

機関番号：14401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791555
 研究課題名(和文) 卵巣癌腹膜播種に關与するマイクロRNAの検査とその機能の解析
 研究課題名(英文) Identification of microRNA which regulates peritoneal dissemination of ovarian cancer
 研究代表者
 澤田 健二郎 (SAWADA KENJIRO)
 大阪大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：00452392

研究成果の概要(和文)：

我々は卵巣癌腹膜播種に重要な役割を果たしている接着因子インテグリン $\alpha 5$ に着目して、その転写発現を制御するマイクロRNAを検討し、候補マイクロRNAとして、hsa-mir-92aを選び出した。卵巣癌細胞株における hsa-mir-92a の発現を検討し、インテグリン $\alpha 5$ の蛋白レベルでの発現と逆相関の関係にあることを見出した。さらに hsa-mir-92a がインテグリン $\alpha 5$ の転写発現を制御することにより、癌細胞の接着能、浸潤能を抑制することが判明した。即ち、hsa-mir-92a を標的とした分子治療が腹膜播種抑制に有効である可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：

Ovarian cancer is a highly metastatic characterized by widespread peritoneal dissemination and ascites, and is the leading cause of death from gynecological malignancy. We have previously identified integrin $\alpha 5$ as a new target in ovarian cancer treatment by inhibiting peritoneal dissemination. Our aim is to identify new microRNA which regulates the expression of integrin $\alpha 5$ and analyze the therapeutic potential of targeting of its microRNA. Based on the microRNA algorithm search, we identified hsa-mir-92a as a candidate. Hsa-mir-92a is little expressed in ovarian cancer cells which express high level of integrin $\alpha 5$, whereas hsa-mir-92a is highly expressed in RMUG-S cells which do not express integrin $\alpha 5$. Transfection of precursor mir-92a reduced integrin $\alpha 5$ expression in ovarian cancer cells, accompanied by the inhibition of cell adhesion and invasion. Those results suggested targeting hsa-mir-92a could be a promising therapy for a subset of ovarian cancer patients by inhibiting integrin $\alpha 5$ expression.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産科婦人科学

キーワード：マイクロRNA、腹膜播種、卵巣癌、インテグリン

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は最新の抗癌剤治療をもってしても、5年生存率40%程度と極めて予後不良である。卵巣癌は卵巣表面の一層の卵巣上皮から発生し、この卵巣上皮細胞が発癌

(Transformation)の後、上皮から離脱、腹腔内を浮遊した後、大網、腹膜を始めとする諸臓器に付着、転移巣を形成するという他癌と比べて極めて特異的な転移経過を辿る。しかる後、癌細胞が増殖し、基底膜が破壊され間質内へ浸潤していく。最近、我々はFigure 1に示すように、卵巣癌が上皮細胞としての特性を失う(E-Cadherinの発現減少)過程で、ファイブロンネクチンに対する受容体であるIntegrin・5の発現が増強することを発見し、このIntegrin・5は癌細胞の接着能に重要な役割を果たしていることを解明した¹⁾。さらに病期Stage II-IVにある卵巣癌患者107名より作成した組織マイクロアレイを用いた免疫染色により、Integrin・5の強発現が卵巣癌の予後因子であることを報告した(Figure 2)。以上の検討により、このインテグリンに対する分子標的治療は卵巣癌の腹膜播種制御に対する新たな選択肢になりうると考えられる。

一方、哺乳類では、ゲノムにコードされる400種類以上のマイクロRNA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。例えば、Peter等は卵巣を含む60種類の癌細胞株のマイクロRNAの発現プロファイルを検討し、miR-200 familyがEカドヘリンの発現を抑制し、上皮細胞の発癌を制御している可能性を報告している²⁾。このように、卵巣癌を含む上皮細胞の癌化においてマイクロRNAが重要な役割を果たしていることが予想されているが、卵巣癌の接着能を規定するIntegrin・5の発現を制御するマイクロRNAについては未だ検討されていない。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではこのインテグリンに対する標的治療は卵巣癌の腹膜播種制御に対する新たな選択肢になりうると考え、Integrin・5の発現を制御するマイクロRNAを解明し、その分子レベルでの制御機構についての検討を行い、分子標的治療としての可能性を検討することにした。

