

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18229

研究課題名（和文）卵巣漿液性癌の転移浸潤のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of metastatic invasion in ovarian serous carcinoma

研究代表者

山口 乃里子（Yamaguchi, Noriko）

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50755618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌の転移浸潤には上皮間葉転換が関係しており、我々はこれまでにmiR-223がZEB-1の発現を制御していることを同定した。miR-223低発現の漿液性癌細胞株であるOV1063にpCMV蛍光タンパク質ベクターを導入し、miR-223を過剰発現させたSt細胞株を作成した。結果、ZEB-1はmRNAレベルでは野生株と発現が変わらないが、タンパクレベルでは低発現であることが判明した。浸潤能試験及び化学療法応答能試験ではこの細胞株は浸潤能が低く、シスプラチンへの感受性が高いということが判明し、miR-223の下流のZEB-1が実際に卵巣癌の悪性度に関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後卵巣漿液性癌の臨床病理学的因子とmiR-223の相関関係が明らかとなれば、実際に予後予測や早期診断への応用や病勢把握が実現する可能性がある。特に卵巣癌は検診の意義が確立されておらず、発見時進行していることが多い為、これが診断マーカーとして確立すれば早期発見につながる可能性もある、更に、近年発展しているmicroRNA創薬にトライすることで新たな治療戦略の道が開ける可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-mesenchymal-transition (EMT) plays essential roles in ovarian cancer invasion, metastasis, and drug resistance. The aim of this study is to clarify whether miR-223 regulates EMT through ZEB-1 in ovarian serous carcinoma. Expression of miR-223 and ZEB-1 were analyzed by immunoblotting and real-time RT-PCR analysis. Morphological change, invasion ability, and chemosensitivity were evaluated by using 2 miR-223 stable over expression cell line in OV1063. The correlations between miR-223 and ZEB-1 were determined. miR-223 may regulate EMT through ZEB-1 degradation in ovarian serous carcinoma and might be a predictive marker for a favorable prognosis in the treatment of this cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 miR-223 上皮間葉転換 ZEB-1

1. 研究開始当初の背景

平成 25 年度の統計によると、本邦における卵巣癌による死亡数は 4717 人であり、死亡率は 7.3 (人口 10 万対) である。卵巣癌は診断時に進行期 (FIGOⅢ、Ⅳ期) をとることが多く、原病による 5 年生存率はⅢ期で 31% (国立がんセンター中央病院 2005 年) と依然として低い。卵巣漿液性癌は卵巣癌の大半を占め、播種性転移が特徴的であり、我々はこの過程でリン酸化酵素である DYRK2 が転写因子 Snail の分解を促進することで上皮間葉転換 (EMT) を起こし、薬剤感受性を制御することで予後予測因子になり得るという報告を行ったが、(Yamaguchi N et al., *Tumor Biology* 2015)、直接的な治療薬の開発は遅れている。近年、Gynecologic Oncology Group を始めとする国際研究機構において分子標的薬の有効性を検討する数多くのスタディが行われているが、既知の薬剤は腫瘍の増殖抑制効果はあるが、殺細胞効果はあまりなく、「根治」といった観点からは進展が期待できない。従って卵巣癌を根治するためには効率的に転移を抑制していく必要があると考えられる。

2. 研究の目的

miRNA は約 15~25 塩基の一本鎖 small noncoding RNA で、ターゲット遺伝子のタンパク質の翻訳過程や mRNA の安定性を調節することにより、多くの生物種において重要な生態的役割をはたしている。中でも癌を対象とした研究分野では miRNA が細胞周期、アポトーシス、また浸潤や転移、薬剤耐性を制御するといったさまざまな報告がなされている (Esquela-Kerscher A and Slack FJ. *Nat Rev Cancer*. 2006) (Yanaihara *et al.*, *Cancer Cell*. 2006; Volinia *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006)。これまでに miRNA の発現と卵巣癌の関係性は、ある種の miRNA が明細胞癌における発癌に寄与することなどが明らかにされつつあるものの (Hirata Y et al., *BMC cancer* 2014)、直接的な治療法の開発には至っていない。しかし、近年様々な疾患で miRNA そのもの、あるいはそのインヒビターが治療薬として注目されていることもあり (EVA van Rooij et al., *EMBO Mol Med* 2014)、今後卵巣癌に特異的な miRNA をターゲットとした治療法の開発が可能である。また miRNA は体内で安定的に発現している為、従来の腫瘍マーカーでは予測困難であった腫瘍の進行度が、治療の全過程での効果判定にも有効的に活用される可能性がある。加えて、卵巣癌では進行期による予後の差が顕著であるため、転移メカニズムの解明が急務となっている。従って播種転移を主体とする腫瘍部位での miRNA の発現差状況がわかれば治療法、治療効果判定法の確立につながる。本研究では当初、播種転移を主体とする卵巣漿液性癌の原発巣、転移巣での miRNA の発現差状況を検討し、これらがコードするタンパク質の中から転移浸潤に関連しそうなものを特定し研究をすすめていくことを目的とした。現在様々な疾患において miRNA そのものや、そのインヒビターが治療薬として用いられているため、卵巣癌においても実現可能なはずであり、転移制御や薬剤耐性の観点からその有効性について立証する予定であった。

