

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462619

研究課題名(和文) マイクロRNAを介した子宮頸癌の進展機構の解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Potential therapeutic target of microRNA in cervical cancer.

## 研究代表者

林 正美 (Masami, Hayashi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：00551748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：c-mycの機能調節に関するマイクロRNAに着目し検討を行った。c-mycはmyc-maxヘテロ複合体として標的遺伝子の転写活性化能を発揮するが、その際c-myc結合蛋白質(MYCBP)により調節を受ける。今回我々は、子宮頸癌細胞において、miR-22がMYCBPの発現を抑制することを見出した。さらにmiR-22導入により、c-mycの標的遺伝子hTERTの発現が低下した。また、miR-22導入により子宮頸癌細胞の放射線感受性が増強した。miR-22は子宮頸癌において、MYCBP発現を抑制し、c-myc下流遺伝子hTERTの発現低下をもたらし、放射線感受性を増強させることが分かった。

研究成果の概要(英文)：This study assessed the impact of microRNA which regulates function of c-myc. Oncogenic c-myc dimerizes with max to bind DNA and regulates gene expression, which relies on the regulatory network of the c-myc binding protein (MYCBP). We found that ectopically expressed miR-22 inhibited MYCBP expression, resulting repression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) production. Moreover, the introduction of miR-22 enhanced radiosensitivity in cervical cancer cells. Taken together, our data suggest that miR-22 inhibits MYCBP expression, leading to the decreased expression of hTERT which is one of the target genes of c-myc, resulting in increased radiosensitivity in cervical cancer.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮頸癌 マイクロRNA c-myc

### 1. 研究開始当初の背景

検診による早期発見によりこの 50 年間で子宮頸癌全体の死亡率は約 5 分の 1 に低下したが、進行子宮頸癌の治療は極めて難渋し生存率はほとんど改善していない。

残存または再発子宮頸癌に対して、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を標的とした分子標的治療薬 bevacizumab の、パクリタキセル + シスプラチンまたはトポテカン + シスプラチンとの併用効果に関する phase III 臨床研究が開始され、結果が待たれるが、近年 VEGF のプロモーター領域には、プロトオンコジーン c-myc の結合部位も存在し、PI3K を介した経路で VEGF の転写の活性化がおこることが報告され、c-myc の血管新生への関与も明らかとなっている(文献 1)。また、上皮 - 間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は癌が転移能を獲得する際の重要な現象であるが、c-myc も EMT の誘導因子であることが最近明らかとなり(文献 2)、c-myc は、血管新生、細胞の浸潤および転移能の獲得、と様々な過程で癌の悪性化に重要な役割を果たしている。

c-myc は、max とヘテロ 2 量体を形成し、c-myc の標的遺伝子のプロモーター領域の特定の配列(E-box)に結合し、転写を活性化させる。その際、MYCBP は c-myc の N 末端に結合し、c-myc が標的遺伝子の E-box に結合し転写を活性化させるのを調節する。

マイクロ RNA は長さ約 22 塩基の 1 本鎖 RNA で、様々な遺伝子の転写発現調節に関与することが知られているが、癌遺伝子 c-myc の発現調節に関するマイクロ RNA とその制御機構についてはほとんど解明されていなかった。最近になり、miR-22 が、MYCBP mRNA の翻訳を抑制すること、その結果として c-myc の作用が抑制されることが乳癌で報告された。

### 2. 研究の目的

c-myc は様々な癌で過剰発現、増幅がみられ、子宮頸癌においても 30-50% に過剰発現が認められる。また、I-II 期に比べ、III-IV 期でその頻度が高いという報告もある(文献 3)。さらに、ハイリスク HPV(HPV-18)の癌蛋白 E7 領域に c-myc が結合すると、c-myc の転写活性が亢進し、HPV の高発癌性に寄与しているという報告もあり、HPV と c-myc 過剰発現の関連も示唆されている(文献 4)。これらの事実から、進行子宮頸癌の予後改善のため、いかにして c-myc の作用を抑制できるかを基盤においた研究が重要であると考えに至った。そこで子宮頸癌において miR-22 が c-myc の作用を抑制するか否か、腫瘍への影響について検証を行い、進行子宮頸癌の治療への応用の可能性についても検討したい。

