

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10733

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌の早期診断マーカーとしての血清中miRNAの探索と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of circulating miRNAs in Ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

西 洋孝 (NISHI, HIROTAKA)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：60307345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌患者の血中miRNAを網羅的に調べ、腫瘍マーカー候補としてのmiRNAを同定した。realtime RT-PCR法にて健常者、良性卵巣腫瘍および卵巣明細胞癌患者の血中のこれらmiRNAを定量解析し、臨床背景と相関性を認めたmiR-146aおよびmiR-191の腫瘍マーカーとしての臨床的意義が示唆された。miR-146aの標的遺伝子として、クロマチンリモデリングに関わるとされるARID1Aが同定された。ARID1Aの変異や機能低下は卵巣明細胞癌の発生に関わると考えられており、miR-146aによるARID1Aの発現抑制が卵巣明細胞癌の発生メカニズムに関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果から血清中miR-146aおよびmiR-191の発現は、感度・特異度に優れた卵巣明細胞癌のバイオマーカーとなる可能性が高く、診断キットなどへの応用が比較的容易に行えるものと思われる。アッセイも末梢血の採血のみであるため、患者に対する侵襲度も低い。そのため、本研究で得られる成果をもとに、企業等との共同開発による診断方法の確立を考えている。また、miR-146aとその標的遺伝子ARID1Aの相関性の機能解析により、プレシジョン医療等新規治療法の開発の端緒となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed circulating serum miRNAs in patients with ovarian clear cell carcinoma using the microRNA array. We found that the expression of several miRNAs was significantly different in ovarian clear cell carcinoma samples compared with control samples. Among these miRNAs, the expression level of miR-146a and miR-191 were significantly different in the serum samples from ovarian clear cell carcinoma patients, compared with healthy controls using realtime RT-PCR. Also, we found that miR-146a targeted ARID1A which is related to chromatin remodeling. Overexpression of miR-146a significantly decreased the ARID1A expression in ovarian clear cell carcinoma cell lines. Our results provide evidence that regulation of the ARID1A expression by miR-146a may represent a mechanism for ovarian clear cell carcinogenesis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：miRNA 卵巣癌 明細胞癌 腫瘍マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧米に比べ本邦に多く悪性卵巣腫瘍全体の約 1/4 を占める卵巣明細胞癌は、化学療法に対する抵抗性と転移浸潤能が高く悪性度の高い予後不良な疾患である。卵巣癌の腫瘍マーカーとして CA125 が知られているが、卵巣明細胞癌ではその値はあまり上昇しないため、卵巣明細胞癌に対する特異的腫瘍マーカーの開発が必要と考えられている。卵巣明細胞癌の腫瘍マーカーとなりうる microRNA (miRNA) を同定できれば、その早期発見に寄与できるのみならず、治療効果の判定や再発診断の重要なツールとなる。

2. 研究の目的

miRNA の発現パターンは、がんを含む種々の疾患においてダイナミックに変化するが、診断・治療に関するバイオマーカーとしても有望視されている。本研究では、有用な腫瘍マーカーの存在しない卵巣明細胞癌の早期診断を可能とするような血清中 miRNA の探索・同定を行う。我々はすでに、卵巣明細胞癌患者における循環血液中の miRNA を網羅的に解析し、発現量が大きく変化していた miRNA (miR-146a、miR-191、miR-484 および miR-574-3p) を同定した。これらと進行期・予後・治療に対する奏効性や組織型などとの相関性を調べ、末梢循環 miRNA の臨床的意義を探る。そして、これら miRNA の候補標的遺伝子を *in silico* 解析により検索し、プレシジョン医療等新規治療法を確立するための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 検体採取と血清中 miRNA 発現量の測定

インフォームドコンセントを得た後、健常者、卵巣明細胞癌および子宮内膜症患者から 10ml の末梢血液検体を採取した。血清分離と total RNA の抽出精製を行い、解析まで -70 で保存した。この total RNA を用い、血清中 miR-146a、miR-191、miR-484 および miR-574-3p の発現量を real time RT-PCR 法にて解析した。最終的な血清中各々の miRNA の発現量と臨床情報の相関性を統計学的に解析し、卵巣明細胞癌の早期診断や治療効果判定の有用性を検証した。

