

令和元年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16848

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるmicroRNA生合成過程が抗癌剤耐性化に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Identification of miRNA which regulates chemotherapy resistance in ovarian cancer treatment

研究代表者

久松 武志 (Hisamatsu, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80791376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌が予後不良である原因の一つに抗癌剤耐性化の問題がある。本研究はその原因検索をmicro RNA(miRNA)に求めた。卵巣癌のパクリタキセル耐性株を作成しRNAを抽出、miRNAの網羅的解析を行い、耐性株において発現が有意に低下するmiR-522を見出した。Databaseを用いて、卵巣癌におけるmiR-522の発現の予後に与える影響を検討し、その発現低下は予後不良因子であることを証明した。卵巣癌耐性株にmiR-522を導入したところ、パクリタキセルに対する抵抗性は解除された。さらに細胞周期関連分子に焦点を当て、miR-522の標的分子を検索し、転写因子E2F2を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌が未だに半数以上の患者が亡くなる予後不良な疾患である。Key drugとなるパクリタキセルと白金製剤の中心とした化学療法に対して初回治療では70%の奏効率を示すが残念ながら半数以上の症例で再発を来し、再発した卵巣癌において化学療法はもはや奏功しない。この現状を打破するために抗癌剤耐性化のメカニズムの解明が求められる。今回、パクリタキセル耐性株ではmiR-522の発現低下が起こった結果、E2F2の発現が上昇し、ゆえに癌細胞の細胞分裂が促進され、抗癌剤に対して抵抗性を示すようになるという耐性化獲得のメカニズムを解明した。卵巣癌の抗癌剤耐性化の打破につながる基礎的な研究データを供出した。

研究成果の概要(英文)：Overcoming paclitaxel resistance is a critical issue in ovarian cancer treatment. Herein, we identified microRNAs (miRNA) which modulates paclitaxel resistance and pursued those potential as a therapeutic target. Paclitaxel resistant cell lines were established, and miRNA PCR arrays indicated that miR-522 was one of down-regulated miRNAs in paclitaxel-resistant cells. Restoration of miR-522 resensitized resistant cells to paclitaxel. We focused on E2F2, a cell cycle related protein, as a target gene of miR-522, and luciferase reporter assay revealed that E2F2 is a direct target of miR-522. Cell cycle analyses showed that miR-522 attenuated paclitaxel resistance by down-regulating E2F2, which causes G0/G1 arrest. Public database showed that patients with the low expression of miR-522 were significantly correlated with worse survival. In conclusion, our results show that miR-522 attenuates paclitaxel resistance and can be considered a therapeutic target for recurrent ovarian cancer.

研究分野：産婦人科 婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 マイクロRNA パクリタキセル miR-522 E2F2 細胞周期

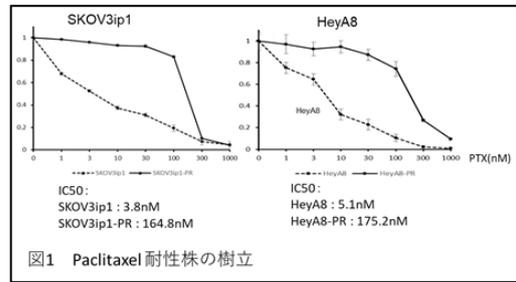
2011 b) 9314 @
 7HK: UXVb 4717 @ SZZ/8b@8rTE\$H
 [6 8b @ PKZm/!lg@PKS7@
 Key drug [6 bcpKS
 70%b [6 bcpKS
 Gb# 'gt%MSu@XS\$b
 2500 ' 8b@ RNA & mi RNA
 mi RNA epigenetic H @
 mi RNA MG\ T_ mi RNA
 b Key drug [6 Paclitaxel PMOM
 Paclitaxel [6 bcpKS
 bcpKS
 (1) Paclitaxel 8b@8B
 SKOV3ip1 \ HeyA8 PKZ Paclitaxel 10nM 3@
 PTX b (E)FBB Paclitaxel (SKOV3ip1-PR, HeyA8-PR)
 8BKS
 (2) miRNA qPCR array 2 Paclitaxel miRNA b)Y6@
 SKOV3ip1 SKOV3ip1-PR HeyA8 lg HeyA8-PR RNA QRb miRNA b\$'
 stem loop RT-qPCR-based TaqMan Human MicroRNA Array Set v2.0 (Applied Biosystems)#Y
 Paclitaxel miRNA b)Y6@ Paclitaxel *
 miR-522 K\$@fc miR-522 1X@
 WS
 (3) miRNA RT-qPCR 2
 (2) [WS miRNA qPCR array 2b)Y miR-522 PM Probe (Applied Biosystems;
 #002413)#Z miRNA RT-qPCR 2[DESI@ RNU6B (Applied
 Biosystems; #001093)#S
 (4) miR-522 bID@KCC@ Paclitaxel b@8jZ
 Paclitaxel MTS assay 2 Cell viability %B\$MGE
 S0v4[6 SKOV3ip1 \ HeyA8 _ miR-522 b7c& anti-hsa-miR-522-3p, Applied
 Biosystems; #AM12309) 4G °K Cell Viability 8j DES 3°
 Paclitaxel <4 SKOV3ip1-PR \ HeyA8-PR _ miR-522 bS9Q/& pre-hsa-miR-522-3p,
 Applied Biosystems; #PM12309)K]bE OWS
 (5) Public Database #S miR-522 b\$8j b@f
 PROGNOSTIC miRNA DATABASE (http://xvm145.jefferson.edu/progmir/) 61Z 549
 [b8b\$[AZ miR-522 b\$ [9* L\$ Lb8(8K miR-522 b\$
 # b\$8j DKS
 (6) miR-522 b\$@
 SKOV3ip1 _ Negative control \ miR-522 bS9Q/4GR RNA †
 K Cell cycle associated genes 1X Taqman Array Gene Signature 96-well Plate
 (Applied Biosystems; #4391524)[miR-522 (b)Y6@NS)YX
 I° E2F2 0bKS
 (7) Luciferase Reporter Assaay
 E2F2 b 3C -UTR Qb Mutant sequence Luciferase Assay #Y Plasmid RQ
 SKOV3ip1 \ HeyA8 4GRSI@b(Y Control miRNA \ miR-522
 K\$vb4GRQb Luciferase q@KS
 (8) Flow cytometry 2[6@f
 SKOV3ip1 _ Negative control \ miR-522 bS9Q/4GRSvb
 KS: † propidium iodide (P4864, Sigma) #YZ FACSCanto II flow
 cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ)[miR-522 (8j DKS
 (9) Western Blot 2

