

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592428

研究課題名(和文)マイクロRNAの発現と上皮性卵巣がんの臨床像との関連に関する研究

研究課題名(英文) Study of the relationship between the expression of microRNAs and gynecologic malignancies

研究代表者

金内 優典 (KANEUCHI, Masanori)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：60333613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌に関してはマイクロRNA-30c, 99a, 130a, 141が卵巣癌の組織型を特徴づけ、マイクロRNA-141, 200a, 200c, 345が明細胞癌発癌に関わる因子であると思われた。またマイクロRNA-9, 141, 200c, 224, 512, 517, 518, 519, 526が絨毛癌発症に関わる因子であること、子宮内膜癌ではマイクロRNA-106bが他の因子とともにその悪性度の変化に關与していることが明らかになった。これらのマイクロRNAの発現状況を検討することにより、卵巣癌をはじめとする婦人科癌の早期発見、治療の個別化に寄与できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the microRNA-30c, 99a, 130a, 141 were differently expressed among ovarian cancer cell lines. The different expression of these microRNAs may characterize different histological type of ovarian cancer. And, the expression of microRNA-141, 200a, 200c, 345 were up-regulated in ovarian clear cell carcinoma. These micro-RNAs might be responsible for ovarian carcinogenesis. Compared to the cell line derived from normal villi, expression of microRNA-512, 517, 518, 519, 526 were up-regulated, and that of microRNA-125b was markedly down-regulated in choriocarcinoma cell lines. These micro-RNAs might be responsible for occurrence of choriocarcinoma. We also found that the expression of microRNA-106b and Kruppel-like factor 17(KLF17) correlated with the different malignant potential of endometrial cancer. Further investigation to evaluate the expressions of microRNAs may contribute to the earlier diagnosis or treatment of gynecologic cancers.

研究分野：外科系臨床医学産婦人科学

キーワード：卵巣癌 絨毛癌 子宮内膜癌 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年の癌組織における遺伝子発現調節に関する研究では、エピジェネティックな変化であるプロモーター領域のメチル化やmiRNAによる翻訳後調節のメカニズムが注目されている。miRNAはわずか20塩基程度で構成されるごく小さなRNAで、メッセンジャーRNA配列に選択的に機能しタンパク発現を抑制しうる。miRNAの機能の詳細はいまだ研究途中であるが、細胞の分化・増殖、アポトーシス誘導に関与していると考えられ、その機能破綻が癌化あるいは転移の一因となりうることが報告されている(引用文献)。またmiRNA自身の発現調節がプロモーター領域のメチル化と関係するという報告もなされている(引用文献)。

本邦において卵巣癌や子宮内膜癌は増加傾向にある。上皮性卵巣癌は、病理学的に多彩な組織型を示す。代表的なものは漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌の4種であるが、それぞれの組織型によって異なった臨床像を呈する傾向がある。例えば漿液性腺癌はしばしば腹膜播種を伴う進行癌として見出されるが、抗癌剤感受性が高く一時的には化学療法が奏功しやすいが、再発すると抗癌剤耐性となりやすい。一方粘液性腺癌や明細胞腺癌は、卵巣に限局した早期癌で見いだされることも多いが、抗癌剤抵抗性を示すため進行癌での治療にはきわめて難渋する。

一方、子宮内膜癌の多くは予後良好であるが、悪性度の高い非ホルモン依存性の子宮内膜癌の治療にはやはり難渋することが多い。われわれの検討によりmiRNA-106bがTWIST-1(Twist-related protein 1)の発現を調節し、子宮内膜癌の上皮間葉転換を制御し、その悪性度の変化に寄与していることが見出された(引用文献)。

これら婦人科悪性腫瘍に関わるmiRNAを明らかにすることは、増加する婦人科悪性腫瘍の診断・治療に寄与することが期待されている。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、上皮性卵巣癌での

マイクロRNA(miRNA)発現の差異及びそのプロモーターメチル化による発現調節と、上皮性卵巣癌の漿液性腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌、明細胞腺癌の4種の組織型による臨床像の違いとの関連について検討することである。本研究により、上皮性卵巣癌の組織型により異なる浸潤・転移能力や、抗癌剤耐性など臨床像の差異に関与するmiRNAの発現の差異や発現調節メカニズムを明らかにし、上皮性卵巣癌の診断、治療法の開発に寄与することを目的としている。

従たる目的として、上皮性卵巣癌同様に近年増加している子宮内膜癌の悪性度に寄与すると思われるmiRNA-106の発現により制御される子宮内膜癌の悪性度に違いに関与する因子の機能について検討した。また、他の婦人科悪性腫瘍(絨毛癌)におけるmiRNAの発現状況を検討し、絨毛癌発生に寄与するmiRNAを見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

卵巣癌細胞株(OVCAR-3, SKOV-3, Caov3, ES-2, PA-1, KF, MH, RMG1, MCAS)、子宮内膜症性嚢胞を母地として発生した卵巣明細胞腺癌での良性子宮内膜症性嚢胞成分と明細胞腺癌成分についてそのmiRNAの発現状態について網羅的に解析した。卵巣癌細胞株は脱メチル化剤処理前後での発現を比較検討し、メチル化により調節されている可能性のあるmiRNAの存在を検討した。

従たる検討として正常絨毛由来細胞株(HTR)と絨毛癌細胞株(JEG, JAR, BeWo, T3M-3)でのmiRNA発現の違いに関して網羅的に、あるいはreal-time PCR法にて検討した。

子宮内膜癌に関してはmiRNA106bにより制御されるTWIST-1を制御する因子としてKLF17(Kruppel-like factor 17)に着目しその機能について正常子宮内膜由来細胞株、子宮内膜癌細胞株(Ishikawa細胞, HHUA細胞)への遺伝子導入あるいはノックダウンによる細胞の浸潤能や抗がん剤耐性能の変化について検討した。

4. 研究成果

(1)卵巣癌に関与するマイクロRNAの検討

子宮内膜症性嚢胞を母地として発生した卵巣明細胞腺癌の良性子宮内膜症性嚢胞成

分と明細胞腺癌成分組織での miRNA の発現を比較したところ、miRNA-141,200a,200c,345 の発現が癌組織で 1000 倍以上亢進していた。反対に miRNA-29c,98,100,222,497 の発現は 1/100 以下に低下していた。卵巢癌細胞株 (OVCAR-3, SKOV-3, ES-2, PA-1) との発現で比較すると、これら卵巢癌細胞株では miRNA-20b の発現が亢進している一方、miRNA-143,145,451 の発現が認められなかった。これら細胞株間での発現を比較すると miRNA-30c の発現は OVCAR-3 細胞にのみ認められた。miR-99a は SKOV-3 細胞と ES-2 細胞に、miRNA-130a は SKOV-3 と PA-1 に、miRNA-141 は OVCAR-3 のみに発現が認められた。以上より miRNA-141,200a,200c,345 は子宮内膜症性嚢胞の癌化に寄与する因子である可能性があること、miRNA-30c,99a,130a,141 は卵巢癌の組織型を特徴づける因子である可能性があることが見出された。

卵巢癌細胞株 (OVCAR-3) を脱メチル化剤 (5-aza-2-deoxycytidine) 添付下で培養し、通常培養した親細胞株との miRNA の発現の変化について検討したところ、miRNA-296,494 の発現が回復することが見出された。これにより卵巢癌発症に関して miRNA-296,494 のメチル化が関与している可能性が示唆された。

以上により卵巢癌の発生や組織学上の差異に關与すると推定された miRNA の存在が推定された。向後はこれら miRNA の存在を血清学的に定量検査する方法を確立することにより卵巢癌の早期発見や、治療後の経過観察に応用できる可能性がある。

(2) 絨毛癌に關与するマイクロ RNA の検討

正常絨毛由来細胞株 (HTR) と絨毛癌細胞株 (JEG, JAR, BeWo, T3M-3) での miRNA の発現の差異について網羅的に解析検討したところ、miRNA-512,517,518,519,526 が癌細胞株において 1000 倍以上の発現亢進を示していることを見出した。また miRNA-9,93,125b,130b,141,142-3p,200c,224 の発現を HTR 細胞と BeWo 細胞、JEG 細胞で比較したところ miRNA-125b の発現は BeWo 細胞と JEG 細胞で約 1/1000 に低下していた。一方 miRNA-9,141,200c,224 の発現は約 10~100 倍亢進していることが見出された。

以上により miRNA-9,141,200c,224,512,517,518,519,526 は絨毛癌発生に寄与する可能性があることが示唆され、これら miRNA を血清学的に定量検査する方法を確立することにより、胎状奇胎罹患患者の絨毛癌進展への早期発見や、治療効果のより精密な判定に応用できる可能性がある。

(3) 子宮内膜癌に關与するマイクロ RNA の検討

癌細胞の上皮間葉転換に關与することが知られている KLF17 (Kruppel-like factor 17) の発現は正常子宮内膜由来細胞株と比較して子宮体癌細胞株で亢進していた。そこで KLF17 を子宮内膜癌細胞株でさらに過剰発現させたところ、内膜癌細胞の上皮間葉転換が促進され、その浸潤能や抗がん剤 (Paclitaxel) への耐性が亢進した。反対に、KLF7 をノックダウンすると浸潤能や抗がん剤耐性は低下した。さらにこれらの変化は KLF7 が TWIST-1 (Twist-related protein 1) のプロモーター領域に結合し、その転写を活性化することによることを見出した。TWIST-1 は miRNA-106b により発現制御されていることから、子宮内膜癌の TWIST-1 の発現の差異による悪性度の変化に KLF-7, miRNA-106b が関与していることが見出され、本件について報告した。

(4) まとめ

難治性である卵巢癌の早期発見あるいは治療管理、絨毛癌発生の予知あるいは治療管理そして近年増加傾向にある子宮内膜癌の悪性度などの診断に有用な可能性があるマイクロ RNA の注力な候補が抽出された。これらを臨床的に腫瘍マーカーとして用いることにより婦人科領域の各種悪性腫瘍の早期発見による生命予後の改善、再発の予知による治療の個別化により、患者 QOL の改善に大きく寄与できる可能性がある。

< 引用文献 >

- O'Donnell KA, et. al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature. 2005 Jun 9;435 (7043):839-43.
Toyota M, et.al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell

translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. Cancer Res. 2008 Jun 1;68(11): 4123-32.

Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Sudo S, Sakuragi N. MicroRNA-106b modulates epithelial-mesenchymal transition by targeting TWIST1 in invasive endometrial cancer cell lines. Mol Carcinog. 53(5):349-359, 2014.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Dong P, Kaneuchi M, Xiong Y, Cao L, Cai M, Liu X, Guo SW, Ju J, Jia N, Konno Y, Watari H, Hosaka M, Sudo S, Sakuragi N. Identification of KLF17 as a novel epithelial to mesenchymal transition inducer via direct activation of TWIST1 in endometrioid endometrial cancer. Carcinogenesis. (査読あり) 35(4):760-768,2014.

DOI:10.1093/carcin/bgt369

〔学会発表〕(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金内 優典 (KANEUCHI, Masanori)
長崎大学・病院(医学系)・講師
研究者番号: 6 0 3 3 3 6 1 3

(2)研究分担者

櫻木 範明 (SAKURAGI, Noriaki)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
特任教授
研究者番号: 7 0 1 5 3 9 6 3

(3)研究協力者

董 培新 (DONG, Peixin)