

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791537

研究課題名（和文） ヒト上皮性卵巣癌におけるマイクロ RNA 発現の網羅的解

研究課題名（英文） Expression of miRNA in human epithelial ovarian cancer

研究代表者

赤平 純一（AKAHIRA JUNICHI）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90359505

研究成果の概要（和文）：

卵巣癌と性質が近い子宮内膜漿液性腺癌において、miR-34bの発現が低下しており、その発現の低下はプロモーター領域のメチル化と関連していた。またmiR-34bを癌細胞に導入したところ、悪性度が増し、特に浸潤能に与える影響が大きかった。さらに、標的タンパク質として、癌遺伝子であるmesenchymal epithelial transition factor (MET)に着目した。細胞内でmiR-34bの発現が増加すると、METの発現は減少し、癌遺伝子であることを裏付ける結果であった。以上より、子宮内膜漿液性腺癌において、miR-34bが癌抑制遺伝子的な働きをしており、その働きは標的蛋白METを介していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

miR-34b was found to have promoter hypermethylation, which when reversed, restored miR-34b expression in the endometrial serous cancer (ESC) cell lines treated with 5-aza-2' deoxycytidine. miR-34b transfection inhibited ESC cell growth, migration and most notably invasion. These effects were mediated by miR-34b target gene, the mesenchymal epithelial transition factor (MET). The expression of MET was reduced following the restoration of miR-34b in ESC cell lines. In summary, our data suggest that miR-34b plays a role in the molecular pathogenesis of endometrial cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子の発現抑制のメカニズムにつ

いては、1980年代より遺伝子突然変異、染色体欠失などのいわゆるgeneticな変化による抑制が報告され、さらに1990年代よりプロモ

ーター領域CpGアイランドのDNAメチル化により抑制されることが報告され、癌抑制遺伝子の不活性化との関係が論じられてきた。さらに近年、20から25塩基程度の1本鎖RNAであるmicroRNA (miRNA) の癌における役割が注目されている。miRNAは他の遺伝子(標的遺伝子)の発現を調節する機能を有すると考えられているタンパク質への翻訳がないノンコーディングRNAである。様々な癌においてmiRNA解析は進んでおり、miRNAによるエピジェネティックな遺伝子発現の制御が注目されている。

卵巣癌は婦人科癌の中でも最も予後不良な癌の一つである。卵巣癌は病理組織学的に分類され、卵巣癌の約9割を上皮性卵巣癌が占める。上皮性卵巣癌はさらに、漿液性癌、類内膜癌、粘液性癌、明細胞癌などに分類される。この中で、最も頻度が高いのは漿液性癌であり、一方、粘液性癌や明細胞癌は頻度が少ないもの予後不良で、化学療法の効果が高い。手術や化学療法による集学的治療によって、近年、卵巣癌患者の予後の改善がみられているものの、再発・進行例については依然として予後不良である。従って卵巣癌の新規治療戦略をはかる上でも、その腫瘍学的・生物学的特徴の把握が急務とされている。

2. 研究の目的

婦人科悪性腫瘍において最も予後不良である卵巣癌とエピジェネティクスの関連全体を把握する上で特に近年報告数の増加が著しいmiRNAに焦点をあてる。miRNAアレイを用いて卵巣癌におけるmiRNAの発現を網羅的に解析し、この予後不良な疾患の新たな治療法の開発につなげることを最終的な目標とする。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌におけるmiRNAの網羅的解析

卵巣癌検体および子宮内膜癌検体、さらに卵巣および子宮の漿液性腺癌培養細胞株(OVCAR3、SKOV3、JHOS2、JHOS3)をそれぞれ用いた。子宮内膜漿液性腺癌は、病理組織学的に卵巣漿液性腺癌と類似した乳頭状構造を有する。また、両組織由来の漿液性腺癌は、病態においても類似点が多い。比較対照として、類内膜腺癌細胞株(TOV112D)を使用した。miRNAの網羅的解析には、Human miRNA microarray Kit (Agilent Technologies)を使用した。マイクロアレイ解析にはGeneSpring (Agilent Technologies)を使用した。本研究は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得た後に行った。

(2) miRNAのターゲット蛋白の同定

ターゲット遺伝子予測アルゴリズム(miRanda、TargetScan、miRBase)を用いて、miR-34bが標的とし得る遺伝子群を抽出した。

(3) miRNAのプロモーター領域のメチル化についての検索

miR34bのプロモーター領域のメチル化について、バイサルファイトシークエンス法にて解析した。また、5-aza-2' deoxycytidineを用いて脱メチル化について検討を行った。

(4) miRNAの機能解析

miR34bを培養細胞に導入し、細胞増殖、アポトーシス、細胞の遊走能、浸潤能について検討した。細胞増殖能にはCell Counting Kit (WST-8; 同仁化学)を、アポトーシスの検討にはCaspase-3/7 Glo Assay (Prpmege)をそれぞれ行った。細胞の遊走能、浸潤能についてはtranswell Assay Kit (BD Biosciences)を用いた。

(5) miRNAの発現と予後・治療法を含む臨床病理学的因子との関連についての検討

miR34bの標的遺伝子としてmesenchymal epithelial transition factor (MET)を抽出し、臨床検体におけるMETの発現を免疫組織化学にて評価した。

4. 研究成果

卵巣および子宮の漿液性腺癌についてmiRNAの発現を検討した。通常型の類内膜腺癌をコントロールとして、miRNAマイクロアレイを行い、漿液性腺癌において高発現(54遺伝子)あるいは低発現(66遺伝子)したmiRNAを抽出した。これらについて、予後を含めた臨床病理学的因子との比較を行った。その結果、miR-101、miR-10b、miR-139、miR-29b、miR-152、miR455の低発現が有意な予後不良因子となることが判明した。細胞株に対してmi-R101あるいはmiR-152を遺伝子導入した結果、細胞増殖が抑制された。さらに、cyclooxygenase-2 (Cox-2)の陽性率がmiR-101の発現低下と関係していることも発見した。Cox-2は炎症時に過剰に産生されることが知られているが、卵巣癌においては癌細胞の増殖に関与すること、Cox-2の遺伝子変異が癌発生と関連することが注目されている。また、miR-101の強制発現により、Cox-2の発現が低下することが報告されている。miRNAは新規治療標的因子として注目されているが、癌のバイオマーカーとしての性質が、病理学的なsurrogate markerとしても有用であると考えられている。以上の所見より、漿液性腺癌の予後因子として、本研

究で抽出したmiRNA群の低下を検出することが有用であることが示唆され、新たな診断技術の提唱につながると期待される。

さらに、卵巣癌と性質に近い子宮内膜漿液性腺癌において、miRNAマイクロアレイ解析によって、miR-34bの発現が低下していることを明らかにした。MiR-34bのプロモーター領域のメチル化をバイサルファイトシーケンス法により解析したところ、この発現の低下はプロモーター領域のメチル化と有意に相関しており、miR-34bの発現の低下はメチル化によって引き起こされていると考えられた。また、miR-34bの発現が低い細胞株に遺伝子導入により強制発現させると、細胞の増殖能低下、アポトーシスの増加、遊走能や浸潤能の低下が認められ、このmiRNAが癌抑制遺伝子的な機能を有していることが推察された。さらに、標的タンパク質として、癌遺伝子であるMETに着目し、両因子の関連について検討を加えた。培養細胞を用いた検討では、細胞内でmiR-34bの発現が増加すると、METの発現は減少することが明らかとなった。METは受容体型チロシンキナーゼであり、Hepatocyte growth factor (HGF)と特異的に結合し、癌細胞の増殖、遊走・浸潤、形態形成などに関与することが知られている。HGFおよびMETは卵巣癌細胞において発現していることが確認されており、卵巣癌の転移巣においてMETの発現が高いことも明らかにされている。子宮内膜癌では、HGFおよびMetの発現と微小血管数との関係が検討されており、両因子が陽性である症例では、微小血管数が有意に高いことが報告されており、予後不良因子であることが確認されている。以上より、卵巣および子宮内膜漿液性腺癌において、miR34bは癌抑制遺伝子的な働きをしており、その働きは標的蛋白METを介していることが示唆された。今年度は、上記の成果を学会(日本癌学会)において発表し、論文として掲載された(Int J Cancer)。

