展に寄与することを支持するものである。

【PSMB8-AS1 ノックダウン後の TFAP2A による RCC 細胞侵襲能のレスキュー】

PSMB8-AS1 ノックダウンにより観察された侵襲能低下が TFAP2A を介しているかを検証するため、レスキュー実験を実施した。TFAP2A の強制発現により、siPSMB8-AS1 トランスフェクションによって抑制された RCC 細胞の侵襲能は有意に回復した。また、TFAP2A の過剰発現（Fig 7A）は、siPSMB8-AS1 による細胞増殖抑制（Fig 7B）および細胞侵襲抑制（Fig 7C）を部分的に逆転させた。

これらの結果は、TFAP2A が PSMB8-AS1 の下流で作用する重要なエフェクターとして、RCC 細胞の侵襲および増殖の調節に関与していることを示している。

5. 考察

本研究では、PSMB8-AS1 を ccRCC における臨床的に重要な lncRNA として初めて同定し、その予後的意義および腫瘍促進的機能を明らかにした。PSMB8-AS1 は、ICI 耐性を示す集合管がん（CDC）のマイクロアレイ解析により最初に見出され、悪性度の高い腎腫瘍で高発現することが示唆された。この知見を踏まえ、RCC の中で最も頻度の高い ccRCC においてその役割をさらに検討した。

本研究では、PSMB8-AS1 の発現が ccRCC 腫瘍組織で隣接正常組織よりも有意に高く、無増悪生存期間（PFS）と独立して関連することを示した。特に、この関連は全コホートのみならず、早期病期（T1-T3、N0、M0、Fuhrman grade 1-3）の患者においても認められ、良好な臨床背景を有する患者においても術後再発のバイオマーカーとして有用である可能性を示唆する。

ROC 解析および Cox 回帰解析により PSMB8-AS1 の予後的有用性が示されたものの、その臨床応用性は探索的段階にとどまる。本研究で設定したカットオフ値は単一コホートに基づくものであり、独立した外部データセットでの検証が必要である。今後は、外部検証を含む多変量予測モデルの構築や、非侵襲的検出法の開発などを通じて、PSMB8-AS1 の臨床的有用性を確立する必要がある。

全生存期間（OS）との有意な関連が認められなかった点については、追跡期間の相対的短さ、再発後の救済治療の違い、非がん関連死亡の影響など、複数の要因が関与している可能性がある。PSMB8-AS1 の OS に対する予測能を評価するためには、より長期の追跡研究が求められる。

機能解析では、PSMB8-AS1 のノックダウンにより細胞増殖および侵襲能が有意に抑制され、腫瘍悪性度に寄与することが示された。機序的には、miR-204/211 および TFAP2A を介した調節軸が同定された。PSMB8-AS1 は ceRNA として miR-204/211 を吸着し、その結果として転写因子 TFAP2A の発現が上昇する。TFAP2A は RCC [9] を含む複数のがん種で腫

瘍促進的役割を果たすことが知られている［10,11］。また、miR-204 は RCC において複数の経路を介して腫瘍抑制的に作用することが報告されている ［12］。さらに、TCGA、GTEx、TIMER2、HPA などの大規模データベースを用いた解析では、TFAP2A が多くのがん種で mRNA およびタンパク質レベルで高発現していることが示されており、先行研究と一致する［13］。

重要な点として、レスキュー実験により TFAP2A の過剰発現が PSMB8-AS1 ノックダウンによる侵襲抑制効果を逆転させることが示され、PSMB8-AS1 の腫瘍促進作用が miR-204/211-TFAP2A 軸を介して発揮されることが直接的に示された。本研究では PD-L1 の直接的検証は行っていないが、先行研究では TFAP2A が複数のがん種で PD-L1 の転写活性化に関与することが示されている。このため、PSMB8-AS1-miR-204/211-TFAP2A 軸に PD-L1 が関与する可能性は今後検証すべき重要な仮説である。

