

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791509

研究課題名(和文)マイクロRNAを用いた子宮体部漿液性腺癌の新しい治療法の基礎的検討

研究課題名(英文)Basic research for new treatment development using microRNA in UPSC

研究代表者

鈴木 史彦(SUZUKI, Fumihiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20400343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体部漿液性腺癌(漿液性腺癌)は、いまだに標準治療が確立されておらず婦人科悪性腫瘍の中でも極めて予後の悪い疾患の1つである。本研究では、近年癌において異常発現が報告されているマイクロRNA(miRNA)に着目し、漿液性腺癌とmiRNAの関連性および機能を検討した。癌組織において発現減少するmiRNAを細胞株へ導入することで癌抑制的効果を確認した。さらに癌抑制作用はmiRNAが標的遺伝子としてオンコジーンの抑制を介した効果と考えられる。本成果は漿液性腺癌での癌抑制的なmiRNAの同定とmiRNAを標的とした分子標的治療への応用に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Uterine papillary serous carcinoma (UPSC) is a highly aggressive form of endometrial cancer and characterized by a high recurrence rate and a poor prognosis. To date, the standard treatment for UPSC has remained elusive. In the present study, we focused on microRNA (miRNA) that has been recently reported to be abnormal expressed in several cancers and the correlation between miRNA and UPSC. By introducing miRNA whose expression was down-regulated to UPSC cells suppressed cell proliferation. Furthermore, the inhibitory effects may be mediated by the suppression of the oncogenes that were showed as the targets of the miRNA. Taken together, the present study revealed that a novel and important role of miRNA as a tumor suppressor in UPSC and the identification of novel tumor-suppressive miRNA-mediated molecular pathways and targets may provide new insights into UPSC.

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：癌 エピジェネティクス miRNA 子宮体癌 漿液性腺癌

1. 研究開始当初の背景

子宮体部漿液性腺癌（漿液性腺癌）は前がん病変やその発生・進展についてほとんど解明されておらず、その他の内膜癌に比較して子宮外への進展が著しいことが特徴的であり非常に予後が不良な疾患である。すなわち漿液性腺癌における癌の発癌・進展メカニズムの解明をすることで新たな治療法の開発することは急務であると考えられる。近年、miRNA が癌と関連することが多くの癌種で報告され、miRNA が分子標的として癌治療薬・予防薬への応用できると期待されている。しかしながら、これまでに漿液性腺癌とmiRNAの関連について報告はほとんど見られないのが現状である。

そこで本研究では漿液性腺癌の新しい治療法の開発に向けた基礎研究として漿液性腺癌におけるmiRNAの癌への関与する分子メカニズムを明らかにすることを目的として、癌組織で特異的な発現減少を示すmiRNAの漿液性腺癌由来細胞株への導入を行い、癌細胞に与える影響の検討と標的遺伝子の検索を行った。

2. 研究の目的

(1) 癌細胞におけるmiRNAの機能解析

これまでにmiRNA異常発現が多くの癌種で癌の増殖や進展に関与していることが報告されている。そこで、これまでの研究から漿液性腺癌組織において正常組織と比較して顕著に発現減少を示すmiRNAに焦点を当て、それらのmiRNAが癌細胞において実際に抗腫瘍効果を示すかどうかをmiRNAを漿液性腺癌由来細胞株に導入してmiRNAの抗腫瘍効果を確認した。

(2) miRNAの標的遺伝子の検索

癌抑制的な作用を示すmiRNAは、標的遺伝子として癌遺伝子などの癌を促進に導く遺伝子を抑制することで癌抑制的な作用を示すと考えられる。そこで抗腫瘍効果を示したmiRNAに対して、その標的遺伝子を同定するため標的遺伝子予測プログラムにて候補遺伝子を予測し、miRNA導入後の標的遺伝子のタンパク質レベルでの発現およびレポーターアッセイによるmiRNAと標的遺伝子の結合を確認した。

(3) miRNAの薬剤感受性への影響の検討

これまでにmiRNAが薬剤耐性に関与すると他癌種報告で報告されている。そこでmiRNAが漿液性腺癌でも薬剤感受性に関与するか、子宮内膜癌化学療法の主要な薬剤であるpaclitaxel、cisplatin、adriamycinにおいて検討した。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞におけるmiRNAの機能解析

miRNAを漿液性腺癌由来細胞株2株に導入しmiRNAの癌細胞に与える影響を検討した。挿入した細胞は、細胞増殖能をCell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いてWST-assayにて、アポトーシス誘導能をCaspase 3/7 Glo assay (Promega) を用いたCaspase assayおよびフローサイトメーター (FACS) を用いたAnnexin V Assay Kit (MBL) のAnnexin-VおよびClick-iT EdU Pacific Blue™ Flow Cytometry Assay Kit (lifetechnologies) を用いた細胞周期のSubG1期の検出での解析、足場非依存性増殖能を3D-culture法、細胞周期はFACSを用いて、遊走能はTranswell Cell Migration Assay (BD biosciences) を用いて、浸潤能はTranswell Cell Invasion Matrigel Assay (BD biosciences) を用いて検討した。

(2) miRNAの標的遺伝子の検索

抗腫瘍効果を示したmiRNAの標的遺伝子を同定するため、miRNA標的遺伝子予測プログラムであるTargetScan

(<http://www.targetscan.org/>)

Miranda(microrna.sanger.ac.uk/)を用いてmiRNAの標的遺伝子の候補を予測した。また、miRNAの候補遺伝子が実際の標的遺伝子であるか実証するためmiRNAを導入した細胞株の標的遺伝子のタンパク質レベルの発現をWestern blotにより確認し、また標的遺伝子とmiRNAの結合をpmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) を用いた5' UTR reporter assayによって検討した。

(3) miRNAの薬剤感受性への影響の検討

miRNAの導入における薬剤感受性能への影響の確認は、子宮体癌における化学療法の主要な薬剤であるpaclitaxel、cisplatin、

Adriamycinの3剤をmiRNA導入細胞に添加してWST-assayにより検討した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞におけるmiRNAの機能解析
正常組織と比較し漿液性腺癌組織において発現の減少するmiRNAであるmiR-34bおよびmiR-101を漿液性腺癌由来培養細胞株2株(USPC-1、SPAC1-L)に導入することによってその機能を解析した。まずmiR-34bを導入した細胞の細胞増殖能をWST-assayにより検討したところ、それぞれ16.8%、8.7%と有意差を持って細胞増殖能が減少した($p=0.0001$, $p=0.0055$)。またCaspase 3/7活性はそれぞれ2.4倍、1.4倍に上昇し($p=0.0001$, $p=0.0001$) AnnexinVによるフローサイトメトリー解析ではアポトーシス誘導細胞数はそれぞれ1.6倍、2.9倍に上昇した。さらに遊走性ではそれぞれ16.6%、42%の減少を示し($p=0.0062$, $p=0.0022$) さらに浸潤性はそれぞれ86.6%、80.0%と顕著な細胞数の減少が示された($p=0.001$, $p=0.0003$)。

Anchorage-independent growth assayにより、足場非依存的増殖能が両細胞とも顕著に抑制されることが確認され($p<0.01$, $p<0.01$)。細胞周期解析によってmiR-34bの導入によりG0/G1アレストおよびsubG0/G1の増加を引き起こすことが見出された。我々はさらにこれまでにmiR-34bの他にmiR-101が漿液性腺癌組織で顕著に減少することを見出しており、miR-101を漿液性腺癌細胞株へ導入してその影響を検討した。WST-assayにおいてmiR-101導入細胞株はコントロールに比較して顕著に細胞増殖能を0.68倍、0.59倍抑制することが確認された($p<0.01$, $p<0.01$)。さらにCaspase 3/7 assayでは1.9倍、1.7倍($p<0.01$, $p<0.05$)およびFACSによるAnnexin-V detection assayでは3.6倍、2.2倍のアポトーシスの誘導をmiR-101導入細胞で確認された。

(2) miRNAの標的遺伝子の検索

miRNA標的遺伝子検索ソフト(Target Scan、Miranda)を用いてmiR-34bの標的遺伝子の候補を検索したところ両予測ソフトに共通してc-Met遺伝子が予測された。実際にc-Met遺伝子がmiR-34bによって制御されているか確認するため、miR-34bを胞株へ導入しc-Met

タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより確認したところ、それぞれ0.5倍、0.4倍の抑制されることが確認された。さらに、c-Met遺伝子の3'UTR領域を組込んだ5'UTR luciferase reporter assayによりmiR-34bがc-Met遺伝子3'UTR領域に結合することが確認された($p<0.01$, $p<0.05$)。

(3) miRNAの薬剤感受性への影響の検討
miRNAの導入における薬剤感受性能の変化は、子宮体癌化学療法の主要な薬剤であるpaclitaxel、cisplatin、Adriamycinの3剤をmiRNA導入細胞に添加しWST-assayにより検討したところ、paclitaxel、cisplatin、Adriamycinの3剤において薬剤感受性の変化をmiR-34b導入で確認することはできなかった。

