

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592447

研究課題名(和文) 癌周辺微小環境を忠実に再現した新しい腹膜播種実験系の開発とその可能性の検討

研究課題名(英文) Identification of micro RNAs which affected by tumor microenvironments of ovarian cancer and analysis of a potential as a therapeutic target

研究代表者

澤田 健二郎 (Sawada, Kenjiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00452392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の腹膜播種が進展して発症する癌性腹膜炎の治療は極めて難渋し、消化器癌や卵巣癌の死因に直結する。本研究では、卵巣癌細胞が接着する際に血流の支配を離れ、低酸素状態に陥ることに着目し、低酸素下で発現が減少するマイクロRNAhsa-miR-199a-3p(以下miR-199a-3p)を見出した。さらに解析を進め、miR-199a-3pは癌の播種、増殖に重要なチロシン受容体キナーゼの一つであるc-Metの発現を制御していることを確認し、miR-199a-3pの卵巣癌細胞への導入が腹膜播種を抑制することを見出した。即ち、miR-199a-3pが新たな卵巣癌治療の分子標的となる可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：During the dissemination of ovarian cancer cells, cells are floating in the peritoneal cavity without vascular supply and exposed in hypoxic conditions. We suggest that hypoxic stimuli affect ovarian cancer cell behavior. In this study, we screened miRNAs which expression were altered under hypoxic condition. miRNA PCR arrays revealed that the expression of miR-199a-3p decreased under hypoxic conditions. In silico analyses led us to consider MET is one of the target genes of miR-199a-3p. miR-199a-3p expression was inversely correlated with c-Met expression in ovarian cancer cells. Transfection of precursor miR-199a-3p into ovarian cancer cells reduced c-Met expression followed by the inhibition of the proliferation, adhesion and invasion. In an ovarian cancer xenograft model, the enforced expression of miR-199a-3p in SKOV3 cells significantly suppressed peritoneal dissemination. Thus we suggested that miR-199a-3p is a potential target for treating ovarian cancer dissemination.

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：卵巣癌 腹膜播種 腹膜中皮細胞 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌や胃癌などの消化器癌におけるもっとも頻度の高い転移・再発形式は腹膜播種であり、この病態が進行すると癌性腹膜炎から腸閉塞や水腎症、腹水貯留を併発し、患者の全身状態は急速に悪化する。したがって、癌性腹膜炎の治療は癌治療の中でも非常に重要な位置を占め、その成績は癌の予後を大きく左右する。しかしながら、腹膜播種として再発した場合、その治療には極めて難渋することが多く、最新の抗癌剤治療や放射線治療が奏効しない場合が殆どである。

我々は以前より、卵巣癌の腹膜播種という特性に着目、癌細胞の細胞外マトリックスへの接着、間質への浸潤に焦点を当てて、いくつかの標的分子を解明し、かつそれらが予後因子であることを報告してきた (Sawada K, et al. Gynecol. Oncol. 87:252-9;2002, Sawada K, et al. Cancer Res., 62:6015-20; 2002. Hashimoto K, Sawada K, et al. Cancer Res., 65:540-5;2005. Sawada K, et al. Cancer Res., 67:1670-9;2007)。さらに最近、我々は卵巣癌が上皮細胞としての特性を失う過程で、ファイブロネクチンに対する受容体である Integrin- $\alpha 5$ の発現が増強することを発見し、この Integrin- $\alpha 5$ は癌細胞の接着能に重要な役割を果たしていること、Integrin- $\alpha 5$ の強発現が卵巣癌の予後因子であることを報告した (Sawada K, et al. Cancer Res. 2008;68;2329-39)。この我々の研究成果をもとに再発卵巣癌および腹膜癌に対して、ヒトキメラ化 Integrin- $\alpha 5$ 抗体 Velociximab を用いたフェーズ II 臨床試験が米国で立案、実行され、2009年の米国臨床腫瘍学会でその成績が報告された (J. Clin. Oncol. 27:15s;2009 (suppl; abstr 5560)。残念ながら、Velociximab の単剤及び抗癌剤との併用投与は癌患者の無病期間および生存期間の延長に寄与しなかった。つまり、我々のこれまでの基礎研究の成果は未だ実臨床への応用まで届いていない。のみならず、他の分子標的治療薬の臨床試験の結果をみても腹膜播種を来した進行がん患者の生命予後そのものを改善させる臨床データは未だ得られていない。まだまだ新たな分子標的治療の可能性を模索する必要性は極めて高いと考えている。

