

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591844

研究課題名（和文） 卵巣癌細胞における抗癌剤耐性機構の解明

研究課題名（英文） molecular mechanism of chemoresistance in ovarian cancer cells

研究代表者

渡利 英道（WATARI HIDEMICHI）

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：10344508

研究成果の概要（和文）：

卵巣癌細胞の抗癌剤耐性機構を解明するために本研究を行い、以下の結果を得た。①細胞死（アポトーシス）抑制作用を有する clusterin (CLU) の発現がパクリタキセル（PTX）耐性卵巣癌細胞で発現が亢進していること、CLU の発現を si-RNA あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入によって抑制することで、PTX に対する耐性が解除しうること、卵巣癌患者組織における検討で CLU の発現と化学療法に対する感受性の間に負の相関があり、CLU の発現が早期卵巣癌患者における予後因子となり得ることが示された。②PTX の耐性に関与しうる microRNA について検討した結果、PTX 耐性卵巣癌細胞において miR-31 の発現が低下していること、miR-31 の導入によって PTX に対する耐性が解除されうること、miR-31 の標的分子がレセプター型チロシンキナーゼの一つである MET であり、MET の高発現によって卵巣癌細胞の PTX 耐性が誘導されること、MET の特異的な阻害剤を併用することで、卵巣癌細胞の PTX に対する感受性が回復しうること、が示された。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to investigate the molecular mechanism of chemoresistance and to find molecular targets to overcome chemoresistance in ovarian cancer cells. We reported that clusterin, an antiapoptotic molecule, is upregulated in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells compared to parental cells, introduction of si-RNA or antisense oligonucleotide against clusterin sensitized paclitaxel-resistant ovarian cancer cells to paclitaxel, clusterin immunoreactivity in ovarian cancer tissues inversely correlates with response to chemotherapy and is a prognosticator for early-stage ovarian cancer. We also reported that microRNA-31 (miR-31) is down-regulated in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells compared to parental cells, introduction of miR-31 sensitized paclitaxel-resistant ovarian cancer cells to paclitaxel, MET, a receptor tyrosine kinase, is a direct target molecule and MET can be involved in the resistant mechanism against paclitaxel and MET inhibitor can sensitize paclitaxel-resistant ovarian cancer cells to paclitaxel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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、卵巣癌、抗がん剤耐性、microRNA

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は女性性器悪性腫瘍の中で最も予後不良な疾患であり、本邦において近年その罹患率および死亡率が急速に増加している。卵巣癌治療は手術療法と化学療法を組み合わせで行われる。特に予後不良である進行卵巣癌の治療成績を向上させるためには、高度な手術手技を用いて肉眼的残存腫瘍が存在しない状態にすること、効果的な抗癌剤による化学療法を行うことが最も重要である。卵巣癌に対する抗癌剤としてシスプラチン、パクリタキセル (PTX) が登場し患者の生存率は大きく改善されたが、一旦は寛解状態は得られてもしばしば再発し、進行例の5年生存率は依然として30-40%に留まっている。再発卵巣癌は通常、初回の化学療法に用いた抗癌剤に耐性を獲得していることから、基本的に再度の化学療法による治癒は望めない。また、明細胞腺癌や粘液性腺癌などのようにもともと抗癌剤に対する感受性が低い組織型で、治療開始時点で進行した状態にある場合の予後は極めて不良である。すなわち、卵巣癌患者の生存率向上のためには抗癌剤耐性を克服しなければならない。卵巣癌細胞の抗癌剤耐性の機序としては一般に、1) 薬剤の細胞外への排泄促進、2) DNA修復の促進、3) 細胞内解毒機能の亢進、4) アポトーシスの阻害、などが様々に関与していると考えられている。耐性克服のためには耐性機構に関与する種々の因子の機能を制御するような分子 (アンチセンスオリゴヌクレオチド、si-RNA など) を新たに開発し、既存の薬剤と併用して薬剤感受性が回復されるかを *in vitro*、*in vivo* の実験系で検証する必要がある。タキサン製剤であるPTXはシスプラチンを代表とするプラチナ製剤と並んで卵巣癌を中心に婦人科悪性腫瘍における化学療法のkey drugの一つである。プラチナ製剤に対する耐性機構に関しては従来より様々な検討がなされているが、PTX機構についての研究は比較的新しく、未だ解明されていないといえる。

