

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16798

研究課題名(和文)血管新生因子に着目した卵巣癌のベバシズマブ耐性機序とPAI-1阻害の有効性の検討

研究課題名(英文) Identification of the mechanism underlying bevacitumab resistance focusing on PAI-1

研究代表者

中塚 えりか (Nakatsuka, Erika)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00816514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌におけるベバシズマブ(Bev)耐性化のメカニズムを作成したBev耐性モデルマウスで検討した。血管新生関連遺伝子発現解析を行いBev耐性化腫瘍ではPAI-1の発現が亢進していることを確認した。さらにmiRNA microarrayなどによりPAI-1の発現を制御する3つのmiRNA(miR-30b-5p, 143-3p and 192-5p)の発現が低下していることを確認した。即ち、VEGF投与により、これらのmiRNAの発現が低下し、結果PAI-1の発現増強を来すととの研究結果を得た。Bev耐性化のメカニズムの解明につながりうる成果の一端を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌において血管新生は極めて重要である。しかしながら、血管新生因子VEGFに対する抗体であるベバシズマブ(Bev)の臨床への導入にも関わらず、いまだ抜本的な生存率の改善を認めていない。今回の研究の目的は卵巣がん患者がBev抗性を獲得するメカニズムの解明であり、最終的には進行卵巣がんにおけるBEV耐性化症例に対する新治療の可能性の提示につながる基礎データの創出することである。治療法が進化した現在でも卵巣癌は患者の約半数が死亡する致死的な疾患であり、新規治療につながりうる研究成果を継続していくことにより、将来的に国民の健康に大きく貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Bevacizumab plays a key role in ovarian cancer treatment; however, the bevacizumab resistance is often seen in clinical setting. The aim of this study is to identify miRNAs which are involved in bevacizumab resistance. ID-8 cancer cells were injected i.p. into C57BL/6 mice, and anti-VEGF IgG and control IgG were treated twice weekly. Thereafter, mice were sacrificed, and RNA extracted from tumor. MiRNA microarray and TaqMan Gene Expression assays were performed to identify miRNAs/genes which are related with bevacizumab resistance. Through miRNA microarray, 3 miRNAs (miR-30b-5p, 143-3p and 192-5p) were found to be down-regulated by bevacizumab and TaqMan assays showed SERPINE1/PAI-1 elevated. In public database, patients with high PAI-1 expression were correlated with worse prognosis. Transducing these miRNAs downregulated PAI-1 expression in cancer cells. The data presented may explain the mechanism of bevacizumab resistance, suggesting their potential as treatment targets.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 ベバシズマブ耐性 PAI-1 microRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗血管新生治療は卵巣がんに対して有効であり、2013年11月に抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体であるベバシズマブ (BEV) が、卵巣癌に対する承認を取得した。BEV は、海外の大規模第三相臨床試験において、進行卵巣がんに対する標準化学療法である TC (タキサン+カルボプラチン) 療法との併用により有意に無増悪生存期間を延長させたが、しかしながら効果は限定的であった。さらに、再発・難治性卵巣癌に対して行われた BEV の単剤投与の第二相試験では、奏効率 18% 程度と効果は限定的である (J Clin Oncol 2007;25:2902-8)。即ち、我々はさらに抗血管新生治療を進展させていく必要がある。BEV の効果が限定的である要因として、腫瘍から分泌される VEGF 以外の血管新生因子の関与が示唆されている。例えば、進行結腸直腸癌に対する 化学療法+ BEV 療法の Phase II 試験において、患者血漿中の bFGF (basic fibroblast growth factor)、HGF (hepatocyte growth factor)、PlGF (placental growth factor) などの血管新生因子が、BEV 治療に対して抵抗性を示す前に有意に上昇していたことが報告されている (J Clin Oncol.2010 Jan 20;28(3):453-9)。従って、それらの血管新生因子をも抑制する治療戦略が今後の卵巣がん治療に有効ではないかと考えた。

