

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592498

研究課題名(和文)マイクロRNA解析による子宮体部漿液性腺癌の薬剤耐性機序の解明と治療応用への検討

研究課題名(英文)The role of micro RNA in chemo- resistance of uterine serous carcinoma

研究代表者

永瀬 智 (NAGASE, Satoru)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：00292326

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)：子宮漿液性腺癌(USC)細胞株でパクリタキセル(PTX)、シスプラチン(CDDP)の耐性株を樹立し、マイクロRNAマイクロアレイにより、耐性株において薬剤の暴露に比例して発現減少を認めたlet-7cについて解析した。let-7cを耐性株に導入したところ、PTXとCDDPに対する薬剤耐性が増強した。let7cの標的遺伝子HMGA2の発現は、耐性株へのlet-7c導入により有意に減少した。薬剤排出トランスポーターとの関連では、let7c導入によりABCC1の発現が有意に減少していることを明らかにした。USC薬剤耐性獲得にはHMGA2とABCC1を介してlet7cが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanisms of chemo-resistance for platinum and taxane from the aspect of microRNA (miRNA), we used USPC-1 and constructed its chemo-resistant variant PTX-R and CDDP-R. By microRNA microarray analysis, we focused on let-7c. We confirmed that the expression of let-7c was decreased significantly in both drug-resistant cells ($P < 0.05$). Cell viability was decreased after let-7c mimic transfection to PTX-R followed by PTX treatment and similar transfection to CDDP-R followed by CDDP treatment. HMGA2 is known as the most famous target of let-7c and let-7c mimic transfection revealed decreased expression of HMGA2 ($p < 0.05$). ABC transporters such as ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, are the important molecules in the drug resistance, and the expression of ABCC1 was decreased significantly by let-7c inhibitor transfection to parental cells ($p < 0.05$). These data shows that let-7c may involve in drug resistance of PTX and CDDP via HMGA2 or ABCC1 in USC.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：子宮体癌 漿液性腺癌 マイクロRNA マイクロアレイ 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

USC は、頻度としては全子宮体癌の約 10% であるが、組織型別癌死をみると USC の癌死が子宮体癌全体の約半数を占めている。予後不良の組織型として知られている USC であるが、その発生・進展に関する遺伝子異常には不明な点が多い。臨床的には、化学療法の有効性や薬剤耐性に関する基礎的データが少なく新規治療薬の適応が限られるのが現状である。

USC の遺伝子異常の解明に向けて、microRNA(miRNA)に着目し研究を行ってきた。マイクロアレイ解析の結果をもとに Real-time 定量 RT-PCR により発現量を確認したところ、miR-101、miR-10b、miR-139-5p、miR-152、miR-29b、miR-455-5p の発現量が USC 患者の全生存率と相関し、また、miR-152、miR-29b、miR-455-5p の発現量が無増悪生存率と相関することを報告した。さらに、miR-34b の機能解析では、それを導入した細胞株では、細胞の遊走能・増殖能が抑制され、特に浸潤能が顕著に抑制されることが明らかとなり、miR-34b が UPSC の進展において癌抑制的に働いている可能性を明らかにした。

miRNA 関連の研究は、それぞれの miRNA が制御する遺伝子の探索とその解析に加え、診断・治療への応用可能性が検討されている。miRNA を標的にした核酸医薬の開発は今後急速に進歩するものと推察され、基礎的データの蓄積が求められている。臨床応用を進めていくためには抗悪性腫瘍薬の感受性に関連する miRNA のプロファイルを明らかにし、特に関連が強い miRNA を抽出しその機序を解明することは必須であり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

MiRNA の解析データをもとに、子宮体癌のなかでも特に予後が悪い子宮体部漿液性腺癌に対する新規治療法を見出すことを最終目的とする。本研究では、第一に薬剤耐性 USC 株における miRNA の発現プロファイルを作製し、USC における薬剤感受性・耐性に関する miRNA を明らかにする。第二に、候補 miRNA が抗腫瘍薬に対する感受性に関するかを細胞株への導入実験や動物実験で確認し実用化に向け抗腫瘍効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性株の樹立

薬剤は、子宮体癌治療に使用されるパクリタキセル (PTX)、シスプラチン (CDDP)、アドリアマイシン (ADR) を用いた。2 週間ごとに薬剤濃度を上げていき、 IC_{50} を測定した。薬剤暴露 6 週間後、12 週間後の細胞を回収し研究に供した。

(2) 薬剤耐性株における miRNA プロファイ

ルの作製

樹立した薬剤耐性株から全 RNA を抽出し miRNA マイクロアレイ解析を行った。コントロールには薬剤耐性のない USPC-1 株 (親株) を用い、時間の経過による発現の変化を確認するため、耐性獲得後 6 週間目と 12 週間目の耐性株での発現も比較した。RNA 抽出は miRNA assay Mini Kit (Qiagen) を使用し、マイクロアレイ解析は Agilent 社の DNA マイクロアレイシステムで測定を行った。データ解析は解析ソフト「GeneSpring」を用いた。

(3) 薬剤耐性株への標的 miRNA の導入

親株と比較し、薬剤耐性獲得により発現の変化が大きい miRNA を抽出し、miRNA precursor あるいは、miRNA inhibitor を導入して薬剤耐性の変化を確認した。導入試薬は、Lipofectamin RNAimax を用い、導入 miRNA precursor として Mission human miRNA mimics (Ambion 社)、Inhibitor として Tough decoy miRNA inhibitors (Sigma 社) を用いた。トランスフェクションの 24 時間後に抗癌剤を添加し、48 時間暴露した後、WST counting kit を用いて測定した。

(4) 標的遺伝子の解析

ターゲット予測プログラム Target scan と PicTar を用いて標的遺伝子を予測した。miRNA の導入による標的遺伝子の発現の変化については、ウェスタンブロットや Realtime PCR 法で確認した。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性株の樹立

6 週間経過した時点で PTX、CDDP、ADM それぞれを添加した細胞株で薬剤耐性を獲得した。12 週間まで薬剤添加を継続した細胞株で薬剤耐性が最も強くなり、その後は薬剤添加を継続しても耐性は変化しなかった。(図 1)

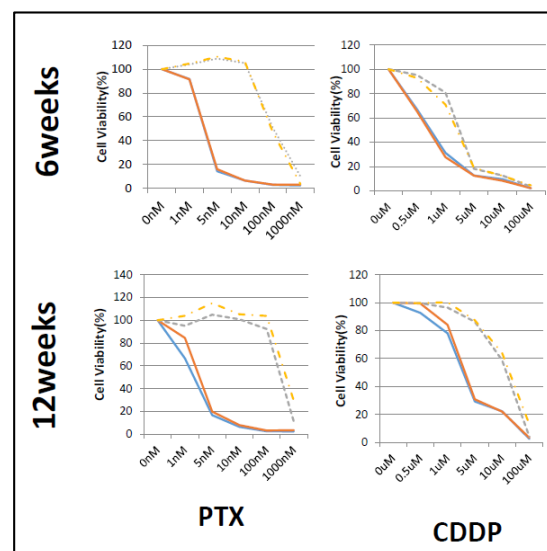


図 1 PTX と CDDP に対する耐性
実線が親株、点線が耐性株を示す。

(2) 薬剤耐性株における miRNA プロファイル

薬剤暴露 12 週目において、PTX、CDDP、ADR の 3 剤の耐性株で共通して発現が上昇している miRNA は miR-200a, miR-200b, miR-429 などを含む 10 個、発現が低下しているものが let-7c, miR-125a, miR-126 を含む 31 個あった (図 2)。

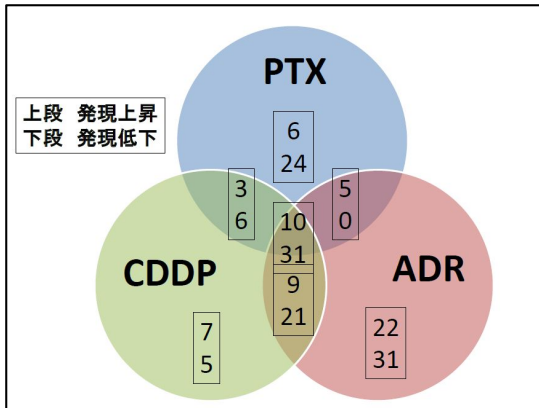


図 2 耐性株における miRNA プロファイル

MiR-574, miR-4730 などは、6 週の時点では発現に大きな変化がみられたが 12 週の時点では変動を認めなかった。6 週、12 週により発現パターンが異なっており、薬剤耐性獲得の早期に関与する miRNA、あるいは、耐性獲得晩期に関与する miRNA があることが示唆された。

3 種類の抗癌剤の耐性株における miRNA プロファイルを作製したが、PTX は子宮漿液性腺癌に対する化学療法の鍵となる薬剤であり、PTX 耐性獲得に着目した。PTX 耐性株において親株と比較して 1.5 倍以上の発現増加を認めた miRNA の上位 5 つは、miR-146a, miR-429, miR155, miR-200a, miR-1290 であった。発現の低下が認められた上位 5 つは、miR-125b, miR-99a, let-7c, let-7b, miR-374a であった。

