

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592533

研究課題名(和文) 子宮頸がんにおける早期診断マーカーとしての血清中miRNAの探索と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of circulating miRNAs in cervical cancer

研究代表者

西 洋孝 (NISHI, HIROTAKA)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：60307345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌患者の血中miRNAを網羅的に調べ、腫瘍マーカー候補としての複数のmiRNAを同定した。realtime RT-PCR法にて健常者、子宮頸癌および子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)患者の血中のこれらmiRNAを定量解析し、進行期との相関性を認めたmiR-1290とmiR-100の腫瘍マーカーとしての臨床的意義が示唆された。miR-100の標的遺伝子としてパクリタキセル感受性遺伝子USP 15が同定された。低酸素暴露によりmiR-100の発現は亢進し、USP15のそれは減弱した。このmiR-100とUSP15の相関性が、低酸素による子宮頸癌に対する化学療法感受性低下の一因であろう。

研究成果の概要(英文)：We analyzed circulating serum miRNA in patients with cervical cancer using the microRNA array and found that the expression of miR-483-5p, miR-1246, miR-1275, miR-1290 and miR-100 was significantly different in cervical cancer samples compared with control samples. Using realtime RT-PCR, the expression level of miR-1290 and miR-100 was significantly different in the serum samples from cervical cancer patients, but not in those from CIN patients, compared with healthy controls. The expression level of serum miR-1290 increased and that of miR-100 decreased along with the stage of cervical cancer. Also, we found that miR-100 targeted USP 15 which is related to paclitaxel resistance. The expression of miR-100 was significantly increased under hypoxic condition and hypoxia reduced the endogenous USP15 expression in cervical cancer cell lines. Our results provide evidence that regulation of USP15 expression by miR-100 represents a mechanism for paclitaxel resistance in cervical cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：miRNA 子宮頸癌 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして SCC が知られているが、前癌病変である子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) や早期子宮頸癌ではその値が上昇しない。また、子宮頸部腺癌には特定の腫瘍マーカーが存在しない。子宮頸癌の腫瘍マーカーとなりうる microRNA (miRNA) を同定できれば、その早期発見に寄与できるのみならず、治療効果の判定や再発診断の重要なツールとなる。

2. 研究の目的

miRNA の発現が、がんを含む種々の疾患で変化することが報告されており、診断・治療に関するバイオマーカーとしても有望視されている。本研究では、子宮頸癌の早期診断を可能とするような血清中 miRNA の探索・同定を行う。すでに候補マーカーとして同定した miR-100、miR-483-5p、miR-1246、miR-1275、および miR-1290 の血中レベルと進行期・予後・治療に対する奏効性や組織型などの相関性を調べ、末梢循環 miRNA の臨床的意義を探る。そして、これら miRNA の候補標的遺伝子を *in silico* 解析により検索し、新規治療法を確立するための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 検体採取と血清中 miRNA 発現量の測定

インフォームドコンセントを得た後、子宮頸癌、CIN および健常者または子宮筋腫患者から 10ml の末梢血液検体を採取した。血清分離と total RNA の抽出精製を行い、解析まで -70 で保存した。この total RNA を用い、血清中 miR-483-5p、miR-1246、miR-1275、miR-1290 および miR-100 の発現量を realtime RT-PCR 法にて解析した。最終的な血清中各々の miRNA の発現量と臨床情報の相関性を統計学的に解析し、子宮頸癌の早期診断や治療効果判定の有用性を検証した。

(2) 腫瘍マーカー候補の miRNA の標的遺伝子の同定

血清中 miRNA のデータと臨床情報とをつきあわせ中間解析を行い、腫瘍マーカー候補 miRNA の絞り込みを行った。絞り込まれた miR-1290 と miR-100 に関し *in silico* 解析 (miRNA BLAST 解析) を行い、これら miRNA の候補標的遺伝子を探索した。がんの発生・進展に関わるとされる既知の遺伝子やメカニズムが判明しているなどを基準に、同定された候補標的遺伝子の絞り込みを行った。

(3) 腫瘍マーカー候補 miRNA の標的遺伝子の機能解析

miR-100 の標的遺伝子候補として、パクリタキセル感受性遺伝子 USP15 が見出された。miR-100 強制発現系の検討のために、miR-100 発現プラスミドを作製した。リポーターアッセイのために、USP15 の mRNA の 3' 非翻訳領域中の miR-100 結合領域である相補的配列を含む luciferase construct を作製した。子宮頸癌細胞株 CA、HeLa、CaSki にこれらを

co-transfection し、ルシフェラーゼによるリポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性の変化を測定し、miR-100 の USP15 に対する結合の有無と translation に対する影響を確認した。

子宮頸癌細胞株を通常酸素濃度と低酸素下 (1%O₂) に 24 時間培養し、miR-100 と USP15 の発現を realtime RT-PCR 法や western blot 法にて確認した。

miR-100 発現ウイルスベクターを作製し、子宮頸癌細胞株に感染させピューロマイシンによるセレクションを行った。セレクション後の miR-100 強発現子宮頸癌細胞に様々な濃度のパクリタキセルを添加し、生細胞数を計測した。このようにして得られた細胞増殖曲線を解析することにより、miR-100 の子宮頸癌細胞に対するパクリタキセルの感受性の変化を調べた。

4. 研究成果

子宮頸癌患者の血中 miRNA をマイクロアレイを用いて網羅的に調べ、腫瘍マーカー候補として miR-483-5p、miR-1246、miR-1275 および miR-1290 を同定した。子宮頸癌 47 例、CIN64 例、健常者 34 例から循環血液中の total RNA を抽出し、miR-483-5p、miR-1246、miR-1275、miR-1290 および子宮頸癌組織においてその発現が低下している miR-100 が、腫瘍マーカーとなり得るか realtime RT-PCR 法にて定量解析した。いずれの発現も、健常者と子宮頸癌との比較において差異が認められた。特に、末梢循環中の miR-1290 と miR-100 については、進行期との相関性も認められ、腫瘍マーカーとしての臨床的意義が強く示唆された (図 1, 2)。ただし、これら腫瘍マーカー候補 miRNA の発現は、扁平上皮癌または腺癌といった組織型による差異を認めなかった。

図 1

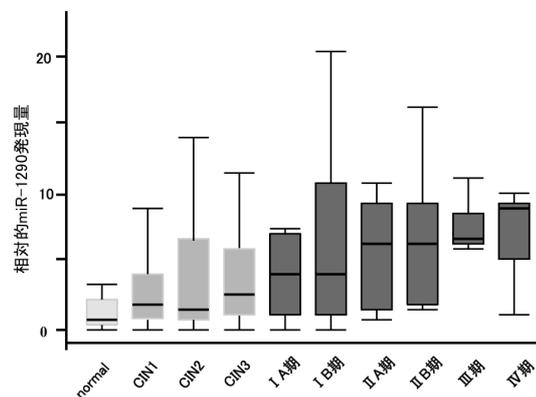
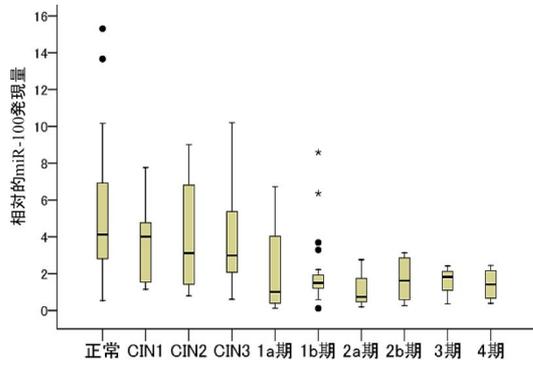
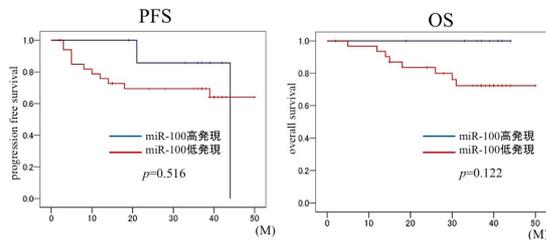


図 2



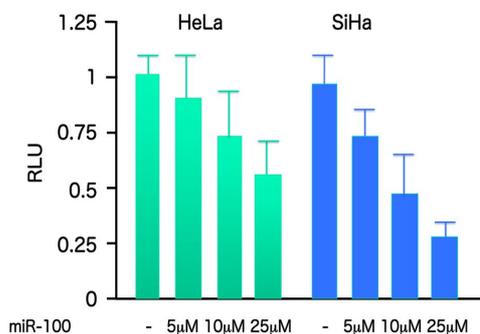
また、miR-100 については、予後との相関性も認められた。miR-100 高発現群では、miR-100 低発現群に比し PFS も OS も有意に優れていた (図 3)。

図 3



これら miRNA の候補標的遺伝子を in silico 解析により検索したが、miR-100 の候補標的遺伝子にパクリタキセル感受性遺伝子 USP15 を見出した。3' -UTR を含む USP15 遺伝子配列をルシフェラーゼコンストラクトに組み込み、子宮頸癌細胞株を用いて miR-100 強制発現系でルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ルシフェラーゼ活性が減弱した (図 4)。また、子宮頸癌細胞株を通常酸素濃度と低酸素下 (1%O₂) に培養し、ルシフェラーゼ活性を比較検討したところ、低酸素暴露によりルシフェラーゼ活性が減弱した。

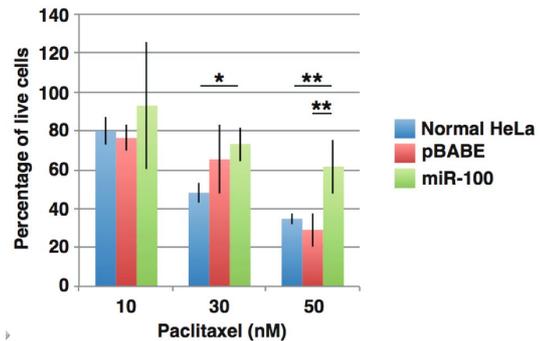
図 4



子宮頸癌細胞株を通常酸素濃度と低酸素下 (1%O₂) に 24 時間培養し、miR-100 と USP15 の発現を real time RT-PCR 法や western blot 法にて確認したところ、低酸素が miR-100 の発現を亢進し USP15 の発現を抑制することを見出した。

次に、miR-100 強制発現系を用いて子宮頸癌細胞株に対するパクリタキセルの感受性の変化を増殖能をもって検討したが、miR-100 強制発現系ではパクリタキセルに耐性を示した (図 5)。USP15 はパクリタキセルの感受性に寄与していると考えられている。miR-100 の強制発現により miR-100 の USP15 の 3' -UTR への結合が惹起され、USP15 のタンパクレベルでの発現が抑制される。その結果、子宮頸癌に対するパクリタキセルの感受性が低下し、パクリタキセルへの耐性を示したものと考えられる。

図 5



低酸素により、癌の抗がん剤耐性の獲得など悪性度が増強されることが知られているが、子宮頸癌細胞では低酸素による miR-100 の発現亢進がパクリタキセル耐性に寄与することが示された。

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 1 件)

Nagamitsu Y, Nishi H, Sasak T, Takaesu Y, Terauchi F, Isaka K. Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer. Mol Clin Oncol. 2016, 5: 189-194 DOI: 10.3892/mco.2016.875 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

加藤利奈、西 洋孝、永光雄造、佐々木 徹、井坂恵一、子宮頸癌の血清 miR-100 は早期発見のマーカーとなりうる、第 53 回癌治療学会学術集会、2015 年 10 月 30 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)
Rina Kato, Hiroataka Nishi, Yuzo Nagamitsu, Toru Sasaki, Keiichi Isaka, miR-100 mediates resistance to

paclitaxel in cervical cancer cells,
AACR Annual Meeting 2014(米国癌学会),
April 8, 2014, San Diego (USA)

西 洋孝、井坂恵一、子宮頸がんにおいて低酸素が miR-100 を亢進し、USP15 を抑制することによりパクリタキセル耐性を示す、第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013 年 5 月 11 日、ロイトン札幌(北海道札幌市)

〔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

西 洋孝 (NISHI HIROTAKA)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 60307345

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者