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) は、凝固線溶系や線維化などに重要な役割を果たし、心疾患や脳血管疾患の病態に深く関与している。のみならず、近年がんの進展、糖尿病、肥満などへの関与も報告されている。従って、PAI-1 は多くの重要疾患で主要な役割を担い、その阻害薬の開発は医療に多大な貢献をする可能性が期待されている。PAI-1 の血管新生への役割はいくつか報告されている。具体的には VEGF, bFGF, PDGF, HGF などの血管新生因子による血管新生において、uPAR-uPA-PAI-1 複合体の形成が血管内皮細胞の遊走に重要な役割を担っているとの報告 (Thromb Haemost 2012;108:357-66.) されており、PAI-1 は VEGF とは異なった機序で血管新生を制御していると考えられている。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は卵巣がん患者が Bev 抗性を獲得するメカニズムの解明であり、最終的には進行卵巣がんにおける BEV 耐性化症例に対する新治療の可能性の提示につながる基礎データの創出することである。上述した通り Bev 投与により何らかの理由で、PAI-1 などの他の血管新生促進因子が促進されるのではないかと仮説を立てその検証を行った。

ヒトでは、ゲノムにコードされる 2500 種類以上のマイクロ RNA (miRNA) が時に重複しながら様々な遺伝子の転写翻訳を抑制している。そして、その半数以上が癌遺伝子の近傍に存在しており、miRNA による epigenic な刺激が、発癌、幹細胞化、治療抵抗性などの癌の特性に大きくかかわっている。そこで、今回の研究では miRNA に焦点を当てた解析を行うことにした。

3. 研究の方法

Bev 耐性化モデルマウスの作成

雌 C57BL/6 マウスにルシフェラーゼ遺伝子を挿入したマウス卵巣がん細胞株 ID-8-Luci を 2×10^6 個腹腔内に投与した。腹腔内に腫瘍が形成されたかどうかを IVIS (PerkinElmer 社) を用いてモニターし、腫瘍形成を確認した 2 週間後より、各々 control-IgG (Control 群) 抗 VEGF 抗体 (Bev 耐性化群) を 5mg/kg 週に 2 回腹腔内投与を開始した。抗 VEGF 抗体の投与にも関わらず、腹腔内の腫瘍が増大してきた段階で、マウスを安楽死させしかる後に腹腔内腫瘍を抽出した。

Bev 耐性化モデルマウスにおける血管新生関連遺伝子発現解析

抽出した腫瘍より RNA を抽出し cDNA を作成し、TaqMan® Array Mouse Angiogenesis 96-well plate (ThermoFisher) を用いて Control 群に比べて Bev 耐性化群で発現が増加している血管新生関連遺伝子を網羅的に検索した。

Public Database を用いた PAI-1 が卵巣癌の Bev 耐性化に与える影響の検討

Kaplan Meier plotter (<https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&start=1>) に登録されている 50 例の Bev の投与歴がある卵巣癌症例において、PAI-1 の発現が高発現群と低発現群の二つに分類し、PAI-1 の発現が Bev を投与した卵巣がん患者の予後に与える影響を検討した。

miRNA microarray 法による Bev 耐性化の過程で発現が変動する miRNA の網羅的解析
抽出した腫瘍におけるそれぞれの miRNA の発現を 3D-Gene® miRNA Oligo chip (東レ) を用いて解析し、Bev 耐性化群で発現が低下する miRNA をいくつか抽出した。

miRNA qRT-PCR 法

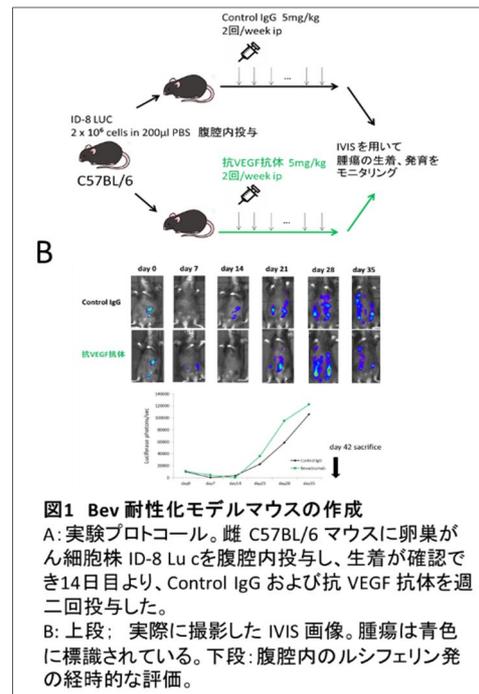


図1 Bev 耐性化モデルマウスの作成

A: 実験プロトコル。雌 C57BL/6 マウスに卵巣がん細胞株 ID-8 Lu c を腹腔内投与し、生着が確認でき14日目より、Control IgG および抗 VEGF 抗体を週二回投与した。

