

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462608

研究課題名(和文) 癌抑制型microRNAを用いた子宮体癌治療～抗癌剤感受性増強とExocure～

研究課題名(英文) Endometrial cancer treatment by tumor suppressor microRNA

研究代表者

阪埜 浩司 (BANNO, KOUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】子宮体癌においてエピジェネティックに発現抑制される癌抑制型microRNAを同定し、microRNAの効果および抗癌剤との併用による抗腫瘍効果を検討する。

【結果】4種の子宮体癌細胞株に対し脱メチル化処理を行った結果、全ての細胞株に共通して発現上昇するmicroRNAとしてmiR-34bを同定した。また、子宮体癌細胞株にmiR-34bを導入することにより、コロニー形成能や細胞遊走能の低下が認められた($p<0.05$)。さらに、HEC-1Bをヌードマウスの皮下に移植し各薬剤を投与した。その結果、パクリタキセル+miR-34b群は他の群に比し有意に腫瘍径の縮小が認められた($p<0.05$)。

研究成果の概要(英文)：[Objective] microRNAs have key roles in the onset, development and drug resistance of cancer. We identified miR-34b as a tumor suppressor-type microRNA with expression that is epigenetically suppressed in endometrial cancer. In this study, the antitumor effect of combined miR-34b and antitumor drugs on endometrial cancer was examined.

[Results] There was no change in cell viability after administration of miR-34b following application of cisplatin or adriamycin to HEC-108, HEC-1B and KLE cells. However, after treatment with paclitaxel, cell viability after administration of miR-34b decreased in all three cell lines. Tumor development occurred 14 days after transplantation of HEC-1B cells in nude mice. Drugs were administered on that day and thereafter. The tumor diameter significantly decreased in mice treated with paclitaxel + miR-34b compared with the results for other treatments ($p<0.05$).

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 エピジェネティクス miR-34b メチル化

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の中で、子宮体癌は生活様式の欧米化と環境変遷に伴い、我が国では罹患実数および罹患率ばかりでなく、本疾患による死亡率も増加している。現在では子宮癌全体の約40%に達しており、今後も若年症例を含め、患者数は増加すると予測されている。子宮体癌の病態解明と制圧は、婦人科腫瘍学における重要課題といえるが、その発癌機構は今なお不明な点が多く、従来まで考えられてきた発癌のプロセスである種々の癌関連遺伝子の遺伝子変異、いわゆるゲネティックな変化のみではその発癌機構を十分説明できていない。子宮体癌治療戦略として、抗癌剤である白金製剤(シスプラチン)やタキサン製剤の有効性がある程度認められているものの、進行・再発子宮体癌や低分化型腺癌、また特殊型と呼ばれる漿液性腺癌や明細胞腺癌においては既存の抗癌剤レジメンによる成績は不良であり、患者の予後改善に結びつく新たな治療法の構築が切望されている。

近年、様々な臓器の発癌機構にDNA塩基配列異常によらない選択的な遺伝子機能異常、いわゆるエピジェネティックな変化が深く関与していることが明らかとなってきた。特にがんと特定ゲノム領域の異常高メチル化との関連が注目されている。正常細胞ではメチル化されていない癌関連遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドが癌細胞で異常メチル化され、不活化される。この変化はDNAレベルにとどまらず、RNA、特にmicroRNA(miRNA)もエピジェネティックな制御を受けていると推測されている。

miRNAは21~25塩基のnon-coding RNAであり、現在ヒトでも800以上のmiRNAが報告され、1つのmiRNAが数百の標的遺伝子の発現を制御していると推測されている(Banno K, et al. Epigenomics. 2012 Banno K, et al. Biochem Res Int. 2012)。最近ではmiRNAを標的とした癌治療薬の開発も始まっている。癌において発現が低下している癌抑制型miRNAは、それを体内に戻すことで一定の抗腫瘍効果が得られると考えられている。最近、乳癌や肺癌などでlet-7の発現低下が報告され(Yu F, et al. Cell. 2007)、let-7の補充による肺癌治療薬(Mirna社)の開発が進んでいる。本研究により子宮体癌の発癌に重要な癌抑制型miRNAが同定されれば、1分子のみを制御する他の分子標的薬とは異なり、癌における数百の遺伝子変化を網羅的に制御することで、癌のシグナルネットワークを標的とする子宮体癌の新たな治療戦略として応用が期待される。

2. 研究の目的

(1) 子宮体癌細胞でエピジェネティックな制御を受けている癌抑制型miRNAの同定

4種のヒト子宮体癌由来細胞株を用いて脱メチル化剤である5-aza処理前後のmiRNA

発現変化を、miRNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。5-azaの添加により発現が2倍以上に増加したmiRNAは、エピジェネティックな制御により発現が抑制されている可能性が推測される。その中から子宮体癌の発癌に重要な癌抑制機能を有するmiRNAを選別する。さらに、in silico解析により候補となる癌抑制型miRNAのターゲット遺伝子を解析し、癌抑制機構を明らかとする。

(2) 子宮体癌細胞に対する癌抑制型miRNAの抗腫瘍効果

子宮体癌由来細胞株に対して候補となる癌抑制型miRNAを導入し、癌細胞に対する効果を検討する。さらに、in vivoにおける抗腫瘍効果をヌードマウスに作成した腫瘍で検討する。miRNAの生体投与においては、患部にどのようにmiRNAを到達させるかが重要な鍵となる。今回我々は、人工臓器用を開発され、その安全性が米国FDAにおいて最高レベルの生体親和性物質であると保証されている生体高分子アテロコラーゲンをデリバリーツールとして使用する。

(3) 子宮体癌の抗癌剤感受性に寄与するmiRNAの同定と創薬への応用

我々のこれまでの研究により、多くの子宮体癌由来細胞株の抗癌剤感受性のデータが蓄積されている。そこに、本研究で得られる子宮体癌由来細胞株のmiRNA発現プロファイルデータを組み込み、子宮体癌治療のkey drugとされるタキサン製剤やドキシソルピシンの感受性と相関するmiRNAを抽出する。その際、特定のmiRNAが抗癌剤感受性のバイオマーカーとなり得るか、miRNA単独で抗腫瘍効果があるか、key drugとの併用により抗腫瘍効果の増強が認められるか、の3点に注目し研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 子宮体癌細胞でエピジェネティックな制御を受けている癌抑制型miRNAの同定

4種のヒト子宮体癌由来細胞株を用いて脱メチル化剤である5-aza処理前後のmiRNA発現変化を、miRNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。5-azaの添加により発現が2倍以上に増加したmiRNAは、エピジェネティックな制御により発現が抑制されている可能性が推測される。そこで、子宮体癌由来細胞株におけるmiRNAのアレイのプロファイリング(Applied Biosystems)を行い、子宮体癌の発癌に重要な癌抑制機能を有するmiRNAを選別する。候補となる癌抑制型miRNAの5-aza添加による発現回復をTaq-man PCR法で確認する。

さらに、in silico解析により候補となる癌抑制型miRNAのターゲット遺伝子を解析し、癌抑制機構を明らかとする。また、臨床検体を用いて子宮体癌において候補となる癌抑制型miRNAが正常子宮内膜に比して発現が抑制されていることを確認する。

(2) 子宮体癌細胞に対する癌抑制型miRNA

の抗腫瘍効果

子宮体癌由来細胞株に対して候補となる癌抑制型 miRNA を導入し、癌細胞に対する抗腫瘍効果をコロニー形成能、細胞周期変化、細胞遊走・浸潤能、アポトーシス誘導能を指標に検討する。候補となる癌抑制型 miRNA の細胞への導入は、in vivo 解析を考え、無毒化したレンチウイルスベクターによる恒常的な miRNA 発現細胞の作成を目指す。すでに前段階の研究として、invitro における子宮体癌細胞における一過性の miRNA 発現による抗腫瘍効果の検討を開始している。

さらに、in vivo における抗腫瘍効果についてヌードマウスを用いて検討する。miRNA の生体投与においては、患部にどのように miRNA を到達させるかが重要な鍵となる。今回我々は、人工臓器用に開発され、その安全性が米国 FDA において最高レベルの生体親和性物質であると保証されている生体高分子アテロコラーゲンをデリバリーツールとして使用する。