miRNAの臨床への応用については、Santaris ファーマ(デンマーク)から、miR-122をターゲットとしたC型肝炎ウイルス駆除の核酸治療に関する臨床試験が報告されている。一方miRNAは、siRNAのように標的遺伝子に対して1:1の関係ではなく、一つのmiRNAにはおよそ200個の標的mRNAが存在する(1:~200)と考えられている。つまり一つのmRNAは複数のmiRNAの制御下に置かれてると考えられている。miRNAの治療への応用に関しては多くのエビデンスが必要であり、今後その安全性の確認方法などの多くのデータの蓄積が急務である。卵巣癌だけではなく多くの癌に対して

は、未だ特効薬は存在しないのが現状であるが、miRNAの癌での作用を詳細に検討し、そのエビジェネティクスを理解することが新規治療戦略へとつながるのではと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) Hiroki E, Suzuki F, Akahira JI, Nagase S, Ito K, Sugawara JI, Miki Y, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. Int J Cancer. 2012. in press. 査読有
- (2) Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. Cancer Sci. 2010 Jan;101(1):241-249. 査読有
- (3) Yue X, Akahira J, Utsunomiya H, Miki Y, Takahashi N, Niikura H, Ito K, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) as a possible prognostic marker in epithelial ovarian cancer. Pathol Int. 2010 May;60(5):400-406. 査読有

[学会発表] (計7件)

- (1) 鈴木史彦、赤平純一、廣木恵理、永瀬 智、伊藤 潔、宇都宮裕貴、笹野公伸、八重樫伸生. Aberrant expression and function of miR-34b in uterine papillary serous carcinoma (UPSC). 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3日. 名古屋
- (2) 楽 暁ジ、赤平純一、宇都宮裕貴、鈴木史彦、志賀尚美、伊藤 潔、笹野公伸、八重樫伸生. 子宮癌肉腫、平滑筋肉腫と内膜間質肉腫におけるSteroid and Xenobiotic Receptor (SXR)の発現と臨床病理学的因子との関連についての検討第63回日本産科婦人科学会学術講演会. 2011年8月30日. 大阪
- (3) 廣木恵理、鈴木史彦、赤平純一、永瀬 智、伊藤 潔、笹野公伸、八重樫伸生. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月24日. 大阪

(4) 鈴木史彦、赤平純一、廣木恵理、永瀬 智、伊藤 潔、笹野公伸、八重樫伸生. Role of micro-RNA in uterine papillary serous carcinoma (UPSC). 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 22 日. 大阪

(5) 楽 暁ジ、赤平純一、宇都宮裕貴、新倉 仁、伊藤 潔、笹野公伸、八重樫伸生. 卵巣癌における steroid and xenobiotic receptor の発現と臨床病理学的因子との関連についての検討. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2010 年 4 月 24 日. 東京.

(6) 廣木恵理、赤平純一、鈴木史彦、永瀬 智、伊藤 潔、八重樫伸生. 子宮体部漿液性腺癌におけるマイクロ RNA-34b の遺伝子発現異常およびその機能の検討. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 東京.

(7) 鈴木史彦、赤平純一、廣木恵理、永瀬 智、伊藤 潔、笹野 公伸、八重樫 伸生. 子宮体部漿液性腺癌におけるマイクロ RNA の役割. 第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2010 年 4 月 23 日. 東京.

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤平 純一 (AKAHIRA JUNICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：90359505

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：