3. 研究の方法

研究1: Integrin・5の発現を制御する可能性のある候補マイクロRNA(miRNA)の解析方法: Integrin・5(gene: ITGA5)の3'-UTR(非翻訳領域)に結合する可能性のあるmiRNAを解析ソフトであるDiana-microT(ver. 3)及びTarget Scanを用いて検討した。

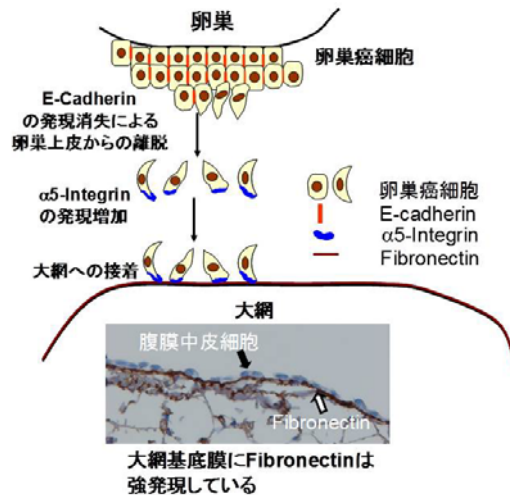


Figure 1. 提唱する腹膜播種のメカニズム

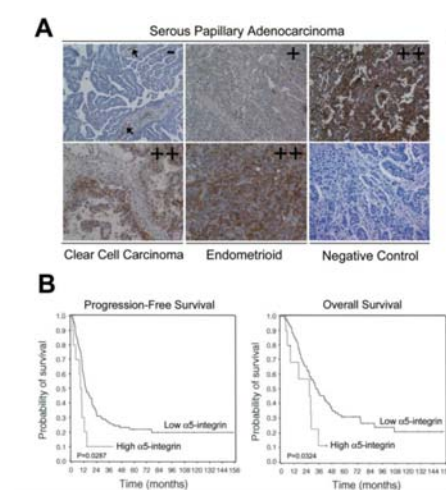


Figure 2A. 卵巣癌組織アレイにおける Integrin $\alpha 5$ の発現(矢印; 血管内皮細胞(内部コントロール)。B. 病期II~IV期の卵巣癌患者107名のKaplan-Meier曲線(左: Progression-Free Survival、右: Overall Survival)¹⁾。

Diana-microT ver.3		
Rank	miRNA name	miTG score
1	hsa-mir-92b	29.42
2	hsa-mir-92a	29.42
3	hsa-mir-148b	19.55
4	hsa-mir-152	19.5
5	hsa-mir-27b	18.58
6	hsa-mir-27a	18.58
7	hsa-mir-32	16.46

Figure 3. Integrin $\alpha 5$ の発現を制御する可能性のあるmicroRNAの標的予測アルゴリズム

結果: Figure 3にその結果を示す。

Diana-microT では hsa-mir-92a および 92b が miTG Score 29.42 と他に比べて極めて高い値を示しており、Target Scan においても同様の結果が得られた。よって、hsa-mir-92a および 92b に焦点をあてて以下の実験を行った。

研究 2 : hsa-mir-92a および 92b の卵巣癌細胞株への強制導入に伴う Integrin \cdot 5 の発現の変動の検討

方法① : 卵巣癌細胞株 SKOV3ip1, CaOV3, A2780 (いずれも漿液性腺癌株) を用いた。2.5x10⁵ 個を 6 ウェルの培養プレート上に撒

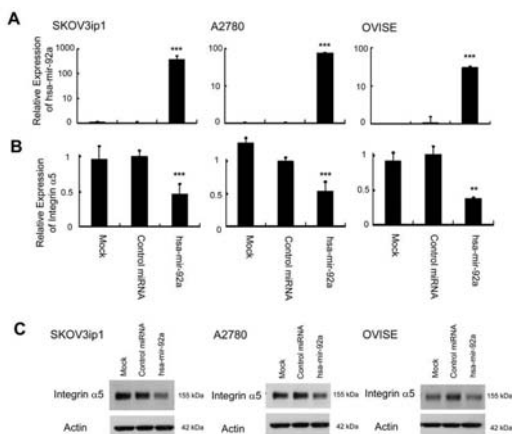


Figure 4. hsa-mir-92a の卵巣癌細胞株への強制導入は Integrin α 5 の発現を抑制する。A. TaqMan MicroRNA assays. 卵巣癌細胞株 SKOV3ip1, CaOV3, A2780 に対して、hsa-mir-92a の合成前駆体 (40nM, Ambion) を強制導入した。陰性コントロールとして、Scrambled RNA (control miRNA) を用いた。48時間後にRNA を回収し、hsa-mir-92a の発現レベルを TaqMan MicroRNA assays で解析した。B. Real Time RT-PCR 法。A で回収したRNA における Integrin α 5 の mRNA の発現レベルを Real Time PCR 法で比較検討した。C. Western Blot 法。Integrin α 5 の蛋白レベルでの発現を解析した。 (**; P<0.01, vs control miRNA, ***; P<0.001, vs control miRNA)

き、翌日、hsa-mir-92a の合成前駆体 (Ambion) をトランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Trizol) を用いて、強制導入した。前駆体の最終濃度が 40 nM になるように調整した。陰性コントロールとして、Scrambled RNA (control miRNA, Ambion) を用いた。48 時間後に、RNA を Trizol (Invitrogen) を用いて回収し、hsa-mir-92a および Integrin \cdot 5 の発現レベルを TaqMan System を用いて、Real Time PCR 法で比較検討した。同様に蛋白を抽出し、Integrin \cdot 5 の発現を Western Blot 法にて解析した。

結果 : Figure 4A に hsa-mir-92a の TaqMan microRNA assay の結果を示す。hsa-mir-92a の強制導入により、卵巣癌細胞における hsa-mir-92a の発現は 30~380 倍に有意に増加した。Figure 4B に強制導入に伴う Integrin \cdot 5 の mRNA レベルでの発現を Real-time RT-PCR 法で検討した。卵巣癌細胞株における Integrin \cdot 5 の発現は 38~54% と約半分に抑制された。この結果を Western Blot 法にて確認した。Figure 4C に示した通り、hsa-mir-92a 強制導入は Integrin \cdot 5 の発現を抑制した。同様の検討を hsa-mir-92b の前駆体を用いて

行ったが、Integrin \cdot 5 の発現に影響を与えなかった (Data Not Shown)。以上より、卵巣癌細胞株において、hsa-mir-92a の強制導入は Integrin \cdot 5 の発現レベルを有意に減少させることが判明した。

研究 3 : 各種卵巣癌細胞株における Integrin \cdot 5 と、hsa-mir-92a との発現の相関関係の検討

方法 : 6 種の卵巣癌細胞株 (CaOV3, OVISe, A2780, SKOV3ip1; 漿液性腺癌株, RMUG-S; 粘液性腺癌株, RMG-1; 明細胞腺癌株) を用いた。これらの蛋白及び RNA を抽出し、Western Blot 法にて、Integrin \cdot 5 の発現を、miRNA Real Time PCR 法で hsa-mir-92a の発現を検討した。Western Blot 法の内部コントロールには Actin を使い、PCR 法の内部コントロールには RNU6B を用いた。

結果: Figure 5A に示した通り、6 種中、RMUG-S を除く 5 種の細胞株で Integrin \cdot 5 が強く発現していた。そこで、RMUG-S における hsa-mir-92a の発現レベルを 1 とし、他の細胞株における hsa-mir-92a の発現を検討したところ、0.002~0.079 と著明に発現が低下していた (Figure 5B)。両者の発現は有意に逆相関していた (Figure 5C, P=0.045)。以上より、これら卵巣癌細胞株において、hsa-mir-92a が Integrin \cdot 5 の発現を制御している可能性が示唆された。