(2) 腫瘍マーカー候補の miRNA の標的遺伝子の同定

血清中 miRNA のデータと臨床情報とをつきあわせ中間解析を行い、腫瘍マーカー候補 miRNA の絞り込みを行った。絞り込まれた miR-146a と miR-191 に関し *in silico* 解析 (miRNA BLAST 解析) を行い、これら miRNA の候補標的遺伝子を探索した。がんの発生・進展に関わるとされる既知の遺伝子やメカニズムが判明しているなどを基準に、同定された候補標的遺伝子の絞り込みを行った。

(3) 腫瘍マーカー候補 miRNA の標的遺伝子の機能解析

miR-146a の標的遺伝子候補として、SWI-SNF クロマチンリモデリング複合体の重要な構成因子である BAF250a をコードしている ARID1A が見出された。miR-146a 強制発現系の検討のために、miR-146a 発現プラスミドを作製した。リポーターアッセイのために、ARID1A の mRNA の 3' 非翻訳領域中の miR-146a 結合領域である相補的配列を含む luciferase construct を作製した。卵巣明細胞癌細胞株 RMG-1、RMG-2 および Koc7c にこれらを co-transfection し、ルシフェラーゼによるリポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性の変化を測定し、miR-146a の ARID1A に対する結合の有無と translation に対する影響を確認した。また、miR-146a の強制発現系における ARID1A の発現を real time RT-PCR 法や western blot 法にて確認した。

4. 研究成果

卵巣明細胞癌患者の血中 miRNA をマイクロアレイを用いて網羅的に調べ、腫瘍マーカー候補として miR-146a、miR-191、miR-484 および miR-574-3p を同定した。卵巣明細胞癌 30 例、子宮内膜症 17 例、健常者 18 例から循環血液中の total RNA を抽出し、miR-146a、miR-191、miR-484 および miR-574-3p が、腫瘍マーカーとなり得るか real time RT-PCR 法にて定量解析した。miR-146a と miR-191 の発現が、健常者と卵巣明細胞癌との比較において差異が認められ、腫瘍マーカーとしての臨床的意義が示唆された (図 1, 2)。

また、ルシフェラーゼアッセイにより miR-146a の標的遺伝子として ARID1A が見出された。miR-146a の強制発現により、ARID1A の発現は抑制された。

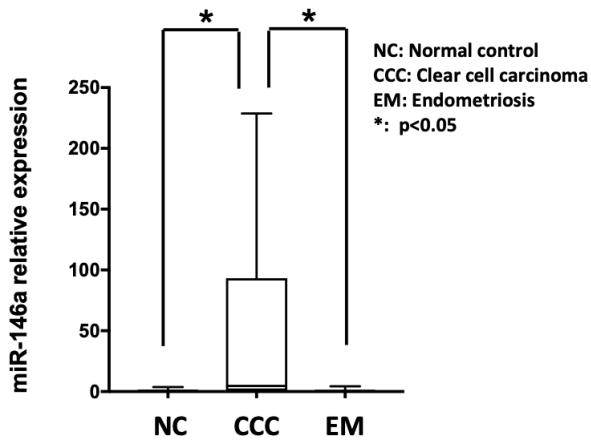


図 1

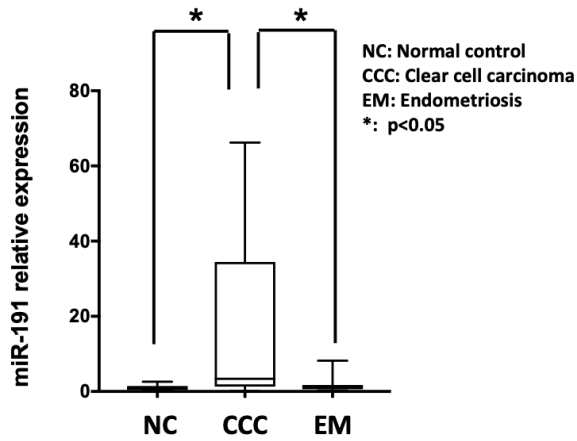


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡本愛光

ローマ字氏名：AIKOU OKAMOTO

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20204026

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。