B: 上段: 実際に撮影した IVIS 画像。腫瘍は青色に標識されている。下段: 腹腔内のルシフェリン発の経時的な評価。

で行った **miRNA microarray** 法の結果をそれぞれの **miRNA** に対する **Probe** を用いて **miRNA qRT-PCR** 法で検証した。内因性コントロールには **RNU6B (Applied Biosystems; #001093)** を用いた。

miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p の強制導入が卵巣癌の **PAI-1** 発現に影響を与えるかの検討

ヒト卵巣がん細胞株 **SKOV3ip1** と **HeyA8** に対して、**Lipofectamine 3000** を用いて、**miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p** の前駆体を強制導入した。しかる後に細胞株より **RNA** を抽出し、**PAI-1** の発現を **Real-time qRT-PCR** 法で検討した。内因性コントロールには **GAPDH** を用いた。

4. 研究成果

Bev 耐性化モデルマウスの作成

実験プロトコルを図 1 に示す。雌 **C57BL/6** マウスに **ID-8-Luci** を 2×10^6 個腹腔内に投与した。腫瘍の生着が確認できた 2 週間後より、各々 **control-IgG (Control 群)** 抗 **VEGF** 抗体 (**Bev 耐性化群**) を **5mg/kg** 週に 2 回腹腔内投与を開始した。抗 **VEGF** 抗体投与にも関わらず、**ID-8** 細胞は腹腔内で増殖を続けた。その後、腫瘍が十分増大した 42 日目にマウスを安楽死させ開腹し、腹腔内腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は直ちに液体窒素下に凍結させすり鉢で摺りつぶしたうえで、**Trizol** に溶解し、**RNA** を抽出した。

Bev 耐性化モデルマウスにおける血管新生関連遺伝子発現解析

摘出した腫瘍より抽出した **RNA** の質を **Agilent 2000** で確認したのちに、腫瘍組織における血管新生関連遺伝子の発現を **TaqMan® Array Mouse Angiogenesis 96-well plate** で検証した。結果を図 2 に示す。想定された通り、抗 **VEGF** 抗体の長期間の投与により **IL-6** や **HIF1a** など多くの血管新生関連遺伝子の発現が増加した。その中に **Serpine 1 (PAI-1)** が含まれており、抗 **VEGF** 抗体のエスケープ機構により、**PAI-1** の発現が増強する可能性が示唆された。今回の **Taqman Array** の結果は **Real time qRT-PCR** で確認した。

Public Database を用いた PAI-1 が卵巣癌の Bev 耐性化に与える影響の検討

Kaplan Meier plotter に **Bev** 投与の卵巣がん症例が 50 例登録されていた。**PAI-1** の発現で高発現群と低発現群の二つに分類し、**PAI-1** の発現が **Bev** を投与した卵巣がん患者の予後に与える影響を検討した (図 3) と、**PAI-1** の高発現が有意差をもって、無増悪生存期間が短く、予後が不良であった。すなわち、**Bev** 投与の際には **PAI-1** の発現が予後不良因子になる可能性が示唆された。

miRNA microarray 法による Bev 耐性化の過程で発現が変動する miRNA の網羅的解析

続いて **3D-Gene® miRNA Oligo chip (東レ)** を用いて抗 **VEGF** 抗体の長期間の投与による **miRNA** の発現変動を網羅的に解析した。結果の概略を図 4 に示す。計 **617** の **miRNA** が抗 **VEGF** 抗体投与により、発現が **0.5** 以下まで低下していた。そこで、過去の報告及び **Public database** を用いた **in silico** 解析 (**miRTargetLink Human**) :