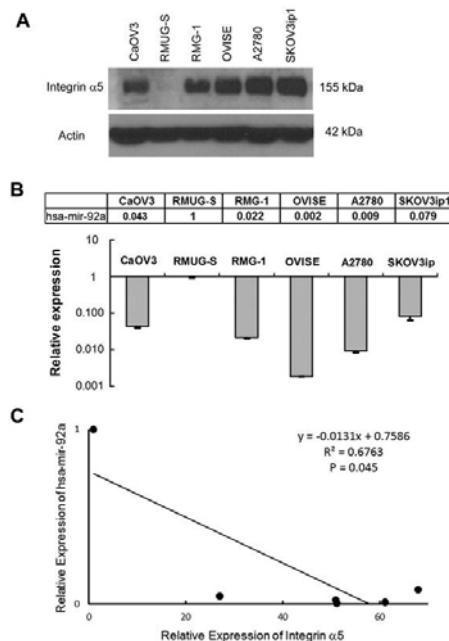


Figure 5. 各種卵巣癌細胞株における Integrin α 5 と hsa-mir-92a の相関関係。A. Western Blot 法。6種の卵巣癌細胞株の蛋白を抽出し、15 μ g を SDS-PAGE に電気泳動。PVDF メンブレンに転写後、抗 Integrin α 5 抗体で標識した。コントロールとして、Actin を用いた。B. TaqMan MicroRNA assays. Integrin α 5 低発現株 RMUG-S における hsa-mir-92a の相対的な発現量を表示。C. Integrin α 5 と hsa-mir-92a の発現量の相関係数及び回帰分析。

研究 4 : Integrin \cdot 5 低発現細胞株における

hsa-mir-92a抑制効果の検討

方法：Integrin \cdot 5 が殆ど発現していない卵巣癌細胞株 RMUG-S を 2.5×10^5 個を 6 ウェルの培養プレート上に撒き、翌日、hsa-mir-92a の Inhibiter (Ambion) をトランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、強制導入し、hsa-mir-92a の発現を抑制した。48 時間後に mRNA 及び蛋白を回収し、Integrin \cdot 5 の発現に与える影響を検証した。

結果：Figure 6A に示した通り、Inhibiter の導入により hsa-mir-92a の発現は 0.16% と有意に抑制された。hsa-mir-92a の発現抑制により、Integrin \cdot 5 の発現は 3.95 倍に有意に増加した (Figure 6B)。その結果を Western Blot 法にて蛋白レベルでも確認した (Figure 6C)。

研究 5：hsa-mir-92a の強制導入が卵巣癌の接着能に与える影響の解析

方法：卵巣癌細胞株 2.5×10^5 個を 6 ウェルの培養プレート上に撒き、翌日、hsa-mir-92a の合成前駆体 (Ambion) をトランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、強制導入した。陰性コントロールとして、Scrambled RNA (control miRNA, Ambion) を用いた。48 時間後に細胞を回収し、無血清培養液中に再

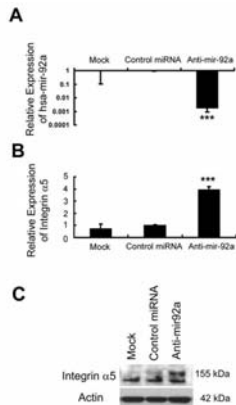


Figure 6. hsa-mir-92a の阻害剤は低 Integrin α 5 発現卵巣癌細胞株 RMUG-S における Integrin α 5 の発現を増加させる。A. TaqMan MicroRNA assays. 卵巣癌細胞株 RMUG-S に対して、hsa-mir-92a の阻害剤 (40nM, Ambion) を強制導入した。陰性コントロールとして、Scrambled RNA (control miRNA) を用いた。48 時間後に RNA を回収し、hsa-mir-92a の発現レベルを TaqMan MicroRNA assays で解析した。B. Real Time RT-PCR 法。A で回収した RNA における Integrin α 5 の mRNA の発現レベルを Real Time PCR 法で比較検討した。C. Western Blot 法。Integrin α 5 の蛋白レベルでの発現を解析した (***)。P<0.001, vs control miRNA)。