### 3. 研究の方法

(1) これまで子宮頸癌において miR-22 に関する研究報告はない。そこでまず、子宮頸癌細胞株における miR-22 の発現の有無と細胞株による発現量の違いを解析する。そして、miR-22 の発現量と MYCBP の発現量の相関関係を解析する。加えて、miR-22 低発現細胞株には miR-22 を強制発現させ、miR-22 高発現細胞株では miR-22 のノックダウンをおこない、MYCBP の発現量の変動について検討する。

(2) miR-22 により MYCBP が抑制されるのであれば、MYCBP の調節を受けている、c-myc の E-box への結合に影響を及ぼし、c-myc 標的遺伝子の発現量が減少することが予測される。そこで、miR-22 の強制発現による c-myc 標的遺伝子の発現量の変動の有無を解析する。

(3) miR-22 により c-myc 標的遺伝子の発現が抑制されることが確認されれば、腫瘍の発育や治療効果への影響の有無についても検討する。

### 4. 研究成果

(1) 種々の子宮頸癌細胞株における miR-22 発現量を quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 法にて検討したところ、細胞株により発現量の違いを認めた(図 1)。

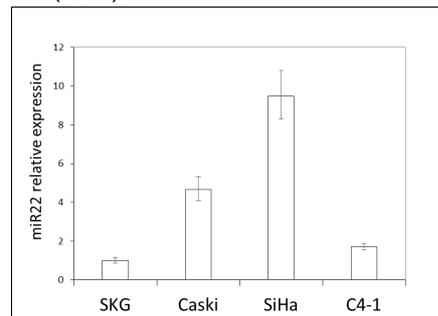


図1 miR22 expression in cervical cancer cell lines

miR-22 低発現細胞株 SKG に miR-22 を導入し(図 2 左)、MYCBP 発現量を検討したところ、miR-22 の強制導入により MYCBP mRNA 発現量が、コントロール(NC)と比較し低下した(図 2 右)。また逆に miR-22 高発現細胞株 SiHa に

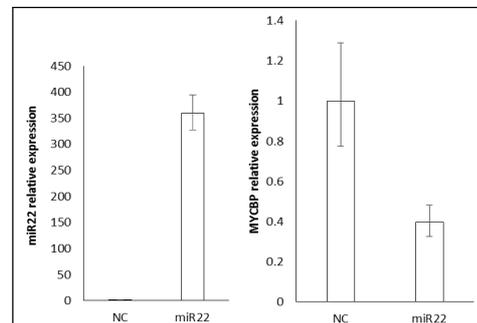


図2 overexpression of miR22 inhibits MYCBP

において miR-22 を抑制すると(図 3 左)、MYCBP mRNA 発現量は増加した(図 3 右)。

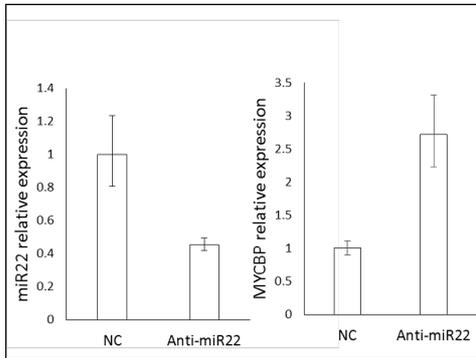


図3 inhibition of miR22 increases MYCBP

(2) テロメラーゼは多くの癌細胞で活性化しており、癌の進行度との相関も報告されているが、テロメラーゼ活性は、その構成成分である hTERT(human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子発現レベルと相関するとされる。hTERT は、プロモーター領域に E-box が存在する c-myc の標的遺伝子である。そこで、miR-22 の強制発現、および抑制による、c-myc の標的遺伝子 hTERT の発現量への影響を qRT-PCR にて検討した。miR-22 の強制

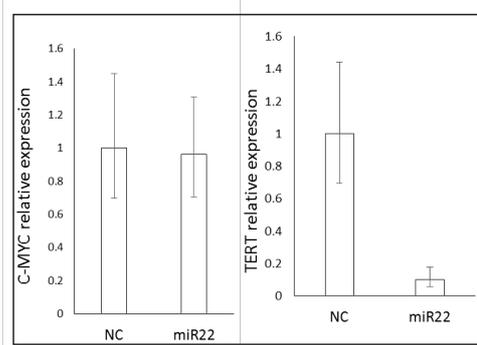


図4 overexpression of miR22 decreases hTERT

発現により hTERT mRNA は減少し(図 4 右)、逆に miR-22 を抑制すると hTERT mRNA は増加した(図 5 右)。miR-22 が直接 c-myc の発現量に影響を与えているか否か、qRT-PCR にて確認したところ、c-myc mRNA 発現量には影響しておらず(図 4 左、図 5 左)、miR-22 による

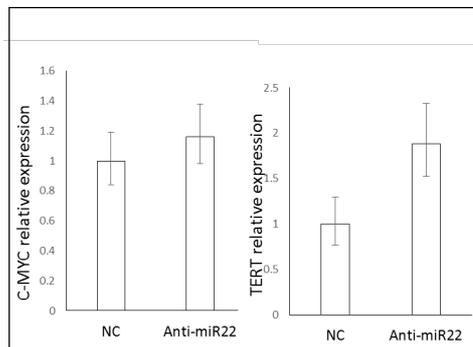


図5 inhibition of miR22 increases hTERT

hTERT の発現低下は、MYCBP の発現低下によるものと考えられた。

(3) TERT ノックアウトマウスではテロメアが短縮し放射線への感受性が増強することが

報告されている(文献5)。そこで、子宮頸癌における miR-22 による hTERT の発現低下が放射線感受性に影響するかどうか clonogenic assay にて検証した。miR-22 を強制発現させると、コントロール(NC)に比べ、放射線感受性が増強した(図 6 上)。一方、miR-22 を抑制すると、放射線感受性は低下した(図 6 下)。以上のことより、miR-22 の発現量が子宮頸癌

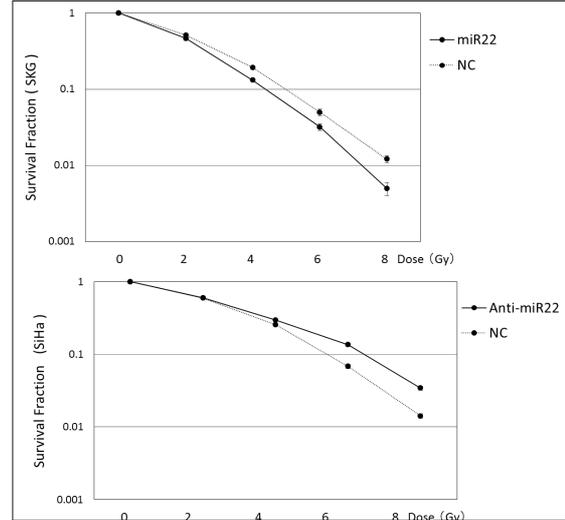


図6 miR22 enhances radiation sensitivity in cervical cancer cells

の放射線治療効果の予測因子となりうる可能性や治療へ応用されることが示唆された。

#### <引用文献>

Mizukami Y, Fujiki K, Duerr EM, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem.* 2006 281:13957-63.

Smith AP, Verrecchia A, Faga G, et al. A positive role for myc in TGFbeta-induced snail transcription and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 2009 28:422-30.

Pillai R. Oncogene expression and prognosis in cervical cancer. *Cancer Lett.* 1991 59:171-5.

Peter M, et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA and the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006 25:5985-93.

Goytisolo FA, et al. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med.* 2000 192:1625-36.

#### 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)

Ono YJ, Hayashi M, Tanabe A, Hayashi

A, Kanemura M, Terai Y, Ohmichi M, Am J  
Physiol Endocrinol Metab、査読有、308、  
2015、E950-959  
DOI:10.1152/ajpendo.00573.2014.  
〔学会発表〕(計0件)

〔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

林 正美 (HAYASHI, Masami)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00551748

### (2) 研究分担者

田中 良道 (TANAKA, Yoshimichi)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10625502

恒遠 啓示 (TSUNETOH, Satoshi)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70388255

金村 昌徳 (KANEMURA, Masanori)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：40298782

田辺 晃子 (TANABE, Akiko)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：70454543

寺井 義人 (TERAI, Yoshito)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90278531

大道 正英 (OHMACHI, Masahide)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10283764

(3) 連携研究者  
なし