Upregulated genes					Downregulated genes				
S1prt	7.766	Mmp14	2.967	Gapdh	2.543	Ang	2.033	Egf	0.011
Il6	6.779	Foxo5	2.965	Edn1	2.533	Tnfrsf2	2.026	Col4a3	0.144
Thbs2	5.279	Mmp2	2.964	Cxcl5	2.511			Tymp	0.222
F3	4.888	Mmp14	2.91	Tnfrsf12	2.494			Adgrb1	0.309
Itih4	4.468	Ephb1	2.863	Foxp2	2.440			Fabp	0.363
Erb2	3.825	Tcf	2.851	Il1b	2.417			F2	0.368
Timp1	3.603	Pocam1	2.789	Hprt	2.414			Lect1	0.384
Pdgfra	3.438	Serpine1	2.741	Lama5	2.406			Csf3	0.47
Igav	3.285	Cgf	2.729	Hes1	2.376				
Erb2	3.273	Piscl1	2.68	Tgfa	2.373				
Plg2	3.263	Ifng	2.68	Mmp19	2.344				
Ccl2	3.258	Igf1	2.646	Tgfr1	2.33				
Hif1a	3.256	Epas1	2.632	Akt	2.324				
Ctgf	3.224	Timp2	2.629	Vegfb	2.299				
Vegfa	3.117	Kar	2.621	Nrp1	2.296				
Serpine1	3.1	Eng	2.621	Sphk1	2.144				
Ccl11	3.062	Klf8	2.613	Cas2	2.137				
Eng	3.005	Tgfb3	2.61	Eng	2.068				
Tgfb2	2.997	Gna13	2.558	Lep	2.042				
Tgfr1	2.994	Cac5	2.549	Col11	2.039				

図2 血管新生関連遺伝子発現解析

Bev 耐性化マウスの腫瘍における血管新生関連遺伝子の発現を Control IgG 投与マウスにおける発現との相対比で示した。赤色: 発現が増加した遺伝子。緑色: 発現が低下した遺伝子。

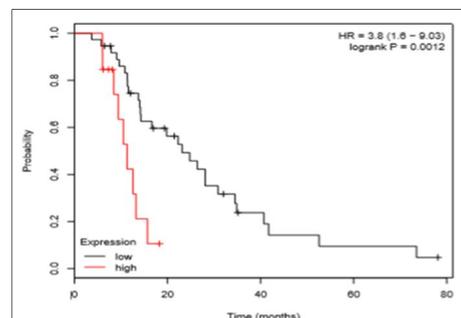


図3 Kaplan Meier Plotterにおける Bev 投与卵巣がん症例50例の Serpine 1 (PAI-1) 発現の High (赤)/Low (黒) ごとの無増悪生存率

Upregulated miRNAs

mmu-miR-188-3p	44.56	mmu-miR-297c-5p	16.71
mmu-miR-291b-5p	35.65	mmu-miR-98-3p	16.14
mmu-miR-4661-3p	29.12	mmu-miR-6920-5p	16.11
mmu-miR-7240-5p	28.69	mmu-miR-742-5p	15.67
mmu-miR-6988-3p	28.31	mmu-miR-1988-3p	14.73
mmu-miR-598-3p	27.67	mmu-miR-466a-5p	14.57
mmu-miR-323-3p	24.98	mmu-miR-6910-3p	13.84
mmu-miR-150-3p	24.45	mmu-miR-7240-3p	13.73
mmu-miR-7663-3p	19.58	mmu-miR-1969-5p	13.41
mmu-miR-669d-5p	18.87	mmu-miR-1955-5p	12.20
mmu-miR-344c-5p	18.01	mmu-miR-291a-5p	10.71
mmu-miR-873a-3p	17.81	mmu-miR-669b-3p	10.65
mmu-miR-5616-3p	17.09	mmu-miR-7680-5p	8.40
mmu-miR-8094	16.92	mmu-miR-6915-5p	5.91
mmu-miR-743b-3p	16.71	mmu-miR-7049-3p	5.71