本研究の結果は、PSMB8-AS1 が免疫チェックポイント阻害剤耐性に関与する可能性を示唆するが、本研究では免疫関連アッセイを実施していない。そのため、腫瘍免疫相互作用に関する解釈には慎重を要する。今後は、免疫浸潤解析や免疫機能アッセイを組み合わせることで、PSMB8-AS1 の腫瘍免疫微小環境における役割を明らかにする必要がある。

さらに、PSMB8-AS1 が RCC 細胞において悪性形質を促進することを示した一方で、正常腎上皮細胞における PSMB8-AS1 抑制の影響は本研究では評価していない。標的治療としての安全性および特異性を検討するためには、正常細胞における細胞毒性の有無を評価する追加研究が必要である。PSMB8-AS1 の発現は正常腎組織および RPTEC 細胞で低いことから、治療標的としての安全域が存在する可能性が示唆されるが、この点についても直接的な機能的検証が求められる。

腎がんにおいて、TFAP2A は免疫抑制および PD-L1 発現促進に関与する可能性が示唆されている。デュアルルシフェラーゼアッセイによる実験的検証では、TFAP2A が PD-L1 プロモーターに結合し、その転写活性を増強することが確認されている。

本研究で標的遺伝子として同定された PSMB8-AS1 は、ICI に不応性を示した CDC 患者の腫瘍組織で高発現していた。TFAP2A が免疫応答に関与するのであれば、PSMB8-AS1 を標的とすることで腫瘍抑制性 miRNA である miR-204 の発現が上昇し、結果として TFAP2A の発現が低下する可能性がある。これにより PD-L1 の転写活性が抑制され、免疫チェックポイント阻害療法に対する抵抗性が感受性へと転じる可能性が考えられる。

本研究の知見は、PSMB8-AS1 が膠芽腫、膵がん、大腸がん、肺がん、膀胱がんなど多様ながん種で腫瘍促進的に作用することを報告した先行研究と一致する ［14-16］。複数のがん種において一貫して腫瘍促進作用を示すことは、PSMB8-AS1 が広範ながん領域において重要な lncRNA であることを示唆する［17,18］。

しかしながら、本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、後ろ向き研究であり、単一施設のコホートであるため、選択バイアスが生じた可能性がある。第二に、提唱した調節機構の in vivo での検証が行われていない点が挙げられる。また、本研究には技術的な制約も存在する。RNA は FFPE 検体から抽出しており、RNA の品質が低下する可能性がある。

この問題を最小限に抑えるため、RT-qPCR では FFPE 由来 RNA に適した短いアンプリコンを設計したが、DV200 値などの詳細な RNA 品質指標を提示していない点は留意すべきである。今後は、新鮮凍結組織を用いた解析や、追加の RNA 品質評価を組み合わせることで、本研究の信頼性をさらに高める必要がある。

PSMB8-AS1 の臨床的・治療的意義を確立するためには、前向き研究や動物モデルを用いた検証が求められる。また、PSMB8-AS1 ノックダウン後の網羅的トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を行い、miR-204/211-TFAP2A 軸以外の下流経路を明らかにすることも重要である。

さらに、本研究で実施した機能解析は 769-P および ACHN の 2 種類の RCC 細胞株に限られており、腎細胞がんの生物学的多様性を十分に反映していない可能性がある。患者由来細胞、オルガノイド、in vivo の異種移植モデルや整形外科的モデルなど、より多様な実験系で PSMB8-AS1 抑制が腫瘍増殖や転移を一貫して抑制するかを検証する必要がある。

総括すると、PSMB8-AS1 は ccRCC の早期再発を予測する新規バイオマーカーであり、治療標的となり得る分子である。PSMB8-AS1 が関与する miR-204/211-TFAP2A 軸は RCC の病態解明に新たな知見をもたらし、今後のバイオマーカーに基づく患者層別化戦略に寄与する可能性がある。

6. 謝辞

本研究にあたり、ご指導頂いた白石晃司教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました平田寛先生に心より拝謝申し上げます。また研究にあたってご支援いただいた共著者の先生方や実験室のスタッフに深謝いたします。

7. 参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of inci
dence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49. https://doi.org/10.3322/caac.21660 PMID:
33538338