「なぜ、初回治療や *in vitro* の実験系では有効な抗がん剤治療は腹膜播種として再発した際に無効なのか？」を考察した。そもそも卵巣癌では発癌の時点で P53 や PTEN などの genetic な変異は発生している。従って、腹膜播種再発においては、癌細胞が腹腔内環境で生存していく過程において、何らかの epigenic な刺激を受けて更なる生存能を獲得しているのではないかと考えた。その刺激が如何にもたらされるかを考察し、今回の研究では、低酸素刺激に着目した。腹腔内に飛び散った癌細胞は腹腔内を漂流している間、血流の供給を受けないので、強い低酸素環境

下にさらされている。その間に何らかの Epigenetic な刺激を受けて、癌細胞が更なる増殖能、浸潤能を獲得し、治療抵抗性を来しているのではないかと考えた。Epigenetic Factor として、今回はマイクロ RNA (miRNA) に焦点を当てた検討を行うことにした。ヒトでは、ゲノムにコードされる 2500 種類以上の miRNA 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。そして、その半数以上が癌遺伝子の近傍に存在しており、miRNA は癌細胞が低酸素環境や抗がん剤に暴露された際に、幹細胞様の性質を獲得する過程に大きく関わっているのではないかと想像する。即ち、そのような環境下で発現が変動する miRNA の網羅的な解析を行い、その中から卵巣がんの腹膜播種進展や抗がん剤に対する治療抵抗性を制御する miRNA を同定することは新たなテーラーメイドな遺伝子治療への可能性を有しているのみならず、卵巣癌幹細胞の特性の解析にもつながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、卵巣癌細胞株において低酸素刺激を与えることにより、発現が変動する miRNA の網羅的解析を行い、その miRNA が制御する分子の同定を試みることにした。そして、さらにその miRNA を標的とする卵巣癌腹膜播種治療の可能性を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

低酸素刺激による変動するマイクロ RNA の網羅的解析

まず、低酸素刺激で卵巣癌細胞の浸潤能、接着能が亢進するかどうかを *In vitro* invasion assay, Adhesion assay で評価した。続いて、卵巣がん細胞株 CaOV3 および RMUG-S に低酸素刺激 (1% O_2 , 48 時間) を与えた上で、RNA を抽出し、その miRNA の発現を正酸素状態 (20% O_2) を対照として Taqman miRNA microarray (Applied Biosystem) を用いて、網羅的に解析し、その両細胞で低酸素刺激によって発現が変動する miRNA のリストを作成した。さらに、それらの候補 miRNA が制御する可能性がある分子を TargetScan や Diana-T といったアルゴリズムソフトを用いていくつか抽出し、後述するが、今回の検討では、低酸素刺激で発現が有意に減少する hsa-miR-199a-3p (miR-199a-3p) に焦点をあて、さらにこの miRNA が制御する分子として、代表的な癌遺伝子である MET に着目することにした。

卵巣癌細胞株における miR-199a-3p の発現量と c-Met の発現量との逆相関関係の検討

我々は以前より多くの卵巣がん細胞株を所有しており、それらの RNA 及びタンパク質は既に抽出し保存している。よって、その RNA を用いて TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems) により、miR-199a-3p の発現量を細胞間で比較検討した。正常コン