20mer程度のsmallRNAであり、3'-UTRに結合して標的分子の発現を調節する役割を担っていると考えられているmicroRNA (mi-RNA) に関しては最近、急速な研究成果の集積があり、mi-RNAが発生、発がん、さらにはアポトーシスなどの重要な生命現象に深く関与していることが報告されてきている。婦人科癌

領域においても、卵巣癌を中心に報告がなされるようになってきているが、最近では卵巣癌における抗癌剤感受性とmi-RNAの発現プロファイルとの関連を指摘する報告が国外で散見されている。しかしながら、それらの多くはmi-RNAが実際に抗癌剤耐性に関与するというデータを示しておらず、個々のmi-RNAが抗癌剤への耐性化に関与していることを *in vitro* や *in vivo* の実験系で検証すべき状況である。

2. 研究の目的

抗アポトーシス作用を有する clusterin (CLU) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで、すでに前立腺癌、肺癌、乳癌などで臨床第 II 相試験に用いられ、前立腺癌においては第 III 相試験が計画されている OGX-011 の有効性 (PTX 耐性解除作用) について卵巣癌細胞モデルを用いて *in vitro*、*in vivo* の実験系にて検討することを本研究の目的の一つとした。さらに、miR-31 の発現低下が卵巣癌細胞の PTX 耐性に関与するかについて *in vitro* の実験系を用いて検証するとともに、薬剤耐性に関与しうる miR-31 の標的分子を同定することを本研究のもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ① 細胞株：KF, SKOV3 およびその PTX 耐性株 (KF-TX, SKOV3-TX), OVK18
- ② CLU 過剰発現細胞株の樹立：CLU の発現ベクターを CLU の発現が低い OVK18 に導入して安定的に CLU を過剰発現している細胞株を樹立した。
- ③ CLU に対する si-RNA, あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチド (OGX-011) による CLU の発現抑制：一過性に si-RNA あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入して CLU の発現を抑制した場合の PTX 感受性の変化を検討した。
- ④ 卵巣癌組織における CLU 発現と化学療法感受性、予後との関連については、免疫組織学的に発現を検討した。

(2) は漿液性腺癌の KF 細胞、シスプラチン耐性の KFr13、明細胞癌の SK-OV-3、OVCAR-3、RMG-1、粘液性腺癌の TU-OM-1 の計 6 種類の卵巣癌細胞株を用いており、主な検討はこの

うち KFr13 とその PTX 耐性株の KFr13Tx を使用して行った。KFr13Tx は、KFr13 の培養液中に 30nM までの PTX を添加して樹立した。薬剤感受性試験は MTT アッセイを用いて行い、マイクロアレイ解析は mirVana™ miRNA Bioarray V2 (Ambion 社製) を用いて行った。卵巣癌細胞株での miR-31 過剰発現実験では、レンチウイルスベクターを用いて miR-31 前駆体を導入した。ルシフェラーゼレポーターアッセイは genecopoeia 社で委託作成した vector を用いて行った。リアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法、免疫組織学実験は、標準的な方法で行った。ヒト卵巣癌組織は、当院 IRB の承認のもとで収集した。動物実験は北海道大学ガイドラインに則って行い、Clea 社で生産された 6 週齢のヌードマウスを用いて行った。

4. 研究成果

(1) ① CLU の過剰発現によって、卵巣癌細胞における PTX に対する耐性が誘導されることが示された。
② CLU の発現を一過性に抑制した場合に、PTX 耐性株における PTX 感受性が回復することが示された。
③ 進行卵巣癌症例において CLU 発現と化学療法感受性との間に負の相関が認められること、早期卵巣癌症例においては、CLU 発現の高い症例で有意に予後が不良であった。

(2) ① PTX 耐性の卵巣癌細胞株において、miR-31 の発現が低下する。328 種類の miR に対応するチップを用いて行ったマイクロアレイ解析では、PTX 耐性細胞において 55 種類の miR の発現が減少しており、2 種類の miR が増加していた。このうち、当時乳癌の転移抑制に関する論文が Cell 誌に発表された、miR-31 に絞って検討することにした。確認のため、KFr13 と KFr13Tx の miR-31 の発現をリアルタイム PCR 法で定量的に比較したところ、やはり KFr13Tx で有意に miR-31 が低下していた。6 種類の卵巣癌細胞株を MTT アッセイで確認した IC50 値の低い順から高い順に並べると、RMG-1、SK-OV-3、OVCAR-3、KFr13、KF、TU-OM-1 となった。これに miR-31 の定量結果を重ねると、やはり PTX 耐性細胞で miR-31 が低下していた。

② miR-31 発現が上昇するほど PTX に対する耐性が解除される。

同一の細胞で miR-31 の発現の変化によりどのような影響がもたらされるのかを研究するために、miR-31 前駆体を組み込んだレンチウイルスベクターを transfection して、miR-31 の発現量の異なる 3 種類の KFr13Tx 細胞を作製した。これらの細胞を PTX で処理した後の viability を測定すると、KFr13 と比べて KFr13Tx は PTX に耐性であり、この KFr13Tx に miR-31 を導入すると、miR-31 の発現が高くなるにつれ viability が低下し、耐性が解除される傾向を認めた。

③ PTX 耐性と関わる miR-31 の標的分子について：標的分子の予測ソフトには、MIT より提供されている Targetscan を使用した。このソフトで卵巣癌との関わりのある標的分子を検索したところ、レセプター型チロシンキナーゼ MET が候補に挙げられた。MET は、卵巣癌の予後不良因子であると報告されている。また、卵巣癌において MET-PI3K 経路を介した薬剤耐性獲得の機序が存在するとされている。Targetscan によると、MET3' UTR の開始部分から数えて 89 から 95 番目の 7 塩基が miR-31 の結合部位と予測された。そこで、miR-31 の低下により MET の発現が増加し、PTX 耐性を獲得する、という仮説を立てた。まず、KFr13Tx において MET が PTX 耐性と関わっていることを確認するために、MET キナーゼ阻害薬の SU11274 と PHA665752 を用いた検討を行った。この 2 剤それぞれについて単剤では毒性のない濃度を確認しその濃度で PTX と併用したところ、PTX 単剤と比べて有意に viability が低下しており、MET が PTX 耐性と関わっている可能性が示唆された。前述の通り、miR は Ago 蛋白を含む RISC 複合体で mRNA と結合するが、我々は抗 Ago2 抗体を用いる免疫沈降キットで RISC 複合体ごと miR と結合している mRNA を抽出した。その後逆転写の行程を経て、標的分子のクローニングを行いました。すると、コントロール細胞と比較して、miR-31 発現細胞において RISC 複体内に MET の mRNA が多く含まれていることが判明した。MET の発現をウェスタンブロット法で確認すると、予想どおり KFr13 と比べて KFr13Tx で高発現しており、KFr13Tx においては miR-31 の発現が増加するほど MET が低下していた。この MET の発現傾向は、PTX 耐性のパターンと同じ傾向であった。前述した 6 種類の卵巣癌細胞株における miR-31 と PTX 耐性の相関に MET の発

現を重ねると、予想どおり miR-31 の発現が低く PTX に耐性の細胞で MET の発現が上昇していた。実際に miR-31 が MET mRNA の翻訳を阻害しているのかどうかを、ルシフェラーゼレポーターアッセイで確認した。コントロールはルシフェラーゼ遺伝子のみを組み込んだベクターであり、これに野生型の MET 3' UTR か miR-31 結合部に変異を加えた MET 3' UTR を直列に組み込んだベクターを用意した。野生型ではルシフェラーゼを含む mRNA に miR-31 が結合して翻訳を阻害するためルシフェラーゼは発現せず、★変異型では miR-31 が mRNA に結合できないためにルシフェラーゼが発現すると予想された。その結果は、やはり野生型の MET 3' UTR で miR-31 導入細胞のルシフェラーゼ活性が低下し、変異型の MET 3' UTR では同等であった。これらの結果は、miR-31 が前述した結合予測部位において MET mRNA に直接結合し、翻訳を阻害していることを示すものであった。

④ *in vivo*での検討：ヌードマウスの腹腔内に、KFr13Tx の control 細胞と miR-31 過剰発現細胞を注射し、癌性腹膜炎モデルを作成した。このマウスモデルで、PTX および MET キナーゼ阻害薬である SU11274 の腹腔内投与で治療を行い、生存期間を観察した。

その結果、control 群では PTX 単剤で治療した場合に無治療群と比較して生存期間に差がみられなかったが、miR-31 発現腫瘍では有意に生存期間が延長された。また、miR-31 の発現が低く PTX 単剤では比較的効果の低かった control 腫瘍では、MET 阻害薬である SU11274 を併用することで有意に生存期間が延長された。

⑤ 臨床検体を用いた検討：当院で治療を行った卵巣癌患者 12 名を対象に行った。全例で組織型は漿液性腺癌であり、IIIc 期以上の進行癌症例であった。また全例で初回手術時に残存腫瘍があり、化学療法の効果が予後を左右する症例であった。PTX とカルボプラチン(CBDCA)、あるいは同じタキサン系のドセタキセルと CBDCA の併用で治療を行い、RECIST 評価で CR と PR の群を感受性群、SD と PD の群を耐性群とした。

組織内の miR-31 発現は、予想どおり化学療法感受性群と比べて耐性群で有意に低下していた。StageIIIc 期で PTX/CBDCA 併用療法を行った 7 例を抽出して予後と比較したところ、miR-31 が低発現の 4 例は高発現の 3

例と比べて有意に予後が不良であった。また全 12 症例で miR-31 と MET の発現を比較したところ有意な負の相関を認め、基礎的検討の結果と一致していた。

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 Mitamura T, Watari H, Wang L, Kanno H, Hassan MK, Miyazaki M, Katoh Y, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Tanaka S, Sakuragi N. Downregulation of miR-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. *Oncogenesis* 2013; 2: e40(査読あり)

② Hassan MK, Watari H, Han Y, Mitamura T, Hosaka M, Wang L, Tanaka S, Sakuragi N. Clusterin is a potential molecular predictor for ovarian cancer patients' survival: targeting clusterin improves response to paclitaxel. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:113 (査読あり)

③ Hassan MK, Watari H, Christenson LK, Bettuzzi S, Sakuragi N. Intracellular clusterin negatively regulates ovarian chemoresistance: compromised expression sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biol* 2011; 32: 1031-47. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

① Hidemichi Watari, Takashi Mitamura, Noriaki Sakuragi. Downregulation of miR-31 induces taxane resistance in ovarian cancer cells through increase of receptor tyrosine kinase MET. 2013 SGI Annual Scientific Meeting. 2013.3.20-23. Hilton Orland Bonnet Creek (USA)

② 三田村 卓、渡利英道、櫻木範明. 卵巣漿液性腺癌において microRNA-31 の発現低下により paclitaxel 感受性が変化する. 第 52 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会. 2012. 7.19-21. 高輪プリンスホテル (東京)

③ 三田村 卓、渡利英道、櫻木範明. microRNA-31 の発現低下はレセプターチロシンキナーゼ MET の発現を介して卵巣癌のタキサン耐性を引き起こす. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2012. 4.13-15. 神戸国際会議場 (神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡利 英道 (WATARI HIDEMICHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：10344508

(2) 研究分担者

櫻木 範明 (SAKURAGI NORIAKI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70153963

(3) 連携研究者

なし