

令和元年6月1日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11162

研究課題名(和文) 卵巣癌のEMTおよび腹膜中皮のMMTに関与するmiRNAの解明と制御に向けた研究

研究課題名(英文) A novel miRNA regulates the EMT and MMT of peritoneal mesothelium in ovarian cancer

研究代表者

寺井 義人(Terai, Yoshito)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：90278531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：EMTを制御する新たな遺伝子を同定するために、miRNAマイクロアレイを用い、EMTに関わる新規miRNAとして、miRNA 36,248個中、CD24陽性細胞から分泌される培養液によるmiRNAマイクロアレイの結果から、CD24陽性細胞に特異的なmiR-92、miR-486、miR-575を特異的miRNAとして特定した。これらは、卵巣癌(12例)での発現が、良性卵巣腫瘍(32例)に比べて有意に高いことも確認した。つまり、これらの特異miRNAが関与するEMTを特異miRNAの機能をブロックし制御することで、難治性進行卵巣癌に対する新たな治療戦略として、早期臨床応用が十分期待されると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌に対するEMT現象についての研究は、国内外で多くされてきているが、卵巣癌患者血液や腹水から分泌されるエクソソーム内のmiRNAによるEMT現象の制御に関する研究は少ない。これら特異的miRNAを用いて、EMT現象の制御に関する研究は独創的であり、新たな治療戦略として期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：To identify new unknown genes that control EMT of ovarian cancer, we identified miR-92, miR-486, miR-575 as specific miRNAs related to EMT, among 36,248 miRNAs in the culture solution secreted from CD24 positive cells using by miRNA microarrays. These specific miRNAs were also confirmed that the expression of these miRNA in ovarian cancer (12 cases) was significantly higher than benign ovarian tumors (32 cases). These finding suggested that the blocking or controlling of the function of these specific miRNAs will be expected as a new therapeutic strategy for refractory advanced ovarian cancer by blocking EMT.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 EMT miRNA 浸潤・転移

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、広範囲に腹膜播種を起こすことと転移病巣や再発病巣は key drug である白金製剤に対する耐性を示すため、生存率が最も低い婦人科癌である。我々は、卵巣癌における腹膜播種は、癌細胞の浸潤・転移過程において、細胞間接着や細胞極性を失い、間質内へ浸潤し転移する現象として上皮間葉形態転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)により起こっていることを明らかにしてきた (Takai M, Terai Y, et al. J Ovarian Res 2014)。しかし、腹膜播種は癌細胞による EMT だけでなく、転移先の足場となる宿主側の腹膜中皮細胞など癌微小環境(ニッチ)の変化が重要であるとされている。我々は、腹膜中皮細胞に注目し、腹膜中皮細胞は間葉形態変換(MMT: mesothelial-mesenchymal transition)をおこし、EMT を起こした癌細胞の浸潤を受け入れて腹膜播種が成立することを明らかにした (Ono JY, Terai Y, et al. AJP-Endocrinol Metab 2014, Nakamura M, Terai Y, Ohmichi M. Gynecol Oncol. 2015)。最近 EMT にはニッチとの関連が注目されており、このニッチの制御が癌浸潤・転移抑制に重要とされているが、腹膜中皮細胞の MMT 現象と EMT 現象の制御メカニズムは明らかになっていない。一方でニッチの制御は細胞から分泌された小胞エクソソームが関与していることが明らかになった。エクソソームとは脂質二重膜で形成される細胞外顆粒であり、様々なシグナル伝達物質、mRNA や miRNA といった遺伝子発現調節因子が含まれていることがわかってきた (Williams DA. Nature 2006)。そこで我々は、卵巣癌が EMT を起こし腹膜播種するには、卵巣癌から分泌されるエクソソームに含まれる miRNA などにより、ニッチである腹膜中皮細胞が MMT を起こすことで卵巣癌の腹膜播種が成立していると考え、この EMT により発現が誘導されるエクソソームに含まれる miRNA を特定し、その発現を制御することが出来れば、卵巣癌のみならず、腹膜中皮細胞も標的とし、より確実に卵巣癌の腹膜播種を制御することが可能となると考えた。

2. 研究の目的

卵巣癌白金製剤耐性株 (Caov-3、A2780CP) を用い、MACS 法で分離した CD24 陽性細胞・CD24 陰性細胞で、EMT を制御する新たな遺伝子を同定するために、miRNA マイクロアレイを用い、CD24 陽性で発現上昇する miRNA と患者検体のエクソソームから抽出した miRNA をコンピューターリサーチし、EMT に関わる新規 miRNA を同定。EMT を制御する miRNA の機能をブロックする Locked Nucleic Acids (LNA) inhibitor (Exiqon 社) の LNA-miRNA を作成し、EMT に関わる遺伝子の発現変化を in vitro で調べ、さらに白金製剤を投与した場合の白金製剤耐性性への影響を細胞増殖能および浸潤能で検討する。また、2 槽式チャンバーを用いた混合培養を用いて、ヒト腹膜中皮細胞株 (MES-F) の MMT 現象による細胞形態変化、細胞増殖能、浸潤能への影響、MMT に関わる遺伝子の発現の影響を調べる。

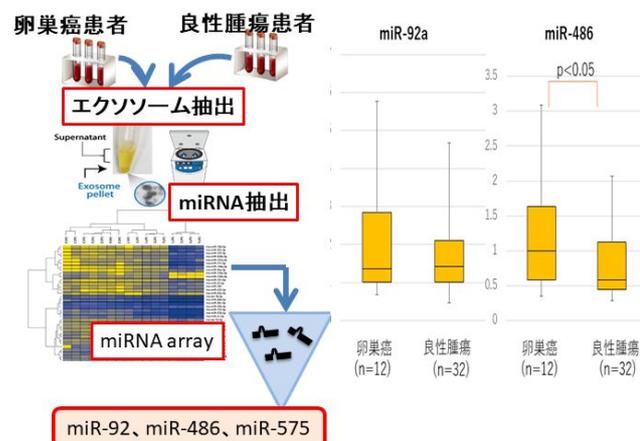
3. 研究の方法

(1) 承諾を得た卵巣癌患者および良性腫瘍(子宮筋腫、卵巣嚢腫)患者の血清および腹水を回収し、遠心後の上清に Exoquick (SBI) を加え、エクソソームを抽出する。さらに単離したエクソソームを SeraMir™ Exosome RNA Amplification (SBI) を用いて miRNA を抽出し、良性腫瘍群を control 群とし TaqMan Array R miRNA Card を用いて miRNA array 解析を行う。解析結果から発現増加群の miRNA を miRNA database を用いて同定する。

(2) 卵巣癌から分泌されたエクソソームから得られた特異的 miRNA と CD24 陽性 Caov-3、A2780CP 細胞株から同定された miRNA との共通因子を絞り込み、EMT に関わる新規 miRNA を同定する。

4. 研究成果

大学倫理委員会承認の下で、卵巣癌患者 5 例および良性卵巣腫瘍患者 5 例の血清および腹水を用いて miRNA array 解析を行い、6,631 種類の miRNA から卵巣癌で発現が上昇する miR-92、miR-486、miR-575 を特異的 miRNA として特定し、卵巣癌 12 例、良性卵巣腫瘍 32 例の血清で発現を確認した(図 3)。この miR-92、miR-486、miR-575 は、肺癌、子宮頸癌や卵巣癌などで発現の上昇が報告されているが、機能は未だ解明されていない。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Kogata Y, Tanaka T, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M, Foretinib (GSK1363089) induces p53-dependent apoptosis in endometrial cancer, *Oncotarget*, (査読あり) 9; 22769-22784; 2018.
2. Tanaka T, Terai Y, Fujiwara S, Tanaka Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Ohmichi M, The detection of sentinel lymph nodes in laparoscopic surgery can eliminate systemic lymphadenectomy for patients with early stage endometrial cancer, *Int J Clin Oncol*. (査読あり) 23: 305-313; 2018.
3. Tanaka T, Terai Y, Fujiwara S, Tanaka Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Ohmichi M. The efficacy of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in endometrial cancer. *PLoS One*. (査読あり) 12 e0177019. doi: 10.1371; 2017
4. Nakamura K, Terai Y, Hayashi M, Fujiwara S, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Ohmichi M. CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncol Rep*. (査読あり) 37:3189-3200; 2017

〔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：大道 正英

ローマ字氏名：Ohmichi Masahide

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10283764

研究分担者氏名：林 正美

ローマ字氏名：Hayashi Masami

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 00551748

研究分担者氏名：恒遠 啓示

ローマ字氏名：Tsunetoh Satoshi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 70388255

研究分担者氏名：佐々木 浩

ローマ字氏名：Sasaki Hiroshi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 80432491

研究分担者氏名：田中 良道

ローマ字氏名：Tanaka Yoshimichi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 10625502

研究分担者氏名：藤原 聡枝

ローマ字氏名：Fujiwara Satoe

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 90707960

研究分担者氏名：兪 史夏

ローマ字氏名：Yo Saha

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤医師

研究者番号(8桁): 80625674

研究分担者氏名：田辺 晃子

ローマ字氏名：Tanabe Akiko

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号(8桁): 70454543

(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。