miR-522 (6)

Western blot 2

4> 2BY

(1) Paclitaxel 8b\$4b8B
 8b\$4 SKOV3ip1 \ HeyA-8 PKZ PTX
 10nM 10bä 3 0EZ
 - PTX b 07E/8KW 1 b MTS
 Assay [0M] : ^ PTX 08BKS IC50
 c SKOV3ip1 8Z Ov4[3.8nM [6WSbPKZ
 0[c 164.8nM [6WS HeyA8 [c Ov4[5.1nM [
 6WSbPKZ[c 175.2nM [6WS
 (2) miRNA qPCR array 2 Paclitaxel W\$'
 miRNA b)Y60
 SKOV3ip1 \ HeyA8 bg8b\$48Z Paclitaxel
 0[\$'KZ miRNA W 2 b] 0S
 (3) miRNA RT-qPCR 2
 (2) [0S miRNA X8Z miRNA-RT-PCR 2_
 | Validation /80[miR-522 b\$' @WKZG&KS|
 W0%' 2[c miR-522 1Wb00 GKS
 (4) miR-522 bIDvKCC#
 D0b\$ Paclitaxel bW0
 s8j 0f
 Ov 4 [6 SKOV3ip1 \ HeyA8 -
 miR-522 b 7< c
 & anti-hsa-miR-522-3p>4G°
 K Cell Viability 38j 0E
 KSGW 3 0M|Ov4b
 Paclitaxel PMW0K
 0KS3° Paclitaxel <
 4 SKOV3ip1-PR \ HeyA8-PR _ miR-522
 bS9Q/& pre-hsa-miR-522-3p> °
 KSG IC50 bW1u Paclitaxel PKZ0M|WSV
 0f miR-522 @ Paclitaxel W0KZ0S
 (5) Public Database #8S miR-522 0b\$8j b0f
 PROGNOSTIC miRNA DATABASE 0IZ
 8 549 [b8b\$ (E)W
 4 0M 56bp@ miR-522
 9E[927 ¥6WSbPKZ
 [c 647 %>KZSMU
 miR-522 b\$' Web\$E,
 I [60S
 (6) miR-522 b\$0K0
 8 b \$y4 SKOV3ip1 _ Negative
 control \ miR-522 bS9Q/4G°
 ¥ RNA #K Taqman Array Gene
 Signature 96-well Plate [miR-522 0M(b)Y6\$
 00VS)3X° E2F2 0bKS
 (7) Luciferase Reporter Assay
 E2F2 b 3C -UTR 0b Mutant sequence b0b
 W 5 0M miR-522 b4G° E2F2 b300
 WKS Mutant sequence [c miR-522 0b
 E2F2 @ miR-522 b%K\$
 Wc1uWMSU
 ^ Target [6G0S
 (8) Flow cytometry 2[00f
 SKOV3ip1 _ miR-522 K0L
 (00WSGW 6 0M| _ miR-522 ↓
 GO/G1 [FKZ(ymb00[ASM^
 U miR-522 @ GO/G1 Arrest 1KZ00
 S
 (9) Western Blot 2
 SKOV3ip1 \ HeyA8 _ Negative Control \ miR-522 4G°
 R(0A. 0 Western Blot /WSS E2F2



	SKOV3ip1-PR	HeyA8-PR
hsa-miR-194	0.18	0.013
hsa-miR-200c	0.212	0.342
hsa-miR-522	0.055	0.022
hsa-miR-627	0.358	0.001
hsa-miR-636	0.01	0.092

