

令和元年5月28日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11159

研究課題名(和文) 卵巣癌の早期診断・予後予測・分子治療を目指した包括的癌関連microRNA解析

研究課題名(英文) MicroRNA Gene Expression Signature in Ovarian Cancer

研究代表者

矢内原 臨 (Yanaiharu, Nozomu)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20349624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、卵巣癌組織型型の生物学的特性に起因するmicroRNAを同定することを目的とした。卵巣癌患者27例を対象に癌関連microRNAの包括的発現特性を調べたところ、階層的クラスタリング分析により2つの異なるクラスターを同定した。各クラスターは組織型と強い相関があり、特に明細胞癌で過剰発現しているmiR-9を含む5つのmicroRNAを同定した。さらなる検討から、明細胞癌におけるmiR-9過剰発現は、E-cadherinを介した上皮間葉転換を誘導し、その生物学的特性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。以上より、miR-9は明細胞癌の新たな治療標的と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、エビジェネティックな発現調節因子として期待されているmicroRNAが、卵巣癌の組織型特異的な早期診断・予後予測のバイオマーカーとして臨床上有用であるかを検討するだけでなく、そのもの自体もしくはそのインヒビターが、治療薬として有用であるかを追求したものである。またこれまで異なる組織型を一様に治療してきた卵巣癌の治療指針に対して、個別的な戦略の下に検討していることも、本研究の特色であると思われる。国内におけるmicroRNAに関する検討、特に基礎研究はその特殊な実験系からいまだ数少なく、今後さらなる努力が必要な分野と考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate clinical and biological associations of cancer-related microRNA gene expression profile in ovarian cancer. We investigated 27 ovarian cancers to determine the cancer-related microRNA expressions. An unsupervised hierarchical clustering analysis identified two distinct microRNA expression clusters, with histotypes-related significant differences in the associations between clusters and clinicopathological features. A comparison of microRNA expression in different histotypes identified five microRNAs including miR-9, with ovarian clear cell carcinoma (OCCC) demonstrating a statistically higher expression. Further investigation of the biological significance of miR-9 overexpression in OCCC revealed that miR-9 overexpression may affect its pathogenesis by targeting E-cadherin, thereby inducing an epithelial-mesenchymal transition. Therefore, miR-9 may be a promising therapeutic target strategy for OCCC.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は約22塩基の1本鎖RNAで、標的遺伝子のタンパク質翻訳過程やmRNAの安定性を調節することにより、ヒトを含む多くの生物種において多彩な生態的役割を担っている。ヒトでは、これまでに2500以上のmiRNAが報告され、全遺伝子産物の60%以上が発現制御を受けていると推測される。近年、細胞の分化・増殖、細胞周期、アポトーシスなどの調節機能から、癌の発生や進展過程におけるmiRNAの機能的関与(治療標的の可能性)が注目されている。また様々な癌種において、特定のmiRNA発現変化が診断バイオマーカー及び予後予測因子として臨床上有用であることも報告されている (Yanaiharu Net al. *Cancer Cell*. 2006; Yanaiharu N and Harris CC. *Clin Chem*. 2013)。細胞から分泌されるエクソソームに内包されるmiRNAは、体液中で安定であることが知られている。このような血中miRNAを利用した、癌の早期診断のための大規模な研究計画が2015年に公表された。対象となる13の癌腫の中には胃癌、肺癌のほか、婦人科癌で最も予後不良な卵巣癌も含まれている。本邦の卵巣癌罹患数は毎年7000人以上であり、死亡数は4000人を超え近年増加傾向にある。組織型では、約半分を占める漿液性癌 (HGSC) に続いて、明細胞癌 (CCC) が20%と高い割合を示すことが特徴といえる。卵巣癌全体の予後改善を目指すためには、包括的な治療指針の改善に加え、分子標的治療を利用した個別化治療 (組織型別) の研究・開発が急務である。近年、様々な疾患でmiRNAあるいはその阻害剤の臨床試験が開始されている (Roosij E and Kaipinen S. *EMBO Mol Med*. 2014)。これまでに卵巣癌を対象としたmiRNAの発現・機能解析は数多く報告されているが臨床応用には至っていない。我々は、卵巣のHGSC及びCCCを対象とした癌関連miRNAの網羅的発現解析により、組織型を特徴づける発現プロファイルを先行研究として見いだした。特に2つの組織型において有意に発現の異なる5つのmiRNAを同定した。*microRNA-21*は、CCCにおいて高発現を呈したmiRNAであり、遺伝子増幅がその一因であること、また*PTE*M癌抑制遺伝子を標的とすることで発癌に関与することを報告した (Hirata Y et al. *BMC cancer*. 2014)。このように先行研究により同定された各々のmiRNAの発現変化が、既知の癌関連遺伝子やそのシグナル伝達経路を制御することで、卵巣癌における組織亜型の生物学的特性に寄与する可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌における(1)組織亜型 (HGSC・CCC) の生物学的特性に起因するmiRNAを同定すること(2)組織亜型別のmiRNAを標的とした臨床応用 (診断・予後予測・標的治療) を検討すること、を主な目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)卵巣癌における網羅的miRNA遺伝子発現解析

本研究は当該施設倫理委員会から承認を得た上で (承認番号14-132, 27-076) 初発卵巣癌患者から得た腫瘍組織を用いて行った (オリジナルコホート27症例及び追加コホート23症例)。また10種のCCC細胞株と6種のCCC以外の卵巣癌細胞株を使用した。miRNA遺伝子発現は、Cancer Focus microRNA PCR Panel V1 (EXIQON) 及びExiLENT SYBR® Green master mix (EXIQON) を用いたquantitative real-time RT-PCR法により、85種類の癌関連miRNAを含む88種類のmiRNAの発現を測定した。また*miR-132*, *miR-9*, *miR-126*, *miR-34a*については、TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いて個別に発現状態を調べた。網羅的発現解析については、Cluster 3.0 (Stanford University) により統計解析を行い、Tree View 1.6 (Stanford University) を用いて可視化した。

### (2) *miR-9* ノックダウンによるCCC細胞の生物学的反応

一過性核酸導入試験

CCC 細胞株である JHOC-9 と OVISe に *miR-9* 特異的な mirVana<sup>™</sup> *miR-9* inhibitor (*miR-9* inhibitor) と Anti-miR<sup>™</sup> miRNA Inhibitor Negative Control (anti-miR-NC) を Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて導入した。

#### 細胞浸潤能試験・細胞遊走能試験

細胞の浸潤能と遊走能を評価するために、*miR-9* inhibitor と anti-miR-NC を導入した JHOC-9 と OVISe 細胞を、マトリゲルでコートされた 24 ウェルのポリエチレンテレフタレート膜の上段に、また遊走能試験のために Falcon<sup>®</sup> 細胞培養 24 ウェルの上段にそれぞれ撒いた。培養 48 時間後に遊走または浸潤した細胞数を調べた。結果は平均 ± 標準偏差 (SDs) で示した。

#### ウェスタン・プロット法

E-cadherin (clone EP700Y; 1:50000 dilution; Abcam), Vimentin (clone H-84; 1:1000; Santa Cruz), Fibronectin (clone F1; 1:1000; Abcam), MMP-9 (clone 65-2A4; 1:500; Daiichi Fine Chemical),  $\beta$ -actin (clone 13E5; 1:1000; Cell Signaling Technology) を対象にたんぱく質をウェスタン・プロット法により解析した。結果は ImmunoStar<sup>®</sup> LD (Wako) を用いて可視化した。

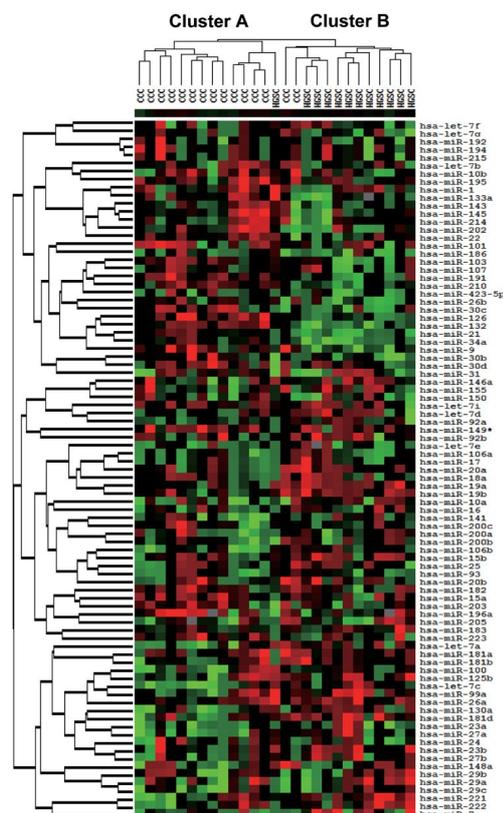
#### ルシフェラーゼ試験

JHOC-9 と OVISe に pMIR control luciferase vector, pMIR wild-type CDH1 3' -UTR luciferase vector (CDH1 3' -UTR wt), pMIR mutant-type CDH1 3' -UTR luciferase vector (CDH1 3' -UTR mut; addgene), pMIR-REPORT<sup>™</sup> -gal Control Plasmid (Applied Biosystems) を導入した。導入 24 時間後にホタルルシフェラーゼ活性と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を pMIR-REPORT<sup>™</sup> miRNA Expression Reporter Vector System (Applied Biosystems) を用いて測定した。結果は平均 ± SDs で表した。

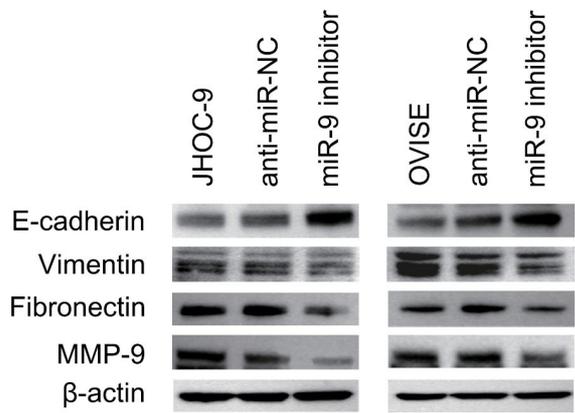
## 4. 研究成果

### (1) 卵巣癌における網羅的 miRNA 遺伝子発現解析

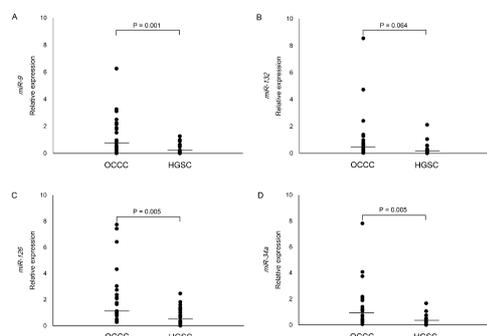
卵巣癌臨床検体から得られた miRNA 発現データをもとに階層クラスタリング分析を行ったところ、オリジナルコホート 27 例は miRNA 発現の類似性からクラスター A とクラスター B の 2 群に大きく分類された (右図)。クラスター A は CCC 13 症例と HGSC 1 症例で構成されており、クラスター B は CCC 2 症例と HGSC 11 症例で構成されていた。このクラスター間での、各臨床病理学的因子 (年齢・組織型・臨床進行期・CA125 値・子宮内膜症の有無など) の統計学的有意差を調べたところ、組織型において最も有意差が高かった (下表)。そこで CCC と HGSC を対象に群間比較分析を行ったところ、*miR-132*, *miR-9*, *miR-126*, *miR-34a*, *miR-21* の 5 つの miRNA の発現に有意差があることが明らかになった。特にこれら 5 つの miRNA は HGSC と比較して CCC で高発現であることがわかった ( $p < 0.001$ )。



Parameters	Cluster A (		
<b>Patient age</b>			
<60 years	12		
>60 years	2		
<b>Histological type</b>			
CCC	13		
HGSC	1		
<b>FIGO stage</b>			
I+II	12		
III+IV	2		
<b>LN metastasis (n = 26)</b>			
No metastasis	12		
Metastasis	2		
<b>CA125 (n = 25)</b>			
>35 U/ml	8		
≤35 U/ml	5		
<b>Ascitic cytology (n = 26)</b>			
Positive	6	8	0.267
Negative	8	4	
<b>Rupture</b>			
Without	5	2	0.490
Surgical	2	3	
Ruptured	7	8	
<b>Endometriosis (n = 26)</b>			
Positive	10	3	0.026*
Negative	4	9	
<b>Thrombosis (n = 24)</b>			
Positive	1	1	0.537
Negative	12	10	

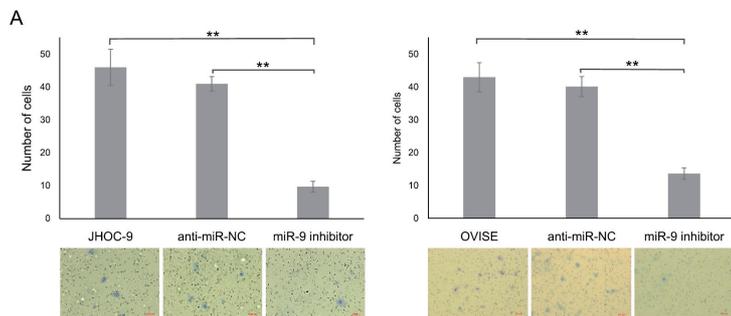


上記解析結果の妥当性検討する目的に、オリジナルコホート 27 症例に 23 症例を追加した合計 50 症例に対して、Taqman® MicroRNA assays を用いて *miR-9*, *miR-132*, *miR-126*, *miR-34a* の発現を個別に quantitative real-time RT-PCR 法を用いて測定した。CCC と HGSC 間での相対的な発現を比較したところ、*miR-9*, *miR-126*, *miR-34a* の発現が CCC で有意に高く、特に *miR-9* で最も有意差を認めた(右図)。



## (2) *miR-9*ノックダウンによるCCC細胞の生物学的反応

16 種類の卵巣癌細胞株に対して quantitative real-time RT-PCR 法により *miR-9* 発現量を調べたところ、CCC 以外の細胞株と比較し CCC 細胞株では *miR-9* の発現が高く、臨床検体を用いた解析と同様の傾向がみられた (data not shown)。そこで CCC における *miR-9* 過剰発現によって引き起こされる生物学的役割を明らかにするために、2 つの CCC 細胞株 (JHOC-9, OVISE) を用いて miRNA inhibitor によるノックダウン実験を行った。in vitro で浸潤能試験と遊走能試験を行ったところ、*miR-9* 発現を抑制するとコントロールと比較して浸潤能及び遊走能が有意に減少することが明らかとなった(右図)。



これまでの研究や *miR-9* のターゲット予測プログラムを利用することにより、細胞浸潤

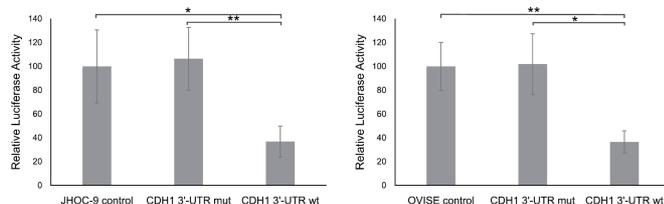
に關与する E-cadherin が *miR-9* の標的分子の一つであることが判明した。実際、JHOC-9 と OVISE 細胞において *miR-9* 発現を抑制すると E-cadherin の発現が有意に増加し、間葉系マーカーである Vimentin や Fibronectin、MMP-9 の発現が減ることが明らかになった(右図)。

さらに *miR-9* が直接 E-cadherin を標的としているかを確認するため、pMIR ルシフェラーゼベクターを JHOC-9 と OVISE 細胞に導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。CDH1 3' -UTR ワイルドタイプのベクターを導入された細胞は CDH1 3' -UTR 変異体やコントロールベクターを導入された細胞と比較しルシフェラーゼ活性が有意に減少した（右図）。

### (3) 考察

本研究では、卵巣癌組織型（HGSC と CCC）により有意に発現の異なる miRNA を見出した。同様に miRNA マイクロアレイ解析に関する検討から、*miR-509* members と *miR-510* が CCC と HGSC において発現差があることが報告されている。また卵巣癌組織特異的な miRNA 発現変化として、CCC における *miR-449* 低発現や *miR-30a/30a\** 高発現などが知られている。しかしながら、これらの報告では、組織特異的な卵巣癌発癌の分子メカニズムについては検討されていない。

これまでに食道癌、乳癌、大腸癌など多くの癌種において *miR-9* の高発現が報告されている。特に食道癌や乳癌では *miR-9* が E-cadherin をターゲットとし、*miR-9* の過剰発現により上皮間葉転換（EMT）が引き起こされ、転移促進に関与していることが明らかとなっている。本研究では、CCC 細胞株において *miR-9* 発現を抑制すると、E-cadherin の発現が上昇し浸潤能及び遊走能が有意に減少した。