(3) 子宮体癌の抗癌剤感受性に寄与する miRNA の同定と創薬への応用

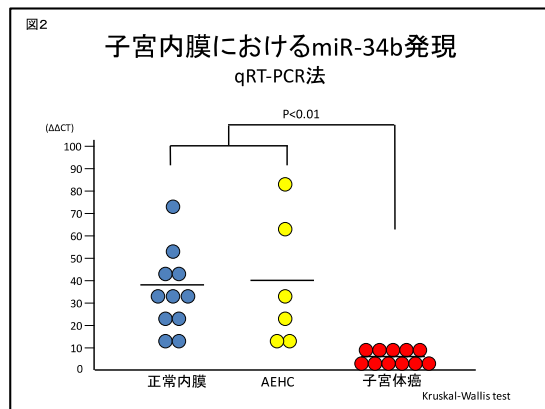
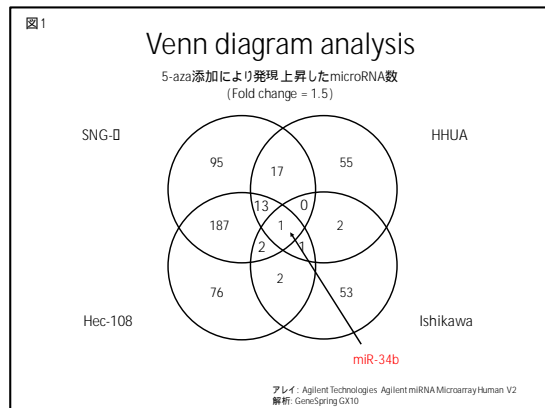
我々のこれまでの研究により、多くの子宮体癌由来細胞株の抗癌剤感受性のデータが蓄積されている。そこに、本研究で得られる子宮体癌由来細胞株の miRNA 発現プロファイルデータを組み込み、子宮体癌治療の key drug とされるタキサン製剤やドキシソルピシンの感受性と相関する miRNA を抽出する。その際、特定の miRNA 単独で抗腫瘍効果があるか、key drug との併用により抗腫瘍効果の増強が認められるか、の 3 点に注目し研究を行う。子宮体癌細胞株に候補 miRNA を導入し、その際の抗癌剤感受性の変化を IC50 値や CD-DST 法で解析する。さらに、ヌードマウスを用いて in vivo における miRNA の抗腫瘍効果、並びに抗癌剤との併用による抗腫瘍効果の増強について分子イメージング法を応用して確認する。

4. 研究成果

(1) 子宮体癌由来細胞株 4 種 (SNG-II, HEC-108, HHUA, Ishikawa) を用い、脱メチル化剤 (5-aza-dc, 100 μ M) を添加し、120 時間後に発現が 2 倍以上増加する miRNA をアジレント社のアレイにて解析した。その結果、821 種のヒト microRNA のうち、5-aza-dc 添加により 4 種すべての子宮体癌細胞株で発現が上昇したのは miR-34b のみであった。miR-34b は CpG アイランド内に位置し、p53 により発現が制御されている癌抑制型 miRNA であった (図 1)。

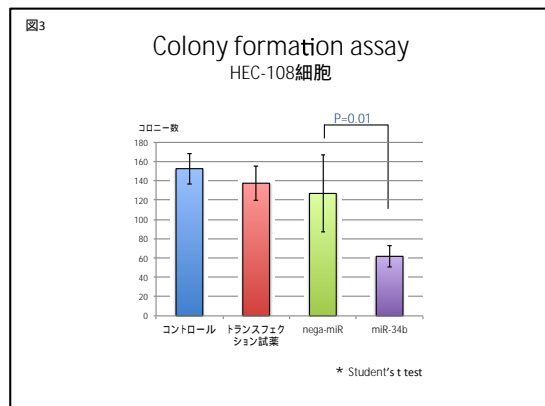
また、当院を受診された患者より同意を得た上で採取した正常子宮内膜、子宮内膜増殖症および子宮体癌組織を用いて、miR-34b の発現を qRT-PCR にて解析した。その結果、子宮体癌組織では、正常子宮内膜、子宮内膜増殖症組織に比べ有意に miR-34b の発現が低下

していることが明らかとなった ($p < 0.01$, 図 2)。



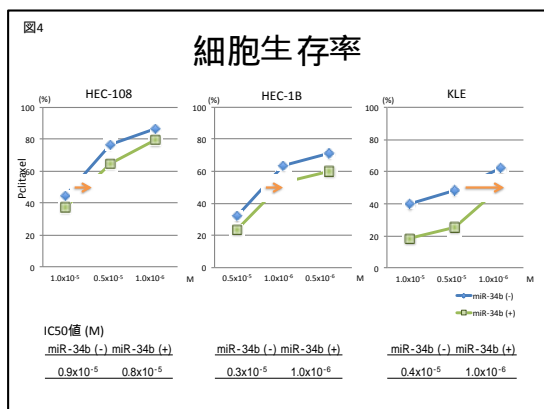
(2) HEC-108 に miR-34b を遺伝子導入し、colony formation assay, flow cytometry による細胞周期解析ならびにセルカルチャーインサートによる細胞遊走・浸潤能の変化を解析した。その結果、コロニー形成能および細胞遊走能が有意に低下した ($p < 0.01$, 図 3)。また、フローサイトメトリー解析により、G1 期の細胞集団が増加することが明らかとなった。