2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin. 2023;73(1):17-48. https://doi.org/10.3322/caac.21763 PMID:
36633525

3. American Cancer Society. Survival rates for kidney cancer (renal cell carcinoma, RCC), by stage. 2023. https://www.cancer.org/cancer/kidney-can
cer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html

4. Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma. N Engl J Med. 2017;376(4):354-66. https://doi.org/10.1056/

NEJMra1601333 PMID: 28121507
5. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med. 2018;378(14):1277-90. https://doi.org/10.1056/nejmoa1712126
6. Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways. Cancer Cell. 2016;29(4):452-63. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.010
PMID: 27070700
7. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. Cancer Res. 2017;77(15):3965-81. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634 PMID: 28701486
8. Ueno K, Hirata H, Majid S, Yamamura S, Shahryari V, Tabatabai ZL, et al. Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by downregulating RhoC and FZD4. Mol Cancer Ther. 2012;11(1):244-53. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0592 PMID: 22057916
9. Lin P-H, Hsieh C-H, Yu K-J, Shao I-H, Chuang C-K, Hsu T, et al. AP-2α gene deregulation is associated with renal cell carcinoma patient survival. BMC Cancer. 2024;24(1):966. https://doi.org/10.1186/s12885-024-12526-w PMID: 39112969
10. Yang J, Gao Y, Yao S, Wan S, Cai H. TFAP2A promotes cervical cancer via a positive feedback pathway with PD-L1. Oncol Rep. 2023;49:114.https://doi.org/10.3892/or.2023.8551
11. Cui Y, Zhang C, Ma S, Guan F. TFAP2A-induced SLC2A1-AS1 promotes cancer cell proliferation. Biol Chem. 2021;402(6):717-27. https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0290 PMID: 33580997
12. Xiong F, Liu K, Zhang F, Sha K, Wang X, Guo X, et al. MiR-204 inhibits the proliferation and invasion of renal cell carcinoma by inhibiting RAB22A expression. Oncol Rep. 2016;35(5):3000-8. https://doi.org/10.3892/or.2016.4624 PMID: 26883716
13. Niu C, Wen H, Wang S, Shu G, Wang M, Yi H, et al. Potential prognosis and immunotherapy predictor TFAP2A in pan-cancer. Aging (Albany NY). 2024;16(2):1021-48. https://doi.org/10.18632/aging.205225 PMID: 38265973
14. Zhang H, Zhu C, He Z, Chen S, Li L, Sun C. LncRNA PSMB8-AS1 contributes to pancreatic cancer progression via modulating miR-382-3p/STAT1/PD-L1 axis. J Exp Clin Cancer Res. 2020;39(1):179.

https://doi.org/10.1186/s13046-020-01687-8 PMID: 32891166
15. Shen G, Mao Y, Su Z, Du J, Yu Y, Xu F. PSMB8-AS1 activated by ELK1 promotes cell proliferation in glioma via regulating miR-574-5p/RAB10. Biomed Pharmacother. 2020;122:109658. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109658 PMID: 31812014
16. Kang Z, Dou Q, Huang T, Tu M, Zhong Y, Wang M, et al. An angiogenesis-related lncRNA signature for the prognostic prediction of patients with bladder cancer and LINC02321 promotes bladder cancer progression via the VEGFA signaling pathway. Mol Med Rep. 2023;27: 38.https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12925
17. Giulietti M, Righetti A, Principato G, Piva F. LncRNA co-expression network analysis reveals novel biomarkers for pancreatic cancer. Carcinogenesis. 2018;39(8):1016-25. https://doi.org/10.1093/carcin/bgy069 PMID: 29796634
18. Kovaleva OV, Podlesnaya PA, Kudinova ES, Sinyov VV, Mochalnikova VV, Kushlinskii NE, et al. Clinical Significance of Epigenetic Factors in the Development of Tumor Cell Resistance to the Cytotoxic Activity of Macrophages. Bull Exp Biol Med. 2025;178(5):626-30. https://doi.org/10.1007/s10517-025-06387-x PMID: 40293594

8. 図表

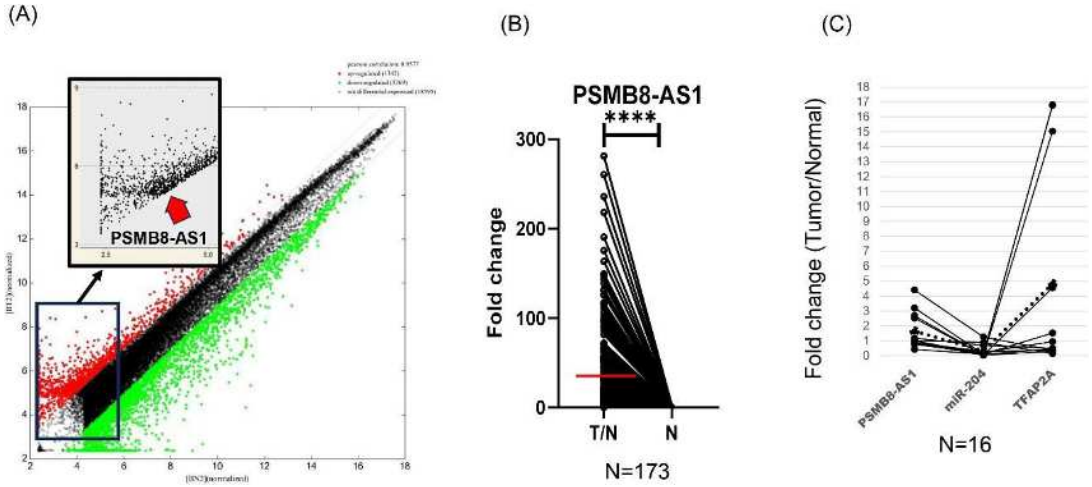


図 1. lncRNA アレイ解析結果および臨床検体における PSMB8-AS1 の発現

(A) ICI 不応性の集合管がん症例において、1,342 種の lncRNA が上方制御されていたことを示す散布図。

(B) 腫瘍組織 (T) と隣接正常組織 (N) における PSMB8-AS1 のペア解析 (n=173)。各点は個々のサンプルを示し、同一患者由来の T と N は線で結んで示した。視覚化のため、発現量は正常組織に対する fold change として表示した。

(C) ccRCC 患者 16 例の腫瘍組織 (T) および隣接正常腎組織 (N) における PSMB8-AS1、miR-204、TFAP2A の定量的 RT-PCR 解析。腫瘍と正常組織の比較には Wilcoxon 符号付順位検定を用いた。

NS：有意差なし、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001

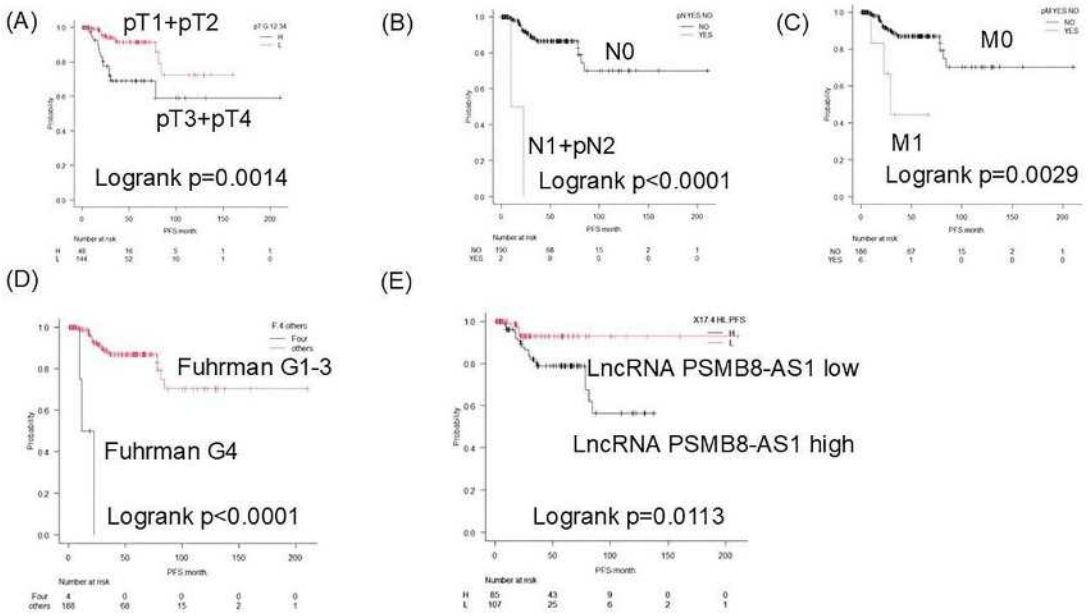


図 2. 再発予測に用いる複数の指標に基づく Kaplan-Meier 解析

病理学的腫瘍ステージ（pT1-pT4）に基づき、pT ステージを定義した。pN は病理学的リンパ節転移（pN0-pN2）、pM は病理学的遠隔転移（pM0-pM1）を示す。

H および L は、ROC 解析により決定された PSMB8-AS1 の高発現群（High）および低発現群（Low）を示す。

(A) pT3 + pT4 と pT1 + pT2 の比較。

(B) pN1 + pN2 と pN0 の比較。

(C) pM1 と pM0 の比較。

(D) Fuhrman grade 4 と grade 1 + 2 + 3 の比較。

(E) lncRNA PSMB8-AS1 高発現群（H）と低発現群（L）の比較。

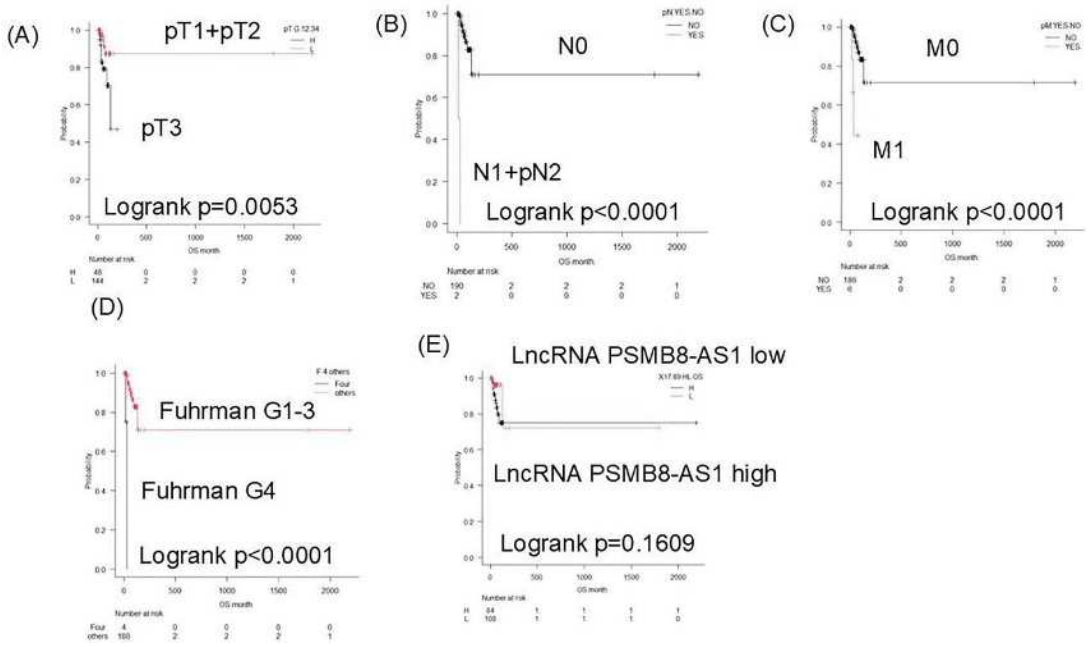


図 3. 全生存期間（OS）に対する複数の指標を用いた Kaplan-Meier 解析

病理学的腫瘍ステージ（pT1-pT4）に基づき pT ステージを定義した。pN は病理学的リンパ節転移（pN0-pN2）、pM は病理学的遠隔転移（pM0-pM1）を示す。