図2 Paclitaxel 耐性株で発現が低下しているmiRNA

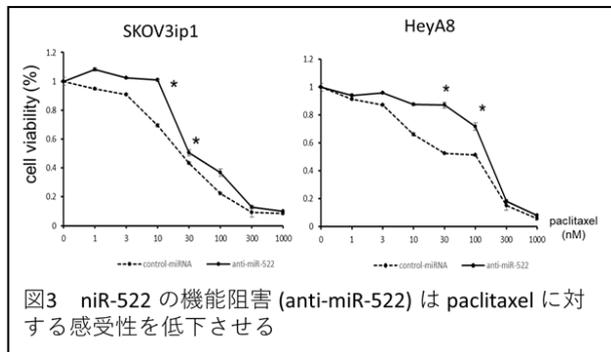


図3 miR-522 の機能阻害 (anti-miR-522) は paclitaxel に対する感受性を低下させる

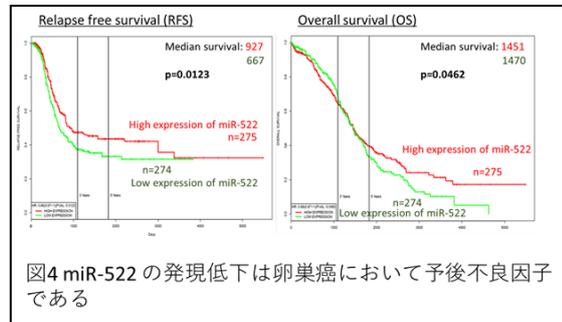


図4 miR-522 の発現低下は卵巣癌において予後不良因子である

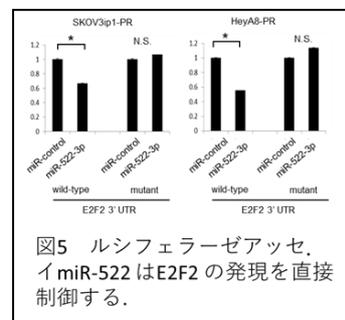


図5 ルシフェラーゼアッセイ miR-522 はE2F2 の発現を直接制御する。

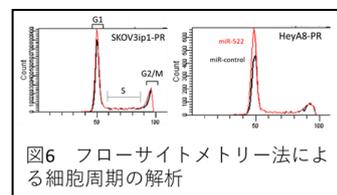


図6 フローサイトメトリー法による細胞周期の解析

Paclitaxel mi R-522 b...
E2F2 b... V.I.O (y...)
Paclitaxel M48 Process O...

3 > z\$te ' ...

4 6 ZW

- PRKRA/PACT Expression Promotes Chemoresistance of Mucinous Ovarian Cancer. Hisamatsu T, McGuire M, Wu SY, Rupaimoole R, Pradeep S, Bayraktar E, Noh K, Hu W, Hansen JM, Lyons Y, Gharpure KM, Nagaraja AS, Mangala LS, Mitamura T, Rodriguez-Aguayo C, Eun YG, Rose J, Bartholomeusz G, Ivan C, Lee JS, Matsuo K, Frumovitz M, Wong KK, Lopez-Berestein G, Sood AK. Mol Cancer Ther. 2018 Oct 10. pii: molcanther.1050.2017. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1050. [Epub ahead of print]
- Role of ADP receptors on platelets in the growth of ovarian cancer. Cho MS, Noh K, Haemmerle M, Li D, Park H, Hu Q, Hisamatsu T, Mitamura T, Mak SLC, Kunapuli S, Ma Q, Sood AK, Afshar-Kharghan V. Blood. 2017 Sep 7;130(10):1235-1242. doi: 10.1182/blood-2017-02-769893. Epub 2017 Jul 5.
- Induction of anti-VEGF therapy resistance by upregulated expression of microsemipoprotein (MSMP). Mitamura T, Pradeep S, McGuire M, Wu SY, Ma S, Hatakeyama H, Lyons YA, Hisamatsu T, Noh K, Villar-Prados A, Chen X, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Hu W, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Sood AK. Oncogene. 2018 Feb 8;37(6):722-731. doi: 10.1038/onc.2017.348. Epub 2017 Oct 23.
- Role of Platelet-^{HULYHG7JILQNKHBURJUHVVLRQRI2YDULD} Hu Q, Hisamatsu T, Haemmerle M, Cho MS, Pradeep S, Rupaimoole R, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Wong STC, Sood AK, Afshar-Kharghan V. Clin Cancer Res. 2017 Sep 15;23(18):5611-5621. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3272. Epub 2017 Jun 13.

1. PRKRA/PACT c mi RNA #...
4K8 J; _____ ' 76 G 9.28-30/' 17 ~

0 6

#...
0 6

' 88
88
88

0E 0 6

' 88
88
88

QbU
D.. K

4> %' 2))°

(1)%' 2 *

%' 2 𠄎

%#ä

𠄎

Miyamoto Mayuko

dE2

X8Z

↓

%' 2 c %' 2* b 0 | \ 2i 8Z

\ b 0[13'... ö YCvb[cCQb

Mvb[MObSu

%' 2BÝ _ 6i M 0b0 x 2i c %' 2¶

%' 2 b

x %' 2BÝ b ¶f... _

_ I rM