

令和元年6月18日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06820

研究課題名(和文) 卵巣癌の増殖・浸潤を抑制するエクソソーム内在マイクロRNA探索と作用機序の解明

研究課題名(英文) Profiling of human ovarian cancer using comprehensive microRNA analysis and clarify of mechanism.

研究代表者

堀江 香代(Horie, Kayo)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：30626825

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)：エクソソームは細胞から放出される微小な小胞で、内在するmicroRNA(miRNA)は腫瘍増殖やアポトーシス、腫瘍増殖への関与が示唆されている。現在のところ卵巣癌エクソソーム内在miRNAについての詳細は明らかになっていない。本研究は卵巣癌細胞培養上清中エクソソーム内在miRNAのプロファイルを明らかにすることを目的としている。我々は卵巣癌培養細胞上清からのエクソソーム内在miRNA解析方法を確立し、正常卵巣上皮細胞と異なる組織型4種の卵巣癌細胞株におけるエクソソーム内在miRNAのプロファイルを明らかにした。最終的に卵巣癌細胞株で発現が特異的に増加した候補miRNAを3種に絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では卵巣癌細胞から放出されるエクソソーム内在miRNAをターゲットとしており、新規の卵巣癌の腫瘍増殖・増殖抑制、浸潤に関わる因子を検出できる可能性が高い。そこで、申請者は卵巣癌におけるエクソソーム内在miRNA発現プロファイルを検出することが必要と考え、培養細胞の培養上清から候補因子となるエクソソーム内在miRNAを検出した。その中からマイクロアレイ解析で再現性が認められる候補miRNAを3種に絞り込んだ。またデータベース(Target scan)を用い、候補miRNAのターゲットとなるmRNAの予測を行い総合的な解析を行うことで腹膜播種の作用機序解明に繋げていくことを考えている。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small vesicles secreted by most cells. Endogenous microRNAs (miRNAs) play critical roles in many biological processes, including tumor growth, apoptosis and tumor genesis. However, the function of endogenous miRNAs of ovarian cancer exosomes is not entirely clear. This study aimed to clarify the profile of exosomal endogenous miRNA in ovarian cancer cell lines. We established the analysis method of exosomal endogenous miRNA extracted from culture media of ovarian cancer cell lines and profiles were developed for the miRNAs of exosomes in ovarian cancer from the cell lines of various histological cell types. Finally, we narrowed down to three types of candidate miRNAs whose expression was specifically increased in ovarian cancer cell lines.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：卵巣癌 エクソソーム miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から放出される微小な小胞で、内在する microRNA(miRNA)は腫瘍増殖や浸潤への関与が示唆されている。しかしながら、これらを標的とした医薬品や治療法については未だ発展途上の段階である。また卵巣癌の腹膜播種の機序は未だ解明されていない。

近年、microRNA(miRNA)は細胞内のみでなくエクソソームに含まれ細胞外に分泌されることが明らかとなっている(Valadi H et al. Nat Cell Biol,2007)。卵巣癌エクソソームについては、患者血清中のエクソソーム量が癌の進行に伴い増大すること(Taylor DD et al. Gynecol Oncol, 2008)や、漿液性腺癌細胞株由来エクソソーム内在タンパク質の発現プロファイルの報告(Liang B et al. J Proteomics,2013)はあるが、卵巣癌エクソソーム内在 miRNA についての詳細は未だ不明である。加えて、培養細胞によるエクソソーム内在 miRNA の機能については乳癌(Yang M et al. Mol Cancer,2011)、前立腺癌(Kosaka N et al. J Biol Chem,2010)、肝癌(Kogura et al. Hepatology,2011)などの報告があるが、卵巣癌エクソソーム内在 miRNA について腫瘍増殖、増殖抑制、浸潤に関する機能は明らかになっていない。これらの背景からまず卵巣癌腫瘍増殖・抑制および浸潤に関わるエクソソーム内在 miRNA プロファイルを検出することが必要と考えた。次に生体内における候補 miRNA の作用や機能を検証するためには、動物モデルを用いた組織学的な検証が不可欠であると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、まず卵巣癌培養上清からエクソソームを回収しエクソソーム内在 miRNA を抽出する。抽出した miRNA はマイクロアレイを用いて網羅的な解析を行い腫瘍増殖・増殖抑制、浸潤に関わる候補 miRNA を検出し卵巣癌に特異的なプロファイルを明らかにする、加えてそれらを導入・抑制した腫瘍抑制型エクソソームの作成を行い、腫瘍細胞及び正常内膜細胞に作用させ腫瘍の浸潤や細胞増殖の作用機序の解明に繋げる。次いで癌性腹膜炎ラットモデルを用いて腹水中のエクソソーム解析を行い最終的には「腹水癌細胞の増殖・浸潤を抑え休眠状態で共存させる。」という新しい治療プロトコールの提案を目指す。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌培養上清エクソソームの回収