(3) 薬剤耐性株における導入実験

親株と比較して発現が上昇していた上位 5 つの miRNA を PTX 耐性株に導入し体制の変化をみたところ、有意な変化は認めなかった。一方、発現が減弱している miRNA の precursor を導入したところ、miR-5581, let-7a, let-7b, let-7c では PTX 耐性を減弱させることが明らかになった。さらに、let-7c に絞って解析を行ったが、CDDP 耐性株、ADR 耐性株に let-7c の precursor を導入し耐性株における発現を確認したところ、CDDP 耐性株において薬剤耐性の変化が認められた (図 3)。また、real time PCR 法で耐性株における発現を検討したが、親株での発現と比較し、PTX 耐性株では 80%、CDDP 耐性株では 50%、ADM 耐性株では 90% 発現が低下しており、有意な発現低下が認められた。さらに、親株に let-7c inhibitor を導入したところ、PTX、CDDP に対する感受性が低下することも確認した。

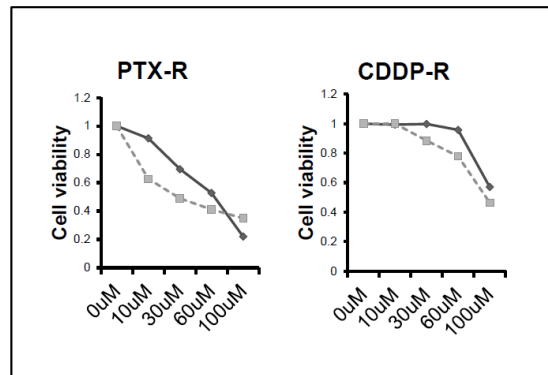


図 3 let-7c の PTX、CDDP 耐性株への導入
実線が Negative Control の導入、点線が let-7c precursor の導入を示す。

(4) Let-7c の標的遺伝子の解析

ターゲット予測プログラム Target scan と PicTar を用いて標的遺伝子を予測したところ、let-7c の標的遺伝子の一つとして HMGA2 を同定した。let-7c inhibitor を親株に導入したところ、コントロールと比較して有意に HMGA2 の発現が上昇した ($p < 0.00001$)。さらに、let-7c precursor を PTX、CDDP、ADR それぞれの耐性株に導入したところ、HMGA2 の発現が有意に低下した (図 4)。これより、let-7c は HMGA2 を介して薬剤耐性獲得に関与していることが示唆された。

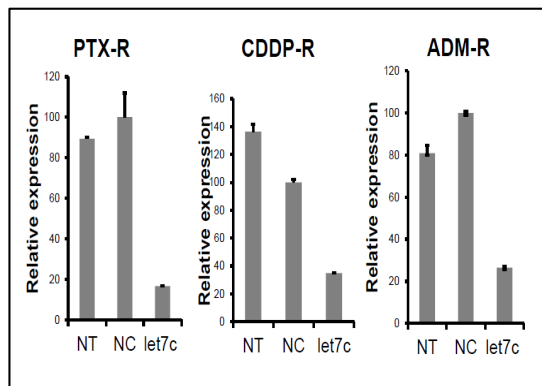


図 4 耐性株に対する let-7c 導入と HMGA2 の発現

さらに、薬剤耐性獲得には薬剤トランスポーターが関与していることが知られているが、let-7c と薬剤トランスポーター (ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2) との関連について解析を行った。各耐性株におけるトランスポーターの発現を見たところ、ABCB1 の発現は ADR 耐性株でのみ有意に高かった。ABCC1 は PTX と ADR の耐性株において、親株より発現が有意に低かった。ABCC2 は、CDDP と ADM の耐性株で、また、ABCG2 は CDDP のみで発現が高く、耐性株により関与するトランスポーターが異なっていることが示唆された。PTX 耐性株に let-7c precursor を導入したところ、ABCC1 の発現がコントロールに比べ有意に低

下しており(図5)他のトランスポーターの発現には有意な変化は見られなかった。Let-7c は薬剤トランスポーターのうち、ABCC1 を介して耐性獲得に関与することが示唆された。

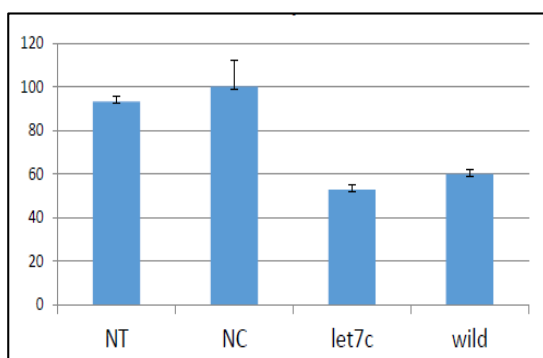


図5 PTX 耐性株における ABCC1 発現
NT: untransfected、NC: negative control、Wild: 親株

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 5 件)

Mashiko S, Kitatani K, Toyoshima M, Ichimura A, Dan T, Usui T, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase S, Miyata T, Yaegashi N.
Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer.
Cancer Biol Ther. (査読有)
2015;16(2):253-260
DOI: 10.1080/15384047.2014.1001271.

Konno Y, Dong P, Xiong Y, Suzuki F, Lu J, Cai M, Watari H, Mitamura T, Hosaka M, Hanley SJ, Kudo M, Sakuragi N.
MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells.
Oncotarget. (査読無)
2014;5(5):6049-6062
DOI: 無
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4171612/>

Nagase S, Suzuki F, Tokunaga H, Toyoshima M, Utsunomiya H, Niikura H, Yaegashi N.
Molecular Pathogenesis of Uterine Serous Carcinoma.
Curr Obstet Gynecol Rep. (査読有)
2014; 3: 33-39
DOI:10.1007/s13669-013-0069-0

Suzuki F, Nagase S, Suzuki K, Oba E, Hiroki E, Matsuda Y, Akahira J, Nishigori H, Sugiyama T, Otsuki T, Yoshinaga K, Takano T, Niikura H, Ito K, Sasano H, Yaegashi N.

Decreased expression of 14-3-3σ is predictive of poor prognosis for patients with human uterine papillary serous carcinoma.

Tohoku J Exp Med. (査読有)
2013;231(3):193-199
DOI:10.1620/tjem.231.193

Hiroki E, Suzuki F, Akahira J, Nagase S, Ito K, Sugawara J, Miki Y, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N.
MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma.

International Journal of Cancer. (査読有)
2012; 131: 395-404
DOI:10.1002/ijc.27345

〔学会発表〕(計 7 件)

Suzuki F, Nagase S, Watanabe Y, Sato I, Utsunomiya H, Kaiho M, Tokunaga H, Niikura H, Takano T, Sasano H, Yaegashi N.
MiR-34b correlates tumor growth and invasion in uterine serous carcinoma.
62nd Annual Meeting of the society for Reproductive Investigation.
2015年3月25日~2015年3月28日
Hilton San Francisco (San Francisco, USA)

佐藤いずみ, 鈴木史彦, 永瀬智, 高野忠夫, 新倉仁, 伊藤潔, 渡部洋, 八重樫伸生.
子宮体部漿液性腺癌細胞株において let-7c は多剤耐性取得機序に関与している
第73回日本癌学会学術総会
2014年9月25日~2014年9月27日
パシフィコ横浜(横浜)

鈴木史彦, 永瀬智, 渡部洋, 佐藤いずみ, 宇都宮裕貴, 新倉仁, 笹野公伸, 八重樫伸生.
子宮体部漿液性腺癌における miR-101 の機能解析
第73回日本癌学会学術総会
2014年9月25日~2014年9月27日
パシフィコ横浜(横浜)

鈴木史彦, 永瀬智, 佐藤いずみ, 宇都宮裕貴, 海法道子, 徳永英樹, 伊藤潔, 新倉仁, 高野忠夫, 渡部洋, 笹野公伸, 八重樫伸生.
ABC トランスポーターからみた子宮体部漿液性腺癌の薬剤獲得耐性メカニズム
第66回日本産科婦人科学会学術講演会

2014年4月18日～2014年4月20日
東京国際フォーラム（東京）

佐藤いずみ, 永瀬智, 鈴木史彦, 永井智之,
田中創大, 海法道子, 徳永英樹, 高野忠夫,
新倉仁, 伊藤潔, 渡部洋, 八重樫伸生.
子宮体部漿液性腺癌薬剤耐性株におけ
るマイクロRNAの網羅的発現解析および
miR-200 family の発現解析
第66回日本産科婦人科学会学術講演会
2014年4月18日～2014年4月20日
東京国際フォーラム（東京）

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.
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.
第13回日本婦人科がん分子標的研究会.
2014年3月15日
皆生グランドホテル天水（鳥取）

永瀬智.
子宮体部漿液性腺癌におけるマイクロ
RNAの発現異常.
熊本大学産婦人科セミナー（招待講演）.
2012年12月20日
熊本大学産科婦人科学教室カンファレ
ンスルーム（熊本）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 智（NAGASE, Satoru）
山形大学・医学部・教授
研究者番号：00292326

(2) 研究分担者

鈴木 史彦（SUSUKI, Fumihiko）
東北大学・医学（系）研究科（研究院）・
助教
研究者番号：20400343

吉永 浩介（YOSHINAGA, Kousuke）
東北大学・医学（系）研究科（研究院）・
非常勤講師
研究者番号：40343058

丹野 純香（TANNO, Sumika）
東北大学・医学（系）研究科（研究院）・
非常勤講師
研究者番号：60509595