3. 研究の方法

(1) Candidate miRNA のターゲット遺伝子の検索 : 卵巣癌における miRNA の発現状況を Pubmed を用いて網羅的に検索し、各組織型において過剰発現しているものを数個ピック

アップした。うち、上皮間葉転換（EMT）関連タンパク質と相関がありそうな miRNA を専用ウェブサイトにて推測し、転写因子である ZEB-1 を制御している miR-144、miR-223 に注目した。当院で所有する卵巣漿液性癌及び明細胞癌細胞株 10 種において real time RT-PCR 法にてこれら miRNA の発現状況を確認し（図 1）、更に Western Blotting 法で ZEB-1 及びその下流にある接着因子である E-Cadherin の発現を検討した（図 2）。

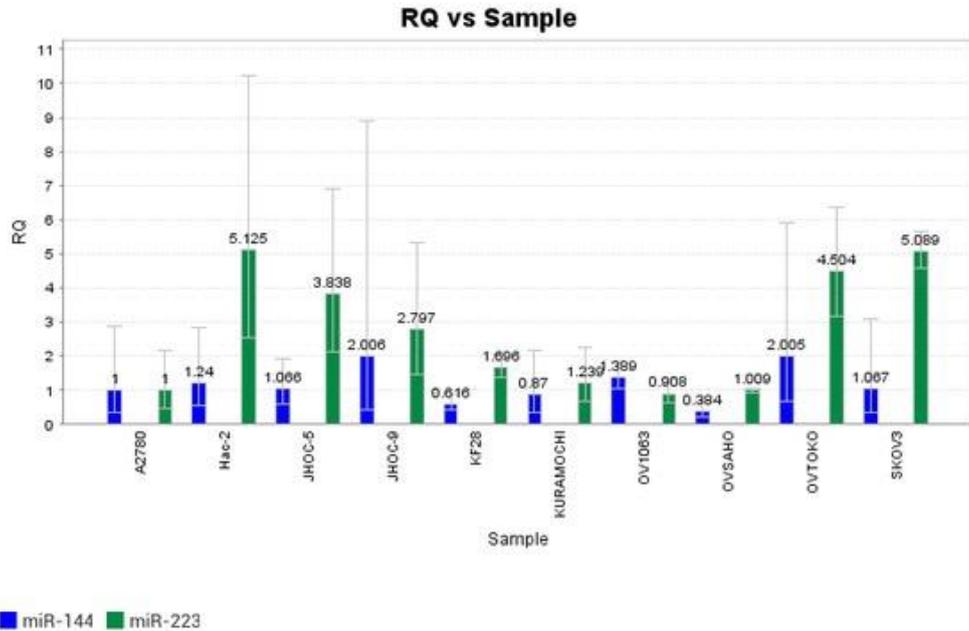


図 1 各細胞株における miR-144、miR-223 の発現程度

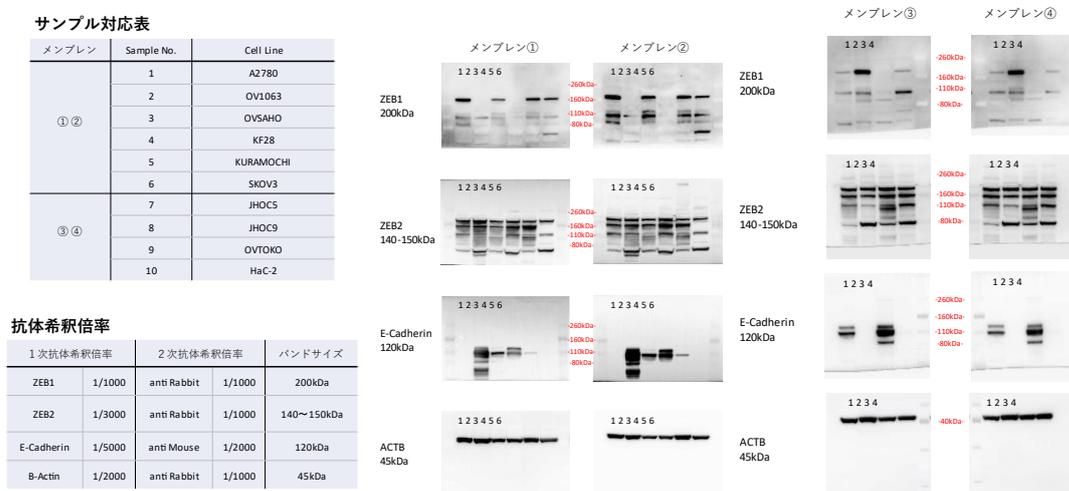


図 2 各細胞株における ZEB タンパクと E-Cadherin の関係

その結果、miR-223 において漿液性癌、及び明細胞癌といった組織型に関係なく、高発現の細胞株では、ZEB-1 が低発現であり、更に E-Cadherin が高発現であった。以上より我々は、miR-223 低発現の卵巣癌では ZEB-1 の発現が上昇し、その結果 E-Cadherin が消失することで、EMT が起こりやすくなっていると仮説をたてた。換言すれば、miR-223 の薬剤等があれば卵巣癌の転移が制御できると考えられた。