漿液性嚢胞腺癌(HRA)、類内膜腺癌(TOV112D)、粘液性嚢胞腺癌(MCAS)、明細胞腺癌(HAC-2)およびヒト卵巣表面上皮細胞(HOSE)を培養し培地に含まれる牛胎児血清の影響を除くため、無血清培地で2日間インキュベートを行った後培養上清を回収した。

ExoEasy Maxi kit(QIAGEN)によるエクソソームの回収を行った。その後、回収されたエクソソームについてエクソソームタンパク質マーカーCD63によるウエスタンブロットおよびナノサイトによる粒子径や濃度の測定による評価を行った。

(2) エクソソーム内在 miRNA の抽出およびマイクロアレイ解析

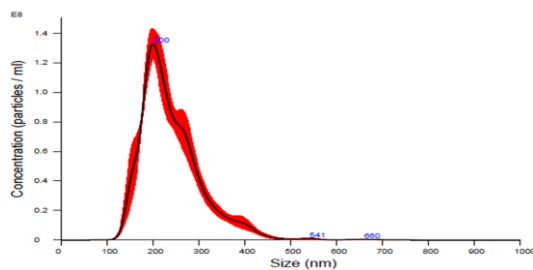
回収したエクソソームから RNeasy micro kit(QIAGEN) modified protocol を用いて micro RNA の抽出を行った。その後 Bioanalyzer 2100 (Agilent)による micro RNA の量・質のチェックを行い SurePrint G3 Human miRNA microarray (Agilent) および SureScan Microarray Scanner (Agilent)を用いたマイクロアレイ解析を行った。

(3) リアルタイム PCR ddPCR

Taqman small RNA assay kit (Termo Fisher scientific)、および (StepOnePlus Real Time PCR System) によるリアルタイム PCR 解析を行った。

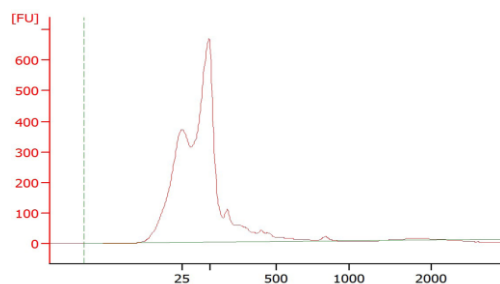
4. 研究成果

(1) 本研究は、卵巣癌細胞株の培養上清からエクソソームの抽出法を確立するところから開始した。漿液性嚢胞腺癌(HRA)、類内膜腺癌(TOV112D)、粘液性嚢胞腺癌(MCAS)、明細胞腺癌(HAC-2)およびヒト卵巣表面上皮細胞(HOSE)の培養上清からエクソソームを回収するにあたり、3種のキットを用いて回収率や操作の簡便性について検討を行った。回収したエクソソームはエクソソームタンパク質マーカーCD63によるウエスタンブロットおよびナノサイトによる粒子径や濃度の測定による評価を行いエクソソームが回収されていることを確認した。