トロールとして、婦人科手術で採取した正常卵巣より採取した初代培養卵巣上皮細胞を用いた。c-Met の発現量は Western Blot 法にて検討し、両者が逆相関関係にあるかどうかの統計処理を行った。

miR-199a-3p の強制導入および阻害剤導入による対象分子の発現変動の解析

上記実験で検討した結果を踏まえ、miR-199a-3p の発現が低下している卵巣癌細胞株に miR-199a-3p の前駆体 (Ambion) を強制導入することによって、c-Met の発現量に変化を与えるかどうかの検討を行った。

miR-199a-3p の導入により卵巣癌腹膜播種を抑制できるかの検討

まず miR-199a-3p の強制導入が、c-Met その発現抑制を通じて、卵巣がん細胞の浸潤能、接着能、増殖能に与える影響を *in vitro* invasion, adhesion, proliferation assay で検討した。

我々は免疫不全マウスに腹腔内投与することにより卵巣癌 III 期に準じた腹膜播種像を形成する卵巣がん細胞株 (SKOV3-ip1, HeyA-8) をいくつか所有しており、それらを用いた腹膜播種モデルマウス実験系を用いる。まず、卵巣がん細胞株に miR-199a-3p の配列を含んだレンチウイルスベクター (miRNA Lentivectors, Biosettia 社) を導入、抗剤による selection を行い、miRNA 安定発現株を作成、それを腹腔内投与することにより形成される腹膜播種がコントロールと比べて抑制されるかの検討を行った。具体的には播種形成後にマウスを安楽死させ、その腫瘍重量、腹水量、播種数を比較検討する。さらに腫瘍を採取し、免疫組織染色、Western Blot を行い、*in vivo* における miRNA の作用点を検討した。

4. 研究成果

低酸素刺激は卵巣癌の接着能、浸潤能を亢進させる。

二種類の卵巣癌細胞株 CaOV3 と RMUG-S を実験に用いた。これらの細胞株を 48 時間 1% O₂ に低酸素下に培養した後に、96 ウェルプレートに撒き、一時間後にウェルを洗浄し、その時点で接着している細胞数を 20% O₂ で培養した細胞との比較検討を行った。細胞数は細胞をギムザ染色後、ウェルにおける 560 nm の吸光度で相対的に算出した。結果を図 1 にします。両細胞において、低酸素刺激により、卵巣癌の接着能は有意に亢進していた。

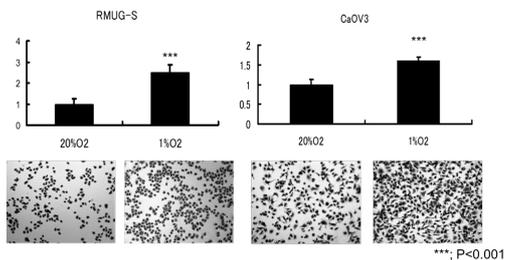


図1 低酸素刺激は卵巣癌細胞の接着能を亢進させる。

続いて、*In vitro* invasion assay を行った。具体的には 24 ウェルに 8 μm のポアを有する Boyden chamber を設置し、Chamber 上に 1 x 10⁵ 個の細胞をまち、下層に 10% FCS 入りの DMEM 培地を撒いて、48 時間、20% O₂ もしくは 1% O₂ 下に培養し、Chamber を通過する浸潤細胞数を比較検討した。結果は図 1 同様に 1% O₂ 存在下で有意に浸潤能の亢進を認められた。

低酸素刺激により変動する miRNA の網羅的解析

引き続き、卵巣がん細胞株 CaOV3 および RMUG-S に低酸素刺激 (1% O₂, 48 時間) を与えた上で、RNA を抽出し、その miRNA の発現を正酸素状態 (20% O₂) を対照として Taqman miRNA microarray (Applied Biosystem) を行い、両細胞において低酸素刺激によって発現が変動する miRNA のリストを作成した。結果は図 2 に示した通り、4 種の miRNA の発現が低下し、5 種の miRNA の

	CaOV3	RMUG-S
hsa-miR-199a-3p	0.198	0.015
hsa-miR-216b	0.019	0.061
hsa-miR-548d-5p	0.315	0.265
hsa-miR-579	0.052	0.476

低酸素で発現が低下する miRNA (< 0.5)

	CaOV3	RMUG-S
hsa-miR-22	2405.951	1048.212
hsa-miR-136	8.645	8.9
hsa-miR-202	153.027	19.549
hsa-miR-210	8.354	5.293
hsa-miR-636	10.926	194.666

低酸素で発現が増加する miRNA (> 5)

図2 低酸素環境下で発現が変動する miRNA

発現が増加していた。

そこで、これらの候補 miRNA が制御する可能性がある分子を TargetScan および Diana-T といったアルゴリズムソフトを用いて *in silico* に検討し、今回は miR-199a-3p が制御する MET 癌遺伝子に着目して、さらなる検討を行った。

miR-199a-3p が MET 癌遺伝子の発現を制御するかについての検討

まず、3 種類の卵巣癌細胞株 (SKOV3ip1, CaOV3, RMUG-S) に 1% O₂ の低酸素刺激を 48 時間与えたのちに細胞の Lysate を回収し、c-Met の発現を検討した。図 3 に示す通り、低酸素

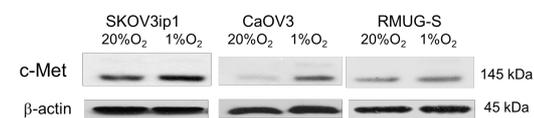


図3 Western Blot. 低酸素条件下により、c-Met 発現が亢進する

刺激により、c-Met の発現は亢進した。

従って、低酸素で発現が減弱する

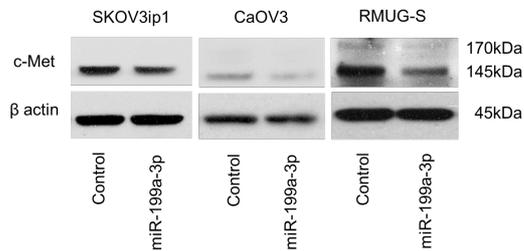


図4 miR-199a-3pの一過性導入により、c-Metの発現は減弱する。

miR-199a-3pがc-Metの発現を制御していると考え、今度は卵巣癌細胞にmiR-199a-3pの前駆体を一過性導入したところ、図4に示す通り、c-Metの発現が抑制された。

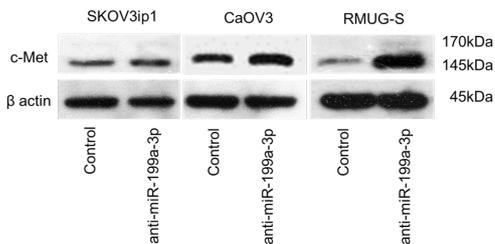


図5 miR-199a-3pの阻害剤の導入により、卵巣癌細胞におけるc-Metの発現は亢進する。

逆にmiR-199a-3pの阻害剤を導入したところ、図5に示す通り、今度はc-Metの発現が亢進した。即ち、miR-199a-3pがMET遺伝子の発現を制御していることを証明した。

卵巣癌細胞株におけるmiR-199a-3pの発現量とc-Metの発現量との逆相関関係の検討

の検討で、miR-199a-3pがMET遺伝子の発現を制御していることが判明したので、卵巣

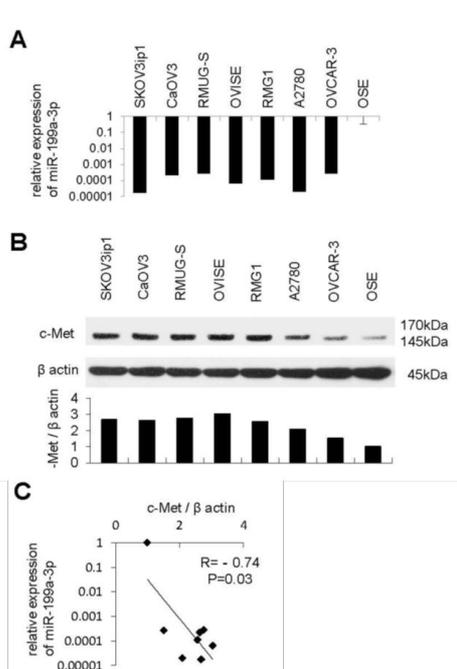


図6 miR-199a-3pとc-Metの発現は卵巣癌細胞株において逆相関している。A, TaqMan microRNA assays. B, Western Blot. C, 両者の発現比をプロット。

癌細胞株における両者の逆相関性をmiR-199a-3pについてはTaqMan microRNA assaysでMET遺伝子については、c-MetのWestern Blot法を用いて検討した。

7種類の卵巣癌細胞株(SKOV3ip1, CaOV3, RMUG-S, OVISe, RMG-1, A2780, OVCAR3)で検討した。コントロールとして、婦人科良性手術時に正常卵巣より採取初代培養したOvarian Surface epithelium (OSE)を用いた。図6cに示したとおり、両者の発現は有意に逆相関していた。

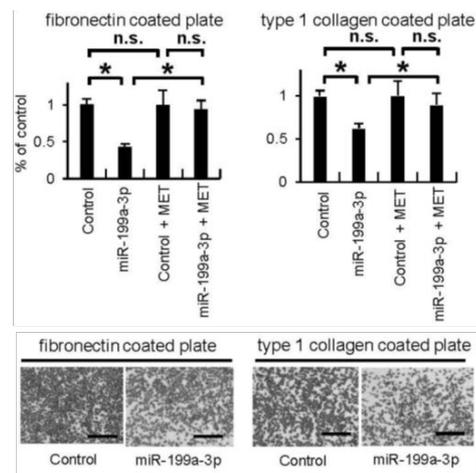


図7 In vitro adhesion assay.

SKOV3ip1細胞のFibronectinやCollagenへの接着能はmiR-199a-3pの導入により抑制される。その抑制はMETの同時導入により回避される。

miR-199a-3pの導入により卵巣癌細胞の接着能、浸潤能、増殖能が抑制できる。

卵巣癌細胞株SKOV3ip1にControl miRNAとmiR-199a-3pを一過性導入し、細胞外マトリックスであるfibronectinやcollagenへの接着能を検討した。SKOV3ip1細胞の接着

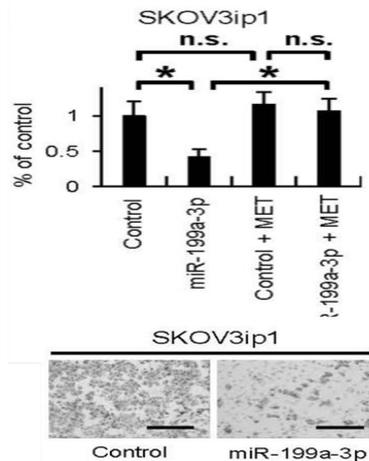


図8 In vitro invasion assay. SKOV3ip1細胞の浸潤能はmiR-199a-3pの導入により抑制される。その抑制はMETの同時導入により回避される。

能は miR-199a-3p の導入により抑制されたが、その抑制は MET の同時導入により回避された(図7)。即ち、miR-199a-3p は MET の発現を抑制することにより、癌細胞の接着能を抑制した。同様に *in vitro* invasion assay を行った。図8に示した通り、SKOV3ip1 細胞の浸潤能は miR-199a-3p の導入により抑制されたが、その抑制は MET の同時導入により回避された。さらに卵巣癌細胞の増殖能

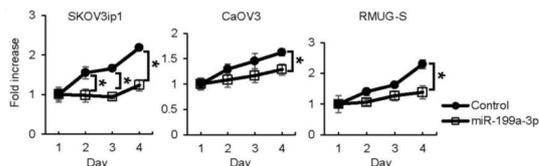


図9 In vitro proliferation assay.
miR-199a-3p は卵巣癌の増殖能を有意に抑制する

を検討した。図9に示したよりに3種類の卵巣癌細胞株(SKOV3ip1, CaOV3, RMUG-S)において、miR-199a-3p は卵巣癌の増殖能を抑制した。

以上、miR-199a-3p は卵巣癌の接着能、浸潤能、増殖能を MET 遺伝子の発現抑制を通じて、抑えることを証明した。

卵巣癌腹膜播種モデルマウスにおいて、miR-199a-3p は腹膜播種を抑制する。

Luciferase vector を安定発現した卵巣癌細胞 SKOV3 を作製した。その細胞 1×10^6 個を免疫不全雌マウスに腹腔内投与し、42日後に Luciferin を投与し、腹腔内腫瘍を発色させた。miR-199a を遺伝子導入した SKOV3 細胞において、Control miRNA と比べて著明に腹

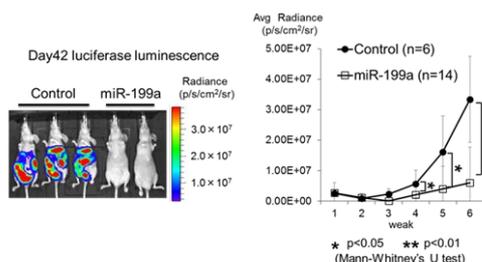


図10 miR-199a は卵巣癌の腹膜播種を抑制する。
Luciferase vector を安定発現した卵巣癌細胞 SKOV3 を免疫不全雌マウスに腹腔内投与し、42日後に Luciferin を投与し、腹腔内腫瘍を発色させた。miR-199a を遺伝子導入したSKOV3 細胞では、Control miRNA と比べて著明に腹膜播種が抑制された。

膜播種が抑制された(図10)。即ち、miR-199a を標的とした分子標的治療は *in vivo* においても、卵巣癌の腹膜播種を抑制する可能性が示唆された。

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)

miR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin alpha5 Expression.

Ohyagi-Hara, C. Sawada, K. Kamiura, S. Tomita, Y. Isobe, A. Hashimoto, K. Kinose, Y. Mabuchi, S. Hisamatsu, T. Takahashi, T. Kumasawa, K. Nagata, S. Morishige, K. I. Lengyel, E. Kurachi, H. Kimura, T.
Am J Pathol 182:1876-1889, 2013.

Estradiol and raloxifene induce the proliferation of osteoblasts through G-protein-coupled receptor GPR30

Noda-Seino, H. Sawada, K. Hayakawa, J. Ohyagi-Hara, C. Mabuchi, S. Takahashi, K. Nishio, Y. Sakata, M. Kurachi, H. Kimura, T. J Endocrinol Invest 36:21-27, 2013.

Targeting interleukin-6 receptor inhibits preterm delivery induced by inflammation
Wakabayashi, A. Sawada, K. Nakayama, M. Toda, A. Kimoto, A. Mabuchi, S. Kinose, Y. Nakamura, K. Takahashi, K. Kurachi, H. Kimura, T.
Mol Hum Reprod 19:718-726, 2013.

〔学会発表〕(計1件)

Hypoxia related microRNA, miR-199a-3p, inhibits ovarian cancer progression through the suppression of c-Met expression

Kinose, Y. Sawada, K. Mabuchi, S. Morishige, K. Kimura, T.
第72回日本癌学会学術総会 10.3-5/'13 横浜

〔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 澤田 健二郎
(Sawada Kenjiro)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00452392

(2)研究分担者 馬淵 誠士
(Mabuchi Seiji)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00452441

研究分担者 磯部 晶
(Isobe Aki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60397619

研究分担者 橋本 香映
(Hashimoto Kae)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90612078

(3)連携研究者
()

研究者番号：