懸濁した。続いて、 5×10^4 個の細胞を Fibronectin (50 \cdot g/ml) でコートした 96 ウェルに撒き、一時間培養した後、ウェルを PBS で 3 回洗浄し、固定後、ギムザ染色で接着細胞を染色した。しかる後に 560 nm の吸光度を測定し、control miRNA 導入時の接着細胞数を 1 とした時の接着細胞数を比較検討した。

結果：Figure 7 に示した通り、hsa-mir-92a の強制導入により、卵巣癌細胞株の Fibronectin への接着がそれぞれ 44% (SKOV3ip1)、82% (A2780) と有意に抑制された。即ち、hsa-mir-92a の強制導入により、卵巣癌細胞の細胞外マトリックスへの接着能が抑制できる可能性が示唆された。

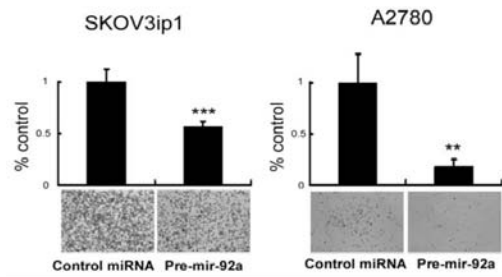


Figure 7. In Vitro Adhesion Assay. 卵巣癌細胞株に hsa-mir-92a の合成前駆体を強制導入し、48 時間後に細胞を回収し、無血清培養液中に再懸濁した。しかる後、 5×10^4 個の細胞を Fibronectin (50 μ g/ml) でコートした 96 ウェルに撒き、一時間培養した後、ウェルを PBS で 3 回洗浄し、固定後、ギムザ染色で接着細胞を染色した。しかる後に 560 nm の吸光度を測定し、control miRNA 導入時の接着細胞数を 1 とした時の接着細胞数を比較検討した (**; P<0.01, vs control miRNA, ***; P<0.001, vs control miRNA)。

研究 6：hsa-mir-92a の強制導入が卵巣癌の浸潤能に与える影響の解析

方法：卵巣癌細胞株 2.5×10^5 個を 6 ウェルの培養プレート上に撒き、翌日、hsa-mir-92a の合成前駆体 (Ambion) をトランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、強制導入した。陰性コントロールとして、Scrambled RNA (control miRNA, Ambion) を用いた。48 時間後に細胞を回収し、無血清培養液中に再懸濁した。続いて、 1×10^5 個の細胞を Matrigel (25 \cdot g/ml) でコートした 24 ウェルの Boyden Chamber の上層に撒き、下層に 10% FBS 入培養液を入れ、癌細胞の浸潤を誘導した。48 時間培養した後、chamber を PBS で 3 回洗浄し、上層に残っている細胞を綿棒で丁寧に取り除き、固定後、下層に浸潤した細胞をギムザ染色した。しかる後に chamber を 200 倍視野で無作為に 10 か所撮影し、浸潤細胞数を目視でカウントし、control miRNA 導入時の浸潤細胞数を 1 として、比較検討した。

結果：Figure 8 に示した通り、hsa-mir-92a の強制導入により、卵巣癌細胞株の浸潤能がそれぞれ 77% (SKOV3ip1)、87% (A2780) と

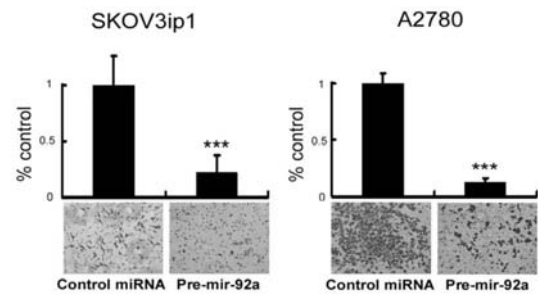


Figure 8. In Vitro Invasion Assay. 卵巣癌細胞株に hsa-mir-92a の合成前駆体を強制導入し、48 時間後に細胞を回収し、無血清培養液中に再懸濁した。しかる後、 1×10^5 個の細胞を Matrigel (25 μ g/ml) でコートした 24 ウェルの Boyden Chamber の上層に撒き、癌細胞の浸潤を誘導した。48 時間培養した後、下層に浸潤した細胞をギムザ染色した。浸潤細胞数を目視でカウントし、control miRNA 導入時の浸潤細胞数を 1 として、比較検討した (**; P<0.01, vs control miRNA, ***; P<0.001, vs control miRNA)。

有意に抑制した。即ち、hsa-mir-92a の強制

導入により、卵巣癌の細胞外マトリックスへの浸潤が抑制できる可能性が示唆された。

4. 研究成果

我々は以前より、卵巣癌腹膜播種に重要な役割を果たしている接着因子は Integrin・5 であることを報告しており、今回の研究では、このインテグリンの転写発現を制御するマイクロ RNA を検討し、以上報告したとおり、hsa-mir-92a を候補マイクロ RNA として、抽出した。

まず、各種卵巣癌細胞株における hsa-mir-92a の発現を Taqman probe を用いた Real-time PCR 法で検討したところ、Integrin・5 の蛋白レベルでの発現が殆どない卵巣癌細胞株 RMUG-S でその発現が他の卵巣癌細胞株 (SKOV3-ip1, A2780, OVISe, RMG-1) に比べて、著明に増加していた。更に、Integrin・5 が強発現している SKOV3ip1 及び A2780 に hsa-mir-92a の前駆体を強制導入したところ、両細胞株において、Integrin・5 の発現が約 50% に低下した。さらに Integrin・5 の基質である細胞外マトリックス、ファイブロネクチンへの接着能を有意に低下し、それに伴い、癌細胞の浸潤能も低下した。

このように、マイクロ RNA, hsa-mir-92a が卵巣癌細胞株において、Integrin・5 の転写発現を制御することにより、癌細胞の接着能、浸潤能を抑制することが判明した。近年、癌をはじめとする様々な疾患とマイクロ RNA との関連性が強く指摘されている。これまで疾患の原因の主役であると考えられてきたタンパク質ではなく、それらタンパク質の発現を緻密にコントロールするマイクロ RNAこそが、疾患の「真の支配者」であるという新概念も生まれてきている。その意味でマイクロ RNA 研究は癌の基礎医学を刷新する重要な発見であり、癌の理解と診断において新たな歴史を開く可能性を有している。特にバイオマーカーとしてのマイクロ RNA の発現解析は、実験系が非常に安定化しているため、今後急速な臨床応用が期待されている。治療への応用に関しても、世界中で活発に検討がなされており、マイクロ RNA にコレステロールを付加して安定化させたものの投与実験や核酸試薬そのものの開発試験などが近年報告されている。しかしながら、現時点で臨床応用されているものはなく、今後の大きな発展性を有した分野である。

今後は① ヒト臨床卵巣癌検体を用いて、卵巣癌原発巣、転移巣における hsa-mir-92a の発現を検討し、Integrin・5 の発現との相関、及び予後に与える影響を検討し、② hsa-mir-92a の配列をベクターに組み込んだ Lentivirus を作成し、ヒト卵巣癌腹膜播種モデルマウスへの投与実験を行うことに

より、腹膜播種のバイオマーカーとしての hsa-mir-92a の意義の検定及び、このマイクロ RNA を標的とした分子治療の可能性を検討していきたい。

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 2 件)

①Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha 5 \beta 1$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis.

Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E.
Oncogene. 2011 Mar 31;30(13):1566-76.

②Up-regulation of alpha5-integrin by E-cadherin loss in hypoxia and its key role in the migration of extravillous trophoblast cells during early implantation.

Arimoto-Ishida E, Sakata M, Sawada K, Nakayama M, Nishimoto F, Mabuchi S, Takeda T, Yamamoto T, Isobe A, Okamoto Y, Lengyel E, Suehara N, Morishige K, Kimura T.
Endocrinology. 2009 Sep;150(9):4306-15

[学会発表] (計 1 件)

①Ohyagi C, Sawada K, Mabuchi S, Kimura T. Identification of microRNA which regulates peritoneal dissemination of ovarian cancer. In: 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪(2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 健二郎 (SAWADA KENJIRO)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00452392

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：