MCAS 細胞培養上清中より直径 100~300nm 程度の小胞が回収された。

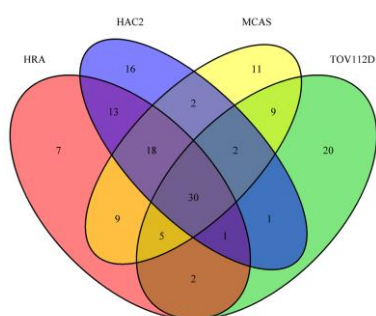
さらに回収したエクソソームから micro RNA 抽出法の検討を行い、既存のキット試薬を変更した方法を用いることで効率よく miRNA を抽出する方法を確立した。抽出した miRNA はバイオアナライザにより量・質のチェックを行った結果、small RNA 領域にピークを認めた。



miRNA 領域にピークが検出され、rRNA に見られる 18S 28S のピークは検出されなかった。

(2) 以上の方法を用いて回収された4種の卵巣癌細胞株エクソソーム由来 miRNA とコントロールとして卵巣表面上皮細胞エクソソーム由来 miRNA についてマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析を行った。加えて細胞抽出液についても同様に miRNA 解析を行った。その結果、正常卵巣上皮細胞に比べ4種の卵巣癌で共通して発現の増加が認められたエクソソーム内在 miRNA 1種、発現の低下が認められた miRNA 99種を検出した。また細胞内で発現が増加していた miRNA 22種 発現の低下が認められた miRNA 16種を検出した。そのうちエクソソームと細胞内で共通して発現の低下を認めた miRNA は 14種であった。

(3) マイクロアレイデータをもとに生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析が可能なソフトウェア Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いた詳細な解析を行った結果、異なる組織型の卵巣癌細胞で共通して特異的に発現が増加した miRNA30 個、発現が減少した miRNA68 個を抽出し、最終的に卵巣癌で発現が特異的に増加した miR574-3P、miR1260、miR24 を候補 miRNA として絞り込んだ。またデータベース(Target scan) を用い、miR574-3P のターゲット mRNA として GALNT6 や LAT が予測された。



Up regulate 30 miRNAs (FC >1.2)
miRNAs of Exosomes with Ovary Ca vs HOSE

systematic_name	Fold Change (HRA) vs (HOSE)	Fold Change (TOV112D) vs (HOSE)	Fold Change (MCAS) vs (HOSE)	Fold Change (OVAS) vs (HOSE)	Fold Change (HAC2) vs (HOSE)
hsa-miR-106b-5p	10.80010404	2.268457644	2.949069308	9.926817485	89.88663124
hsa-miR-1181	1.734364461	2.220071591	4.873386011	2.230862617	1.386419432
hsa-miR-1237-3p	13.12293759	12.48554194	4.12370463	2.93639708	12.30187533
hsa-miR-1281	1.228352032	1.606113625	1.398253217	1.531084779	2.290901354
hsa-miR-197-3p	2.22841197	1.458171157	1.289769529	1.231748795	6.517860963
hsa-miR-4213	111.1405645	24.8609799	3.781712544	76.8468526	493.283668
hsa-miR-320d	184.7494423	27.41626711	4.863550265	14.28307792	80.24355523
hsa-miR-371a-5p	5.5173955	2.094426273	4.306897532	1.497464737	1.467343662
hsa-miR-3781	35.84436427	21.47965029	4.404240037	25.55188819	115.6223308
hsa-miR-425-3p	21.2940476	11.31398141	10.56986174	7.428824788	81.19357705
hsa-miR-4284	19.24185523	16.44047754	14.15071259	57.8906693	275.9901561
hsa-miR-4291	8.933895627	5.700042594	4.975900886	4.297199331	35.76292773
hsa-miR-4299	65.89815358	18.85722439	17.8294127	24.7535751	172.1781826
hsa-miR-4313	23.11246535	24.83518786	16.09433543	14.68327147	37.08915358
hsa-miR-4853-3p	40.96754533	14.36688522	38.9346378	46.4832936	27.56109523
hsa-miR-4656	183.0578114	27.72241596	103.059558	50.66238183	40.14696436
hsa-miR-4672	16.49438406	1.967756902	10.17000159	53.09883252	48.55341951
hsa-miR-4713-3p	3.059533722	1.720325392	2.418083058	2.95632215	1.821262028
hsa-miR-4716-3p	2.644905542	1.430248419	1.768757052	2.210100232	2.076701555
hsa-miR-4725-5p	26.08101299	11.53060814	9.885305796	8.844779641	51.79371008
hsa-miR-4728-5p	1.845470147	2.1304093	4.935001412	5.215718838	1.448898599
hsa-miR-4749-3p	6.234579817	13.84173327	8.426908398	6.338809458	15.29584343
hsa-miR-494-3p	46.80883048	4.915567582	43.11807992	31.61935427	12.4379214
hsa-miR-5581-3p	46.12578631	27.12263533	32.91799134	40.29847949	31.40283109
hsa-miR-574-3p	159.3011568	6.340700793	12.12833666	15.10599176	206.9611535
hsa-miR-6767-5p	70.72967287	16.64788193	25.03954254	29.94783093	30.33372146
hsa-miR-6798-5p	85.41113735	8.075709417	11.9053184	10.52293378	36.18741126
hsa-miR-6880-3p	19.94805867	20.19004249	9.922739154	11.89569389	39.2652082
hsa-miR-766-3p	10.57651187	17.44449103	8.890041098	8.38430632	27.84949438
hsa-miR-93-5p	63.44941321	19.7954217	33.65475882	75.9609288	677.9499708

(4) 候補遺伝子として検出された miR-574-3P についてリアルタイム PCR による miRNA の定量を行うために高感度 Droplet Digital PCR (ddPCR) による解析を行った。まず mir574-3P および内因性コントロールである U6 を用いて ddPCR の反応条件、アニーリング温度の検討を行った。しかしながらいずれも発現量が微量なため十分に検出されず条件検討が行えなかった。また通常のリアルタイム PCR では十分な解析ができなかったためリアルタイム PCR サンプルを鋳型として再度リアルタイム PCR を行ったところ、以下の結果が得られた。コントロールであるヒト卵巣表面上皮細胞(HOSE)細胞との発現比は漿液性嚢胞腺癌(HRA) 1.6、類内膜腺癌(TOV112D) 1.6、粘液性嚢胞腺癌(MCAS) 6.3、明細胞腺癌(HAC-2) 1.2、明細胞腺癌(OVAS) 1.6 といずれも増加が認められマイクロアレイの結果が裏付けられた。しかしながら微量の遺伝子を無理に増幅させたためバラつきや再現性が乏しくデータとして信頼性に欠けることが危惧された。以上の結果からエクソソームの濃縮などサンプルの回収条件を見直す必要が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Cyclin A is a reliable proliferation marker in endometrial cancer cell lines., *Oncology letters*, 17(5), 4455 ~ 4462 , 2019, [Kayo Horie](#), Hayate Yamamoto, Kouhei Karube, Kai Takebayashi, Hironori Yoshino, Haruhiko Yoshioka, Jun Watanabe. (査読あり).
2. Blackcurrant Extract with Phytoestrogen Activity Alleviates Hair Loss in Ovariectomized Rats., *Molecules*, 24(7), 2019, Naoki Nanashima, [Kayo Horie](#). (査読あり).
3. Phytoestrogenic Effects of Blackcurrant Anthocyanins Increased Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Expression in Human Endothelial Cells and Ovariectomized Rats., *Molecules*, 24(7), 2019, [Kayo Horie](#), Naoki Nanashima, Hayato Maeda. (査読あり).

- 読あり).
4. 子宮内膜癌細胞株 (Ishikawa 細胞)における estrogen receptor(ER)遺伝子導入及びエストロゲン作用の検討, 青森県臨床細胞学会雑誌, 35, 35-41, 2018, 堀江 香代, 藤田大貴, 三浦文仁, 金丸紘弓, 吉岡 治彦, 渡邊 純 (査読あり).
 5. Blackcurrant Anthocyanins Increase the Levels of Collagen, Elastin, and Hyaluronic Acid in Human Skin Fibroblasts and Ovariectomized Rats., *Nutrients*, 10(4), 2018, Naoki Nanashima, Kayo Horie, Hayato Maeda, Toshiko Tomisawa, Maiko Kitajima, Toshiya Nakamura. (査読あり).
 6. 子宮内膜癌細胞株 (Ishikawa 細胞)における estrogen receptor(ER)遺伝子導入及びエストロゲン作用の検討, 青森県臨床細胞学会雑誌, 35, 35-41, 2018, 堀江 香代, 藤田大貴, 三浦文仁, 金丸紘弓, 吉岡 治彦, 渡邊 純 (査読あり).
 7. Peroxiredoxin 1 expression in active ulcerative colitis mucosa identified by proteome analysis and involvement of thioredoxin based on immunohistochemistry., *Oncology letters*, 15(2), 2364-2372, 2018, Kayo Horie, Tetuo Mikami, Tsutomu Yoshida, Yuichi Sato, Isao Okayasu. (査読あり).
 8. Phytoestrogenic Activity of Blackcurrant Anthocyanins Is Partially Mediated through Estrogen Receptor Beta., *Molecules*, 23(1), 2017, Naoki Nanashima, Kayo Horie, Hayato Maeda. (査読あり).
 9. Anthocyanin-rich blackcurrant extract inhibits proliferation of the MCF10A healthy human breast epithelial cell line through induction of G0/G1 arrest and apoptosis., *Molecular medicine reports*, 16(5), 6134-6141, 2017, Naoki Nanashima, Kayo Horie, Mitsuru Chiba, Manabu Nakano, Hayato Maeda, Toshiya Nakamura. (査読あり).
 10. Phytoestrogenic activity of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins is mediated through estrogen receptor alpha., *Molecular nutrition & food research*, 59(12), 2419-2431, 2015, Naoki Nanashima, Kayo Horie, Toshiko Tomisawa, Mitsuru Chiba, Manabu Nakano, Toshifumi Fujita, Hayato Maeda, Maiko Kitajima, Shizuka Takamagi, Daishi Uchiyama, Jun Watanabe, Toshiya Nakamura, Yoji Kato. (査読あり).

[学会発表] (計 5 件)

1. An Investigation of Exosomal Endogenous MicroRNA Profiles in Ovarian Cancer., Kayo Horie, Yoshihito Yokoyama, Haruhiko Yoshioka, Hidetoshi Maruyama, Jun Watanabe. The 25th Thai-Japanese Workshop in Diagnostic Cytopathology. (Thailand), 2018.
2. ヒト卵巣癌エクソソーム内在 miRNA 発現プロファイルの探索、堀江香代、七島直樹、渡邊純、横山良仁. 第75回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016.
3. Profiling of human ovarian cancer using comprehensive microRNA analysis. Kayo Horie, Yoshihito Yokoyama, Haruhiko Yoshioka, Jun Watanabe. The 19th International congress of Cytopathology. (Yokohama), 2016.
4. ヒト卵巣癌エクソソーム内在 miRNA と細胞内 miRNA 発現プロファイルの探索、堀江香代、横山良仁、吉岡治彦、渡邊純. 第57回日本臨床細胞学会総会(横浜), 2016.
5. 卵巣癌エクソソーム内在 microRNA の探索、堀江香代、横山良仁、吉岡治彦、渡邊純.平成27年度がん若手ワークショップ (蓼科), 2015.

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 純

ローマ字氏名：Jun Watanabe

所属研究機関名：弘前大学大学院

部局名：保健学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10201188

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横山良仁

ローマ字氏名：Yoshihito Yokoyama

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。