Downregulated miRNAs

mmu-miR-200a-3p	0.006	mmu-miR-101b-3p	0.015
mmu-miR-1a-3p	0.007	mmu-miR-200c-3p	0.018
mmu-miR-144-3p	0.008	mmu-miR-96-5p	0.018
mmu-miR-101a-3p	0.008	mmu-miR-374b-5p	0.018
mmu-miR-1839-3p	0.009	mmu-miR-374c-5p	0.020
mmu-miR-142a-3p	0.009	mmu-miR-24-2-5p	0.021
mmu-miR-101c	0.011	mmu-miR-184-3p	0.022
mmu-miR-152-3p	0.012	mmu-miR-141-3p	0.022
mmu-miR-3962	0.013	mmu-miR-33-5p	0.022
mmu-miR-196b-5p	0.013	mmu-miR-218-5p	0.023
mmu-miR-206-3p	0.014	mmu-miR-22-5p	0.025
mmu-miR-19a-3p	0.014	mmu-miR-34b-5p	0.025
mmu-miR-429-3p	0.014	mmu-miR-770-5p	0.025
mmu-miR-192-5p	0.014	mmu-miR-34c-5p	0.027
mmu-miR-142a-5p	0.015	mmu-miR-143-3p	0.027

図4 miRNA microarray

抗VEGF抗体の長期投与で発現が増加した miRNA を赤色 (上段) で発現が低下した miRNA を緑色 (下段) で示す。

<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/index.php>) を用いて、**PAI1** の発現を制御している可能性が高い **miRNA** を **miR-30b-5p**, **miR-143-3p**, **miR-192-5p** の 3 つ抽出した。

miRNA qRT-PCR 法

で行った **miRNA microarray** 法の結果をそれぞれの **miRNA** に対する **Probe** を用いて **miRNA RT-qPCR** 法で検証し、それぞれの **miRNA (miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p)** が抗 **VEGF** 抗体の投与により、卵巣がん細胞において、発現が低下することを確認した。

miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p の強制導入が卵巣癌の PAI-1 発現に影響を与えるかの検討

最後に抗 **VEGF** 抗体投与で発現が低下する **miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p** が卵巣がん細胞における **PAI-1** の発現を制御しているのかの検討を行った。具体的には、ヒト卵巣がん細胞株 **SKOV3ip1** と **HeyA8** に対して、**Lipofectamine 3000** を用いて、**miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p** の前駆体を強制導入した。しかる後に細胞株より **RNA** を抽出し、**PAI-1** の発現を **Real-time qRT-PCR** 法で検討した。結果を **図 5** に示す。卵巣がん細胞への **miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p** の意図し導入により、**PAI1** の発現が有意に低下していた。すなわち、これらの **miRNA** が **PAI-1** の発現を制御している可能性が示唆された。

以上の実験結果により、長期間の抗 **VEGF** 抗体投与(マウスでは 5 週間)により、**miR-30b-5p, miR-143-3p, miR-192-5p** が低下する。これらの **miRNA** は **PAI-1** の発現を制御していたので、それらの発現低下が **PAI1** の発現増強を来たすとの研究結果を得た。

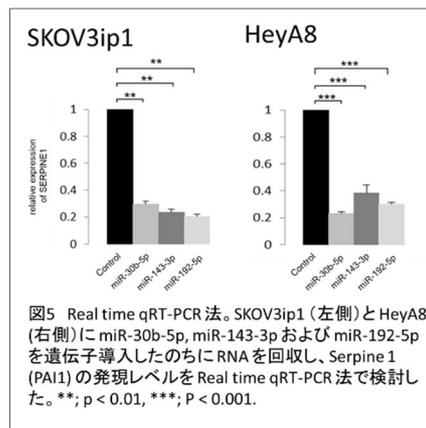


図5 Real time qRT-PCR 法。SKOV3ip1 (左側) と HeyA8 (右側) に miR-30b-5p, miR-143-3p および miR-192-5p を遺伝子導入したのちに RNA を回収し、Serpine 1 (PAI1) の発現レベルを Real time qRT-PCR 法で検討した。**, p < 0.01, ***, P < 0.001.

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究協力者	宮本 真由子 (Miyamoto Mayuko) (70880988)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	香林 正樹 (Kobayashi Masaki) (30880786)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	清水 亜麻 (Shimizu Aasa)	大阪大学・医学系研究科・大学院生 (14401)	