H および L は、ROC 解析により決定された PSMB8-AS1 の高発現群 (High)および低発現群 (Low) を示す。

(A) pT3 + pT4 と pT1 + pT2 の比較。

(B) pN1 + pN2 と pN0 の比較。

(C) pM1 と pM0 の比較。

(D) Fuhrman grade 4 と grade 1 + 2 + 3 の比較。

(E) lncRNA PSMB8-AS1 高発現群 (H) と低発現群 (L) の比較。

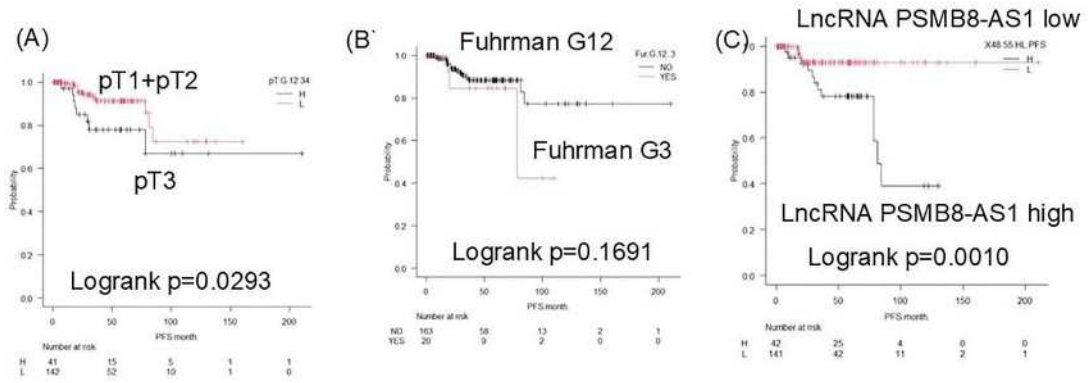


図 4. pT1-3N0M0、Fuhrman grade 1-3 の患者における再発予測のための Kaplan-Meier 解析
病理学的腫瘍ステージ（pT1-pT4）に基づき pT ステージを定義した。pN は病理学的リンパ節転移（pN0-pN2）、pM は病理学的遠隔転移（pM0-pM1）を示す。
H および L は、ROC 解析により決定された PSMB8-AS1 の高発現群 (High)および低発現群 (Low) を示す。
(A) pT3 と pT1 + pT2 の比較。
(B) Fuhrman grade 3 と grade 1 + 2 の比較。
(C) lncRNA PSMB8-AS1 高発現群 (H) と低発現群 (L) の比較。

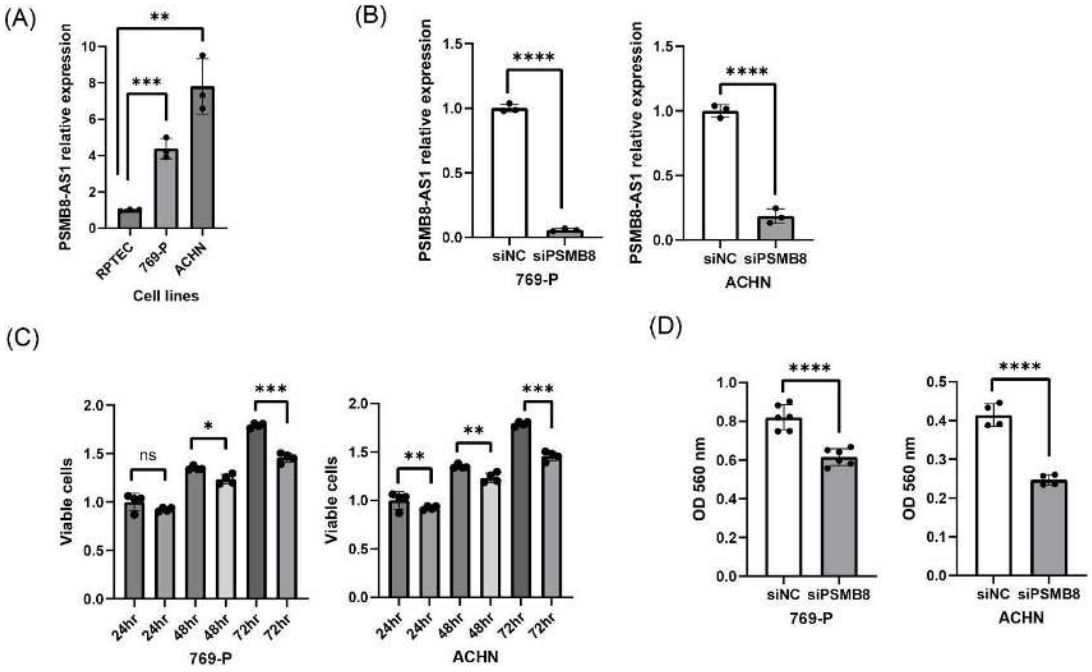


図 5. lncRNA PSMB8-AS1 ノックダウンが腎がん細胞株（ACHN および 769-P）の機能に及ぼす影響

(A) PSMB8-AS1 の発現は、正常腎上皮細胞 RPTEC と比較して、腎がん細胞株 ACHN および 769-P で有意に高かった。以降の実験では、両細胞株に si-PSMB8-AS1 またはコントロール siRNA（si-NC）を一過性にトランスフェクションした。

(B) 腎がん細胞株における PSMB8-AS1 ノックダウンの検証。

(C) MTS アッセイによる細胞増殖能の評価。PSMB8-AS1 の発現抑制により、トランスフェクション 48 時間後の細胞増殖は両細胞株で有意に低下した。

(D) 侵襲アッセイ。PSMB8-AS1 ノックダウンにより、両細胞株の侵襲能はコントロール群と比較して有意に低下した。

データは個々のデータポイントとして示し、バーは平均値 ± 標準偏差（SD）を示す。各群 n = 3。統計解析には一元配置分散分析（one-way ANOVA）および Tukey 法による多重比較検定を用いた。

*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001

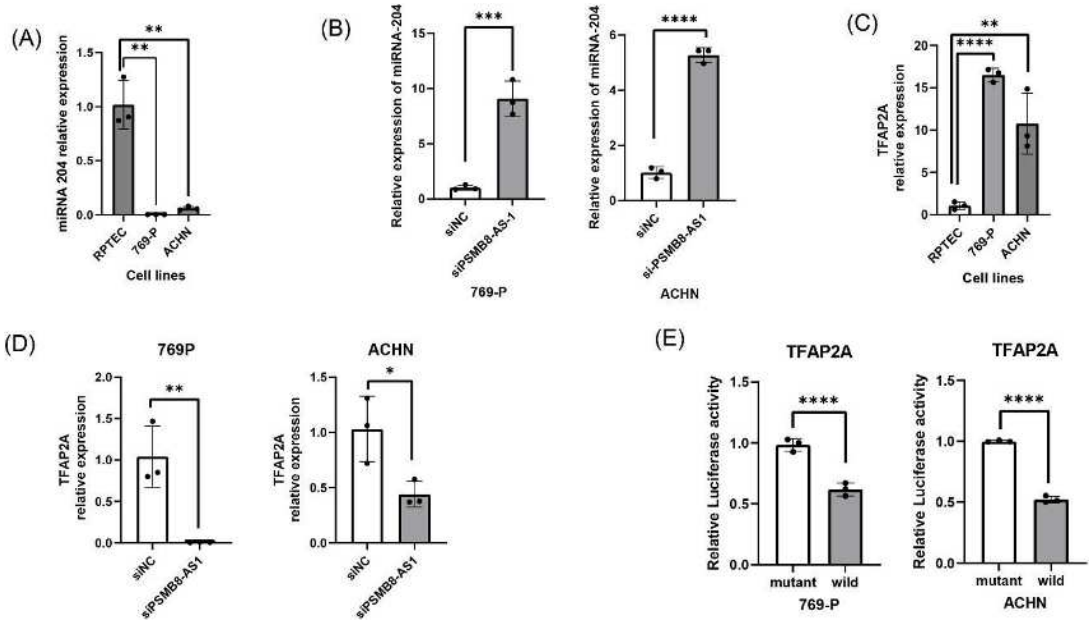


図 6. lncRNA PSMB8-AS1 ノックダウンが腎がん細胞株 (ACHN および 769-P) における miR-204 および TFAP2A 発現に及ぼす影響。

(A) miR-204 の発現は、正常腎上皮細胞 RPTEC と比較して 2 種類の腎がん細胞株で有意に低かった。

(B) PSMB8-AS1 のノックダウンにより、ACHN および 769-P の両細胞株で、miR-204 の発現が有意に上昇した。

(C) TFAP2A の発現は、正常腎上皮細胞と比較して、2 種類の腎がん細胞株で有意に高かった。

(D) ルシフェラーゼアッセイ。miR-204 と、野生型または変異型配列を有する TFAP2A 3'UTR ベクターを腎がん細胞株 (ACHN および 769-P) に共にトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に細胞溶解液を回収し、相対ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は変異型 3'UTR ベクターを導入した細胞の活性と比較した。

(E) PSMB8-AS1 ノックダウンにより、ACHN および 769-P の両細胞株で、TFAP2A の発現が有意に低下した。

データは個々のデータポイントとして示し、バーは平均値 ± 標準偏差 (SD) を示す。各群 n = 3。統計解析には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および Tukey 法による多重比較検定を用いた。

*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001

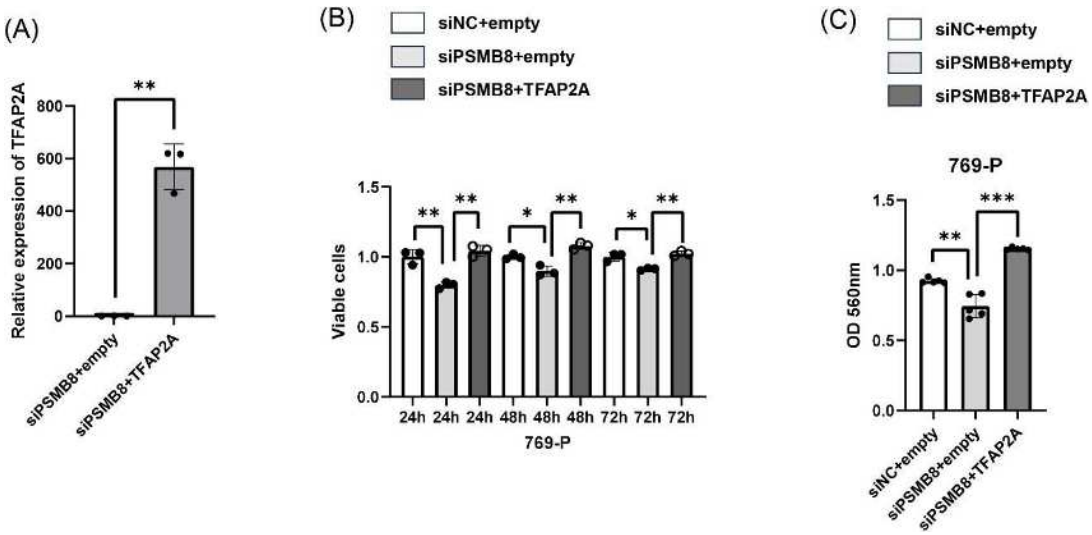


図 7. PSMB8-AS1 ノックダウンにより抑制された侵襲能は TFAP2A の過剰発現によりレスキューされる

(A) qRT-PCR による TFAP2A 過剰発現の確認。

(B) MTS アッセイ (si-NC + empty、si-NC + TFAP2A、si-PSMB8-AS1 + TFAP2A)

(C) 細胞侵襲アッセイ (si-NC + empty、si-NC + TFAP2A、si-PSMB8-AS1 + TFAP2A)