(4) 研究成果のまとめと今後の展望

子宮体部漿液性腺癌の組織において特異的に減少していたmiRNAについて、培養細胞株レベルの癌細胞でのmiRNAの与える影響について検討したところ、miR-34bでは細胞増殖、足場非依存性増殖能、遊走・浸潤能、細胞周期、アポトーシス誘導に関与していることが明らかとなり、miR-101では細胞増殖およびアポトーシス誘導に関与していることが分かった。さらにmiR-34bは標的遺伝子としてオンコジーンであるc-Met遺伝子を標的としていることがわかり、c-Met遺伝子を介した癌細胞への関与が示唆された。しかしながらmiR-34bは子宮体癌化学療法で用いられるpaclitaxel、cisplatin、Adriamycinの3剤に対して薬剤感受性に影響する効果は確認できなかった。またmiR-101は他癌種でオンコジーンであるEZH2を標的にしているという報告もあり、それらの遺伝子を標的にして癌細胞に影響していると推察される。今後は癌細胞で異常発現の原因の解明と、さらなるmiRNAの標的遺伝子の解明が必要であると考えられる。また、miRNAは1つのmiRNAで数百の標的遺伝子を有しており細胞内でゲノムワイドに遺伝子を制御することが知られており、今回見出された癌抑制的なmiR-34bやmiR-101においても複数の標的遺伝子を制御している可能性が高い。よって今後これらのmiRNAの標的遺伝子を網羅的に同定しパスウェイ解析を踏まえた総合的な解析が必要

であると考えられる。また miRNA は生体に安定して存在することからバイオマーカーとして有用であると期待されており、生体内の核酸分子であるため miRNA 自体が分子標的治療の標的になるとして注目されている。以上のように、更なる miRNA の漿液性腺癌に関するメカニズムを解明することによって漿液性腺癌特有の増殖性、浸潤性および転移能を増大させる機構を明らかにできる可能性があり、miRNA を利用した新規分子標的治療薬の開発に大きく貢献することが予想される。

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1件)

Eri Hiroki, Fumihiko Suzuki, Jun-ichi Akahira, Satoru Nagase, Kiyoshi Ito, Junichi Sugawara, Yasuhiro Miki, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, and Nobuo Yaegashi. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 15;131(4):E395-404. 2011. 査読有 doi:10.1002/ijc.27345

[学会発表](計8件)

第13回日本婦人科がん分子標的研究会
鳥取 2014/3/15 「子宮体部漿液性腺癌に対する miR-101 を用いた分子標的治療の可能性」鈴木史彦、永瀬智、佐藤いずみ、宇都宮裕貴、新倉仁、渡部洋、笹野公伸、八重樫伸生

第72回日本癌学会学術総会 横浜
2013/10/5「子宮体部漿液性腺癌において miR-34b は細胞増殖、遊走・浸潤およびアポトーシスに与与する」鈴木史彦、永瀬智、赤平純一、廣木恵理、伊藤潔、宇都宮裕貴、笹野公伸、八重樫伸生

第65回日本産科婦人科学会学術講演会
札幌 2013/5/10「子宮体部漿液性腺癌における microRNA-34b の癌抑制的な機能の検討」鈴木史彦、永瀬智、廣木恵理、宇都宮裕貴、伊藤潔、新倉仁、

赤平純一、笹野公伸、八重樫伸生
第71回日本癌学会学術総会 札幌
2012/9/21「子宮体部漿液性腺癌において miR-34b はエピジェネティックに制御され、癌の浸潤・転移に与与する」鈴木史彦、永瀬智、赤平純一、廣木恵理、伊藤潔、宇都宮裕貴、笹野公伸、八重樫伸生

第64回日本産婦人科学会学術講演会
神戸 2012/4/13「子宮体部漿液性腺癌において microRNA-34b は浸潤性および足場非依存性増殖能を制御する」鈴木史彦、永瀬智、赤平純一、廣木恵理、伊藤潔、宇都宮裕貴、菅原準一、笹野公伸、八重樫伸生

第70回日本癌学会学術総会 名古屋
2011/10/3「子宮体部漿液性腺癌(UPSC)における microRNA-34b の発現制御および機能の解明」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

第69回日本癌学会学術総会 大阪
2010/9/24「子宮体部漿液性腺癌において microRNA-34b は癌抑制的な役割をもつ可能性がある」廣木恵理、赤平純一、鈴木史彦、永瀬智、伊藤潔、笹野公伸、八重樫伸生

第69回日本癌学会学術総会 大阪
2010/9/22「子宮体部漿液性腺癌におけるマイクロRNAの役割」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

[その他]なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木史彦 (SUZUKI, FUMIHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20400343