(2) Candidate miRNA の機能解析：miRNA は単一ではなく、多くのタンパク質のコードに

関与するものと考えられるが、上皮間葉転換など癌の進展に関与が強く示唆された miRNA については、培養細胞系を用いて、その過剰発現および発現阻害による浸潤能や播種能力、薬剤感受性の変化を検討することとした。

そこで我々は miR-223 が低発現であった卵巣漿液性癌細胞株 OV1063 に pCMV 蛍光タンパク質ベクターを導入し、miR-223 が過剰発現している Stable cell line の作成を試みた。その結果、ZEB-1 は miRNA レベルでは野生株と発現が変わらないが、タンパクレベルでは低発現であることが判明し、又 E-Cadherin と逆相関の関係にあることがわかった。(図3) 又、invasion assay(浸潤能試験) 及び MTS assay(化学療法応答能試験) を行い、miR-223 過剰発現の細胞株はコントロールに比して浸潤能が低く、シスプラチンへの感受性が高いということが判明した。以上より、miR-223 の下流の ZEB-1 が実際に卵巣癌の悪性度(浸潤能)と化学療法感受性に関与している可能性があることが示唆された。

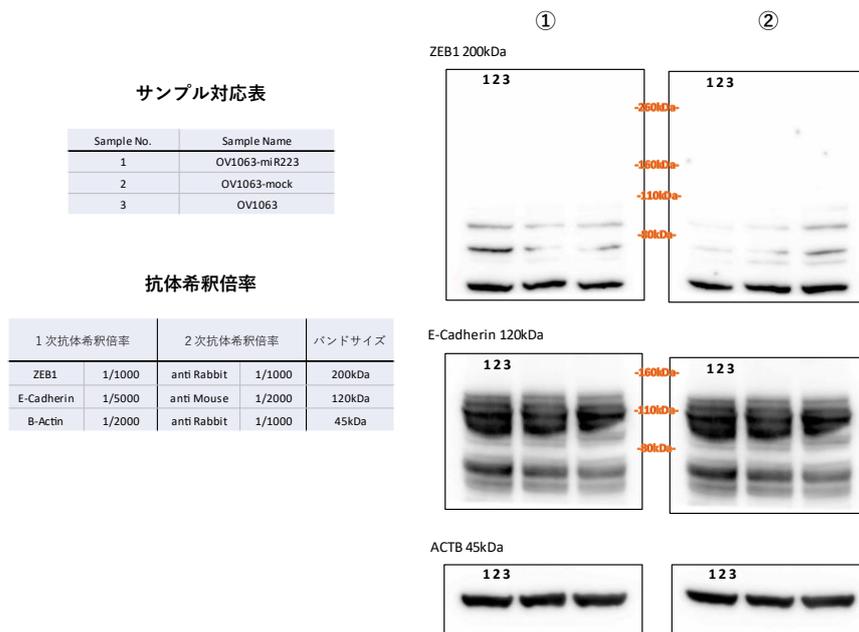


図3 miR-223 と ZEB1 E-Cadherin

※WB の結果は論文用のものではない。論文作成時には改めてきれいに撮影できたものを用意する予定であり、写真ではわかりづらい部分もある点をご理解頂きたい。ここでは ZEB1 がわかりにくくなっている。

(3) miR-223 過剰発現株を用いた動物実験 : in vitro において卵巣漿液性癌における miR-223 の機能解析が完了したため現在ヌードマウスを用いた in vivo 試験を検討中である。

(4) 臨床検体を用いた予後予測 miRNA の解析 : 上記の解析により各病巣で特異的に発現する miRNA について用いた臨床検体の患者予後追跡調査 を行い、臨床病理学的因子との相関を全生存率、無増悪生存期間などについて検討する。また NAC 後や再発後の根治手術 (interval debulking surgery:IDS) にて得られた臨床検体(組織、血清、尿)からその miRNA を抽出し、化学療法前後の発現変化を示し、治療応答能や抵抗性についても検討する。現在検討中である。

4. 研究の成果

3. に付記した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noriko Yamaguchi , Yoshinobu Hamada , Risa Inagaki , Kohei Nemoto , Hideyuki Yoshitomi , Satoshi Takakura	4. 巻 Oct;47(10)
2. 論文標題 Successful salvage treatment with paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin in a patient with methotrexate-resistant gestational trophoblastic neoplasia who developed hypersensitivity reaction to etoposide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res .	6. 最初と最後の頁 3737-3741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 乃里子, 濱田 佳伸, 稲垣 里咲, 土屋 慶, 鈴木 啓介, 齊藤 陽子, 飯塚 真, 坂本 秀一, 高倉 聡
2. 発表標題 子宮体癌における周術期リスク因子と予後の相関
3. 学会等名 日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------