このことは食道癌や乳癌と同様に、CCC 細胞における *miR-9* 過剰発現が E-cadherin の発現を直接的に抑制することで、EMT を促進する役割を担っていることを示唆している。これまでに、E-cadherin 発現は CCC 患者において予後不良因子であることが報告されている。CCC における *miR-9* と E-cadherin 発現との相互関係やその臨床的意義については、in vivo での検討や症例数を増やした解析において確認する必要がある。近年、*miR-200* family members 及び *miR-205* が多様な癌の EMT ドライバーである ZEB1 と ZEB2 をターゲットとすることにより EMT を促進していることが報告されている。一方、*miR-506* は、E-cadherin と Vimentin/N-cadherin の両方を調節することによって、卵巣癌における EMT 及び転移を抑制しているとの報告がある。EMT を制御することは、患者予後および転帰を大幅に改善する可能性があり、腫瘍細胞における EMT 関連 miRNA の調節は、新たな癌治療の開発において重要と考えられる。miRNA 標的予測データベース及び文献検索から、肺非小細胞癌及び子宮内膜癌に關与する FOXO1 や胃癌に關与する CDX2 など、腫瘍抑制性に働く *miR-9* のターゲットが多数同定されている。つまり *miR-9* は異なる癌や同じ臓器でも異なる組織型において、いくつもの役割を担う可能性があると考えられる。*miR-9* のターゲットとして E-cadherin 以外の分子も CCC 発生に影響を与える可能性があるため、*miR-9* を中心とした分子ネットワークに関する更なる研究も必要である。

本研究により、CCC における *miR-9* 過剰発現は、E-cadherin の発現調節を介して EMT を誘導することによりその生物学的特性に寄与していることが明らかとなった。さらなる検討が必要であるが、このことから *miR-9* は CCC の有力な治療標的となり得ることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kawakami E, Tabata J, Yanaihara N, Ishikawa T, Koseki K, Iida Y, Saito M, Komazaki H, Shapiro JS, Goto C, Akiyama Y, Saito R, Saito M, Takano H, Yamada K, Okamoto A. Application of Artificial Intelligence for Preoperative Diagnostic and Prognostic

Prediction in Epithelial Ovarian Cancer Based on Blood Biomarkers. *Clin Cancer Res.* 査読あり. 2019. 25: 3006-3015.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3378.

Kawabata A, Yanaihara N, Nagata C, Saito M, Noguchi D, Takenaka M, Iida Y, Takano H, Yamada K, Iwamoto M, Kiyokawa T, Okamoto A. Prognostic impact of interleukin-6 expression in stage I ovarian clear cell carcinoma. *Gynecol Oncol.* 査読あり. 2017.146: 609-614.

2017.146: 609-614.

doi: 10.1016/j.ygyno.2017.06.027.

Yanaihara N, Noguchi Y, Saito M, Takenaka M, Takakura S, Yamada K, Okamoto A. MicroRNA Gene Expression Signature Driven by miR-9 Overexpression in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *PLoS One.* 査読あり. 2016. 11: 0162584.

doi: 10.1371/journal.pone.0162584.

〔学会発表〕(計 2 件)

Tabata J, Yanaihara N, Goto C, Akiyama Y, Saito R, Komazaki H, Iida Y, Saito M, Saito M, Takano H, Isonishi S, Kawakami E, Okamoto A. A Machine Learning Algorithm Using Blood Biomarkers for Diagnostic and Prognostic Prediction in Epithelial Ovarian Cancer. 第70回日本産科婦人科学会学術講演会. 2018.

横溝陵, 矢内原臨, Jason Shapiro 斉藤美里, 山口乃里子, 川畑絢子, 高橋一彰 竹中将貴, 山田恭輔, 岡本愛光. 卵巣高異型度漿液性癌におけるmicroRNA-34aのバイオマーカーとしての有用性. 第7回婦人科がんバイオマーカー研究会. 2019.

〔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〕特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 山田恭輔

ローマ字氏名: YAMADA KYOSUKE

所属研究機関名: 東京慈恵会医科大学

部局名: 産婦人科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 30230452

研究分担者氏名: 高倉聡

ローマ字氏名: TAKAKURA SATOSHI

所属研究機関名: 独協医科大学

部局名: 産婦人科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60256401