これらの変化は、miR-34b の標的遺伝子である Myc や c-MET の発現低下によるものと考えられた。miR-34b 導入後の Myc および c-MET の発現抑制は、qRT-PCR およびウェスタンブロットにより確認している。

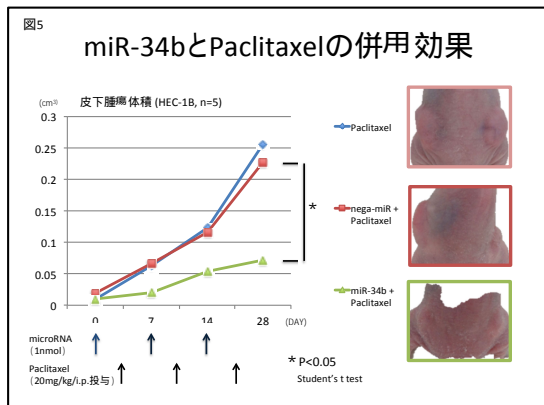


(3) 子宮体癌由来細胞株 (HEC-108, HEC-1B, KLE) に対し、段階的に希釈した

抗癌剤（シスプラチン、アドリアマイシン、パクリタキセル）を作用させた。miR-34b 添加時と非添加時で細胞生存率の変化を MTT 法にて解析した。また、薬剤感受性試験（CD-DST 法）にて 3 種の細胞株における miR-34b 添加時と非添加時の各種抗癌剤に対する感受性変化を測定した。その結果、3 種の子宮体癌細胞株に対し、シスプラチンおよびアドリアマイシンを作用させた時は、3 種とも miR-34b 添加による細胞生存率の変化は見られなかった。しかし、パクリタキセルを作用させた時は、全ての細胞株において miR-34b 添加時に細胞生存率の低下が認められた（図 4）。CD-DST 法による測定でも、miR-34b 添加によるシスプラチンおよびアドリアマイシンに対する感受性への影響は認められなかった。しかし、miR-34b 添加によりパクリタキセルに対する感受性は増強された。



さらに、パクリタキセルに対し抵抗性を示す HEC-1B をヌードマウスの皮下に移植し、移植の 2 週間後からパクリタキセル単独群、パクリタキセル + nega-miR 群、パクリタキセル + miR-34b 群の 3 群に分け各薬剤投与を行った。薬剤投与 28 日目にパクリタキセル + miR-34b 群は他の群に比し有意に腫瘍径の縮小が認められた ($P < 0.05$ 、図 5)。



本研究により、miR-34b は子宮体癌において異常メチル化により高頻度に発現が抑制されている癌抑制型 miRNA で、体癌細胞の増殖・遊走に重要な役割を果たしていると推測された。さらに、パクリタキセルとの併用により、抗癌剤の感受性を増強することが明らかとなり、今後の個別治療への応用が期待さ

れる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

(1) Yanokura M, Banno K, Iida M, Irie H, Umene K, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. MicroRNAs in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications EXCLI J. 2015; 14: 190-198. doi: 10.17179/excli2014-590

査読あり

(2) Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Nogami Y, Umene K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Aoki D.

Application of microRNA in diagnosis and treatment of ovarian cancer.

Biomed Res Int. 2014;2014:232817. doi: 10.1155/2014/232817.

査読あり

(3) Banno K, Iida M, Yanokura M, Kisu I, Iwata T, Tominaga E, Tanaka K, Aoki D.

MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment.

ScientificWorldJournal. 2014 Jan 2;2014:178075. doi: 10.1155/2014/178075.

査読あり

(4) Banno K, Yanokura M, Kisu I, Yamagami W, Susumu N, Aoki D.

MicroRNAs in endometrial cancer.

Int J Clin Oncol. 2013 Apr;18(2):186-92. doi: 10.1007/s10147-013-0526-9.

査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 阪埜 浩司

子宮体癌におけるジェネテックスとエピジェネテックス～子宮内膜の発癌と DNA ミスマッチ修復遺伝子異常の視点から～

第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会

2013 年 5 月 10 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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪埜 浩司 (Banno Kouji)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：70265875

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし