

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861506

研究課題名(和文)子宮頸癌の悪性形質と関連するmicroRNAの同定と新規治療にむけた機能解析

研究課題名(英文)The roles and clinical significance of microRNAs in cervical cancer.

研究代表者

平尾 薫丸(Nobumaru, Hirao)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80327593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：担癌状態と治療後の時点の同一の子宮頸癌患者の血清を用いて、子宮頸癌で高発現するmicroRNAを同定した。担癌状態で4倍以上になっていたmicroRNAは12種であった。これらの中から、miR1246、miR4306およびmiR1290を同定した。これら3つのmicroRNAは、子宮頸癌での報告はない新規microRNAであった。これらの3種のmicroRNAについて細胞増殖に關与するか検討したところ、miR1290が細胞増殖に關与することが示された。miR1290は子宮頸癌の悪性形質に關与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using the same cervical cancer patient's serum obtained at 2 points before treatment and after treatment, we identified microRNAs to be highly expressed in cervical cancer. Micro RNAs that were equal to or greater than 4 times before treatment was 12. Out of these 12 micro RNAs, miR-1246, miR-4306 and miR-1290 were identified. These three micro RNA was novel micro RNAs, these has not been reported in cervical cancer. Proliferating assay revealed that miR-1290 was involved in cell proliferation. miR-1290 there is likely to be involved in the malignant transformation of cervical cancer.

研究分野：子宮頸癌

キーワード：子宮頸癌 micro RNA 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は約 22 塩基からなる RNA であり、タンパクをコードするのではなく、標的とする遺伝子に部分相補的に結合し、その翻訳を阻害、あるいは mRNA を分解することによりその発現を制御する RNA である。部分相補的に結合するという特徴から、一つの miRNA は複数の標的遺伝子を制御でき、逆に一つの遺伝子が複数の miRNA に制御されるため、miRNA と標的遺伝子により形成される分子ネットワークは非常に複雑で不明な点が多い。現在、ヒトにおける miRNA はおよそ 1,500 種類以上が同定されており、発現する遺伝子の約半数が miRNA により制御されているとされている。2005 年に miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1, miR-92-1 の 7 つの miRNA が同一の RNA 前駆体に含まれる miR-17-92 cluster が癌遺伝子として機能するものとして同定され、また、let-7 miRNA family が、癌遺伝子である RAS や HMGA2 を標的としている事が明らかになってきた。さらに、癌抑制遺伝子 p53 を標的にしている miR-34 family も同定された。これらに代表されるように、多くの癌において、癌特異的な発現を認める miRNA が報告されており、miRNA が癌遺伝子や癌抑制遺伝子を制御することで発癌促進あるいは癌抑制的に機能するという報告がなされ、miRNA と癌との関連が注目され始めている。

一方で、近年、がん細胞の増殖にはこれを取りまく微小環境が極めて重要であることが指摘されている。がんの間質には線維芽細胞をはじめ、免疫細胞、血管やリンパ管に加えて結合組織が存在して特徴的な微小環境を構築している。がんの増殖・浸潤・転移のしやすさは、がん細胞自体のもつ特性のみならず、がん細胞と微小環境との相互関係が深く関わっている。また、免疫抑制も、増殖・生存・浸潤などのがん悪性形質の一つとして重要であることが明らかになってきた (Hanahan D, Weinberg RA, Cell, 2011)。申請者の所属研究グループでは、がん治療効果の改善のためには、免疫抑制的あるいはがん細胞増殖浸潤促進的ながん微小環境の、分子・細胞レベルでの解明とその制御法の開発が重要である提唱してきた (Cancer Cell 2009 など)。

申請者は、これまでに主に婦人科癌を対象に腫瘍免疫の観点から癌関連遺伝子を同定し報告してきた。一つは、子宮体癌において浸潤・転移と関連する MYEOV であり、MYEOV の発現を抑制することにより子宮体癌細胞の浸潤・運動能が著明に低下すること、実際の臨床検体でも MYEOV の発現と再発予後が優位に相関することを報告した (第 63 回日本産科婦人科学会総会学術集会 2011 年 4 月)。さらに大腸癌では転写因子 KRT23 が同様に癌の増殖・浸潤・転移さらに予後に関連するとともに、免疫療法の標的

分子となる可能性を示した (第 65 回日本癌学会学術総会, 2006 年 横浜市)。また、申請者の所属研究グループにおいて、ヒト脳腫瘍細胞では、miR-222 が高発現して、T 細胞の癌細胞認識に重要な ICAM (intercellular adhesion molecule)-1 の低下を介し、CTL による細胞傷害の感受性を低下させること、すなわち、抗腫瘍免疫応答における免疫効果相で免疫抵抗性をもたらすことを報告した (Ueda et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009)。以上の実績を踏まえ、今回、子宮頸癌における miRNA の発現とその標的遺伝子のネットワークを解明し、増殖・浸潤・転移などの悪性形質に加えて、癌微小環境における抗腫瘍免疫への関与を検討する。子宮頸癌は、現在でも初期癌であれば比較的予後は良好である。しかし、進行癌や再発癌においては集学的治療に対しても抵抗性で予後不良であり、新たな治療戦略の開発が望まれる。子宮頸癌の miRNA を介した癌微小環境を解析することは子宮頸癌の新規治療開発に結びつくものと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮頸癌に特異的な microRNA (miRNA) の発現プロファイルを解析して癌抑制的または癌遺伝子の miRNA を同定し、(1) miRNA を介した子宮頸癌の細胞内分子ネットワークを解明すること、(2) miRNA の発現パターンによる治療法の個別化を検討すること、(3) 癌微小環境において腫瘍免疫を制御する miRNA の機構を解明すること、(4) miRNA を標的とした治療用核酸としての可能性を検討すること、である。

3. 研究の方法

(1) 5 年以上無病生存で完治したと考えられる 5 症例を対象として、浸潤子宮頸癌が存在していた治療前の血清と現在の血清 (非担癌) をそれぞれ混合し、3Dgene システム (東レ) で網羅的に miRNA のプロファイリングを行うことで、癌特異的 miRNA 候補を同定する。なお、5 症例はいずれも進行期が IB2 以上で、検出された HPV 型は 16 型であった症例を選択した。

(2) 同定した候補 miRNA について、5 症例の個別の発現を RT-PCR 法によって検討し、5 症例のうち 3 症例以上で担癌状態で上昇している miRNA を候補遺伝子として選択する。

(3) 増殖能に与える影響について

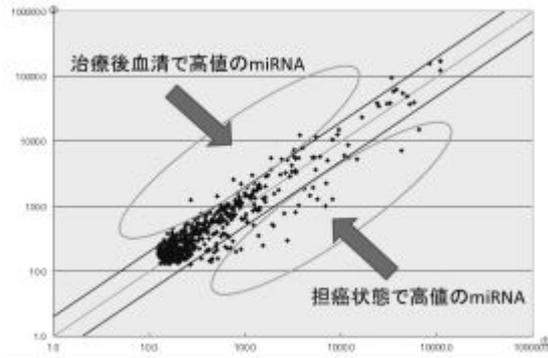
文献的考察から、これまでに子宮頸癌での発現の報告がなく、機能不明の miR-1246 および miR-4306 を選択した。子宮頸癌細胞株である SKG-3b, Siha, TC0-1 を用いて高発現 (mimic) および発現抑制 (inhibitor) を行い、増殖能に与える影響を xCelligence を用いて検討した。

(4) 上記のスクリーニングでは選択されなかった mi-R について、Pub-Med によって web 上で文献考察を行い、子宮頸癌での報告を認めなかった追加の候補遺伝子として miR-1290

を選択した。miR-1290 について、細胞増殖に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1)3Dgene での子宮頸癌特異的 miRNA の検出
3Dgene 解析によって、担癌状態で有意に高値であった miRNA および低値であった miRNA を同定した。



これらのうち、担癌状態で4倍以上の血清中濃度をしてした miRNA は miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-19b, miRNA-23b, miRNA-25, miRNA-103, miRNA-107, miRNA-185, miRNA-451, miRNA-1246, miRNA-1290, miRNA-4306, であった。

(2)mi-RNA 候補の選択

(1)で同定した12種のmi-RNAをRT-PCR法を用いて5症例で個別に発現を検討した。

Target	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5
miR-15a_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-15a_post	2.530	0.730	17.008	0.248	1.157
miR-16_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-16_post	0.953	1.026	2.536	0.233	0.863
miR-19b_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-19b_post	1.131	0.749	2.231	0.256	0.256
miR-23b_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-23b_post	8.795	0.154	3.247	1.354	0.849
miR-25_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-25_post	0.784	0.863	3.789	0.293	0.738
miR-103_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-103_post	3.595	0.696	5.843	0.387	0.580
miR-107_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-107_post	3.944	0.436	2.435	0.479	0.329
miR-185_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-185_post	0.738	0.221	1.962	0.485	0.708
miR-451_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-451_post	1.047	1.060	3.136	0.211	1.215
miR-1246_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-1246_pos	0.592	0.832	2.869	0.239	1.195
miR-1290_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-1290_pos	1.750	0.944	10.582	0.361	0.839
miR-4306_pre	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
miR-4306_pos	1.753	0.494	1.332	0.394	0.202

(注)治療前担癌状態でmiRの発現を1.0とした相対値

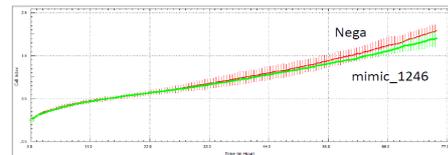
このうち、5症例中3症例以上で、完治後に発現が低下していたmiRNAはmiRNA-19b, miRNA-25, miRNA-103, miRNA-107, miRNA-185,

miRNA-1246, miRNA-4306であった。

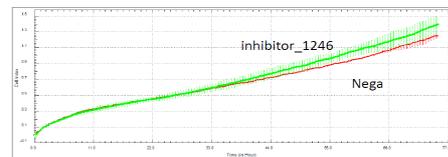
癌で高発現し、悪性所見と関与するmi-RNAを選択するには、mimicで細胞増殖が促進され、inhibitorで抑制されるmiRを選択する必要がある。これまでに子宮頸癌で報告がなかったmiR-1246およびmiR-4306について、子宮頸癌細胞株であるSKG3b、SiHa、TCO-1を用いて細胞増殖に与える影響を検討した。

miR1246

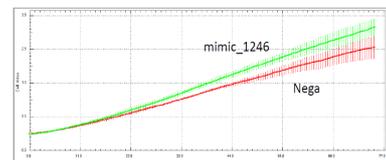
SKG3b_mimic_miR-1246



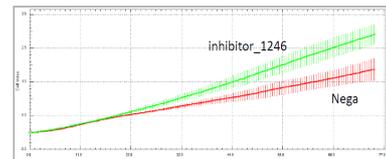
SKG3b_inhibitor_miR-1246



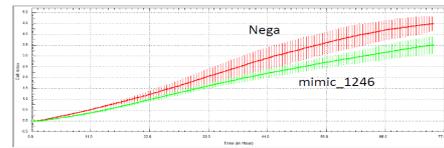
SiHa_mimic_miR-1246



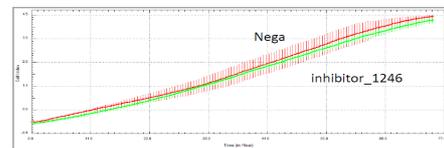
SiHa_inhibitor_miR-1246



TCO-1_mimic_miR-1246



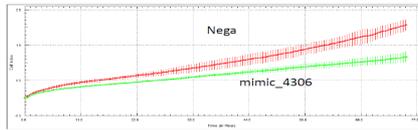
TCO-1_inhibitor_miR-1246



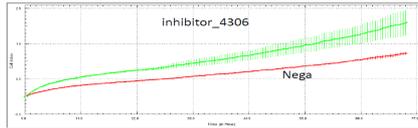
Mir1246は3種の細胞株の高発現株、および抑制株で、細胞株によって結果が異なり、またSiHaにおいては、inhibitorによって細胞増殖が促進されており、候補Mirには選択されなかった。

miR4306

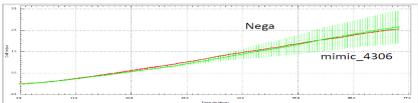
SKG3b_mimic_miR-4306



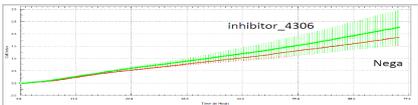
SKG3b_inhibitor_miR-4306



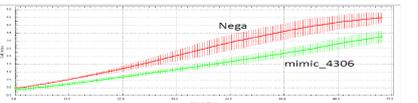
SiHa_mimic_miR-4306



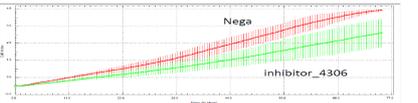
SiHa_inhibitor_miR-4306



TCO-1_mimic_miR-4306



TCO-1_inhibitor_miR-4306

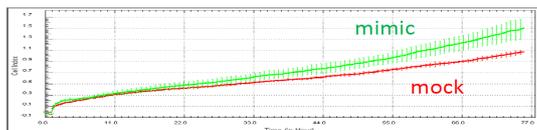


miR-1246 および miR-4306 は mimic で細胞増殖が促進され、inhibitor で抑制されるという条件を満たさなかった。

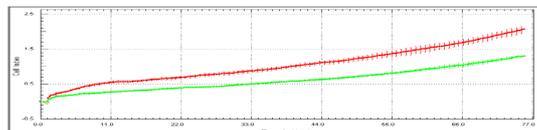
(4)miR-1290 の検討

miR-1290 は 5 症例中 2 症例で、治療後に低下した miRNA であるが、子宮頸癌での報告はないため、増殖への関与を検討した。

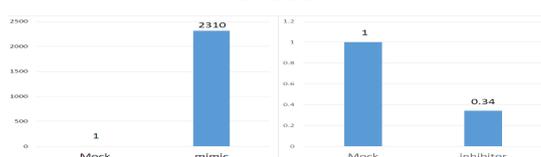
1290mimic



1290inhibitor



miR1290 expression assay SKG3b



miR-1290 は mimic で細胞増殖が促進され、inhibitor で抑制されるという条件を満たした。miR1290 は子宮頸癌の悪性形質に關与する可能性のある miR である可能性がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平尾 薫丸 (HIRAO, Nobumaru)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80327593

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし