

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592120

研究課題名（和文） 網羅的マイクロRNA解析による子宮体部漿液性腺癌の癌化機構の解明

研究課題名（英文） The role of micro-RNA in carcinogenesis and development of uterine papillary serous carcinoma (UPSC)

研究代表者

永瀬 智（NAGASE SATORU）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00292326

研究成果の概要（和文）：

子宮体部漿液性腺癌（UPSC）の発癌・進展に関与するマイクロRNA（miRNA）をmiRNAマイクロアレイ解析を行って確認したところ、miR-101, miR-10b*, miR-133a, miR-133b, miR-152, miR-29b, miR-34b, miR-411の発現が正常内膜と比較し低下していた。この中でp53と関連が大きいmiR-34bの機能解析を行った。UPSC由来の細胞株にmiR-34bを導入し、細胞増殖能（ $P < 0.01$ ）、遊走能（ $P < 0.01$ ）及び浸潤能の抑制（ $P < 0.001$ ）、カスパーゼ活性の上昇（ $P < 0.05$ ）を確認した。miR-34bの細胞株への導入により、癌遺伝子であるMETの発現低下が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We compared miRNA expression levels in uterine papillary serous carcinoma (UPSC) with the levels in endometrial endometrioid adenocarcinoma (EEC) and normal endometria. Eight miRNAs were identified as having aberrant down-regulation specific to UPSC with miR-34b being most pronounced. Ectopic expression of miR-34b inhibited cell growth, migration, and most notably invasion. These effects are likely mediated by the downstream target of miR-34b, the proto-oncogene MET, a known prognostic factor in endometrial carcinomas. The expression of MET was reduced following the restoration of miR-34b in cell lines. In summary, our data suggest that miR-34b plays a role in the molecular pathogenesis of ESC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮体癌、子宮体部漿液性腺癌、類内膜腺癌、マイクロRNA、発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

UPSCの頻度は、子宮体癌の10%程度であるが、類内膜腺癌に比較して予後不良であることが知られている（図1）。さらに、組織型別癌死の比較では、10%の頻度である

UPSCの癌死数は子宮体癌全体の癌死数の約半数を占めており、UPSCの予後改善が子宮体癌全体の予後改善に直結するものと考えられる。子宮体癌の80%を占める類内膜腺癌はエストロゲン依存性であるのに対し、

UPSCは非依存性であり、その発癌メカニズムに関する分子生物学的背景は大きく異なっている。UPSCと類内膜腺癌の発生・進展に関与する遺伝子群の類似性と差異を解明することは、予後不良であるUPSCに対する診断、治療方針を確立する上でも重要な基礎的情報となる。

そこで我々は、遺伝子異常解明に向けてmiRNAに着目した。miRNAは22塩基前後のnon-coding RNAであり、target RNAの翻訳抑制や切断により転写後の発現を抑制的に調節している。研究開始当初540個のmiRNAが同定されており、target RNAの発現を調節することにより発生、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどに重要な役割を果たしていることが明らかになっていた。miRNAの発現は、組織特異性が強く、発生・分化・進展におけるそれぞれの段階で発現量が異なることが大きな特徴であり、癌の診断や予後因子として応用できる可能性もある子宮体癌とmiRNAに関する報告では、内膜増殖症と類内膜癌のmiRNAアレイの結果を比較した論文が存在するにすぎず、標的遺伝子の同定やその生物学的役割を明らかにした報告はなく、本研究は子宮体癌、特に子宮体部漿液性腺癌とmiRNAの関連についての先駆けとなるものであった。

2. 研究の目的

UPSCの癌化・進展に関与するmiRNAとその機能を明らかにするために以下の目的を設定した。

(1) 類内膜腺癌およびUPSCのmiRNA発現プロファイルの作製し、二つの組織におけるmiRNAの発現の相違を明らかにする。

(2) UPSCに特異的なmiRNAの発現と臨床病理学的因子の関連を明らかにする。

(3) UPSCの発生・進展に関連するmiRNAの機能解析を行い、標的遺伝子の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 対象

細胞株は漿液性腺癌由来であるSPAC-1-Lを用いた。臨床検体は2001年から2006年の5年間に当施設で初回手術を施行された41人の患者から得られた子宮内膜癌手術標本(類内膜腺癌20例、漿液性腺癌21例)を用いた(本研究は、東北大学倫理委員会の承認を得て施行され、これらの標本はいずれも患者の同意を得た後に採取されたものである)。また正常組織として、正常子宮内膜組織7例(増殖期4例、分泌期3例)を用いた。

(2) DNAおよびRNA抽出

抽出標本は速やかにOCTコンパウンド

(Sakura Finetechnical Co. Ltd., Tokyo, Japan)に包埋し、使用するまで -80°C で保存した。DNAおよびRNA抽出には、ヘマトキシ

リン・エオジン染色により少なくとも90%以上の癌を含む標本を用いた。miRNAを含む全RNAは凍結組織および培養細胞株からmiRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いて抽出した。ゲノムDNAは凍結組織および培養細胞株からQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出した。

(3) miRNAマイクロアレイ解析

100ngの全RNAを用いてマイクロRNAマイクロアレイ解析を行った。Agilent microarray scanner (Agilent Technologies)でスキャンを行った後、Agilent Feature Extraction software Ver. 9.5.3.1 (Agilent Technologies)を用いてデータを抽出し、Gene Spring GX 7.3.1 software (Agilent Technologies)を用いて遺伝子発現の解析を行った。

(4) Real-time 定量RT-PCR

臨床検体より抽出、精製した5ngの全RNAに対しTaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作製した。Real-time 定量PCRは、ABI7500 thermocycler (Applied Biosystems)およびTaqMan probe (Applied Biosystems)を用いて施行した。RNU6B遺伝子の値は内在性の標準として使用し、RNU6B遺伝子の発現量を基準としたmiR-34b遺伝子の発現量で、臨床検体の発現を比較検討した。いずれの反応も2回施行し、結果には得られた値の平均値を用いた。

(5) ウェスタンブロット解析

細胞株よりM-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)を用いてタンパク質を抽出した後、その濃度をProtein Assay Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて測定した。10 μg のタンパク質をSDS-PAGE (10% acrylamide gel)で分画した後、Hybond P polyvinylidene difluoride membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)に転写し、MET (Cell Signaling Tech, Danvers, MA, USA)と β -actin (Sigma-Aldrich)の一次抗体に認識させた。希釈濃度はMETが1000倍、 β -actinが10000倍として使用した。二次抗体で認識後ECL-plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare)と反応させ、タンパク質のバンドをLAS-1000 image analyzer (Fuji Photo Film Co. Tokyo, Japan)を用いて視覚化した。

(6) miRNA前駆体の導入

SPAC-1-L(細胞数: 1×10^5 個)に100 pmolのPre-miR miRNA Precursor Molecules (Applied Biosystems)およびPre-miR miRNA Molecules Negative Control 1 (Applied Biosystems)を

LipofectamineRNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて導入した。ウェスタンブロット解析および機能解析には、導入の72時間後に細胞を回収し用いた。いずれの反応も N=3 で3回施行し、結果には得られた値の平均値を用いた。

(7) 細胞増殖能、遊走能、浸潤能、およびカスパーゼ活性解析

細胞数を Cell counting kit-8 (Dojindo, Inc., Kumamoto, Japan) で測定し、細胞増殖能を解析した。細胞遊走能および、浸潤能の解析では、 5×10^4 個の細胞をチャンバー上方のコートイングされていない膜上、または、チャンバー上方のマトリゲルにコートイングされた膜状にのせて行った。遊走能解析では 37°C で12時間、浸潤能解析では 37°C で6時間培養した後、膜の孔を移動せずに残存している細胞を除去し、膜の下面をメタノール固定後トリジンブルー0で染色し、顕微鏡下で細胞数を計測し評価を行った。アポトーシス能の検討には Caspase-Glo Assay (Promega) を用い、Model 680 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で蛍光測定した。すべての解析は N=3 で3回施行し、結果には得られた値の平均値を用いた。また、すべての解析には細胞導入をせずに試薬のみで反応を行った群と、ネガティブコントロールを細胞導入し反応を行った群の実験を行い、これらに有意差がないことを確認した。

(8) 統計学的解析

miRNA マイクロアレイのデータは Gene Spring GX 7.3.1 software (Agilent Technologies) を用いて数値化し、発現量は中央値で表した。統計学的解析には Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., NC, USA) を使用した。正常組織と比較して2倍以上の増減のあった miRNA を選択し、さらに Mann-Whitney 検定により正常組織との間に有意差のあったものを後の検討に用いた。結果は平均値±標準偏差で示し、Mann-Whitney 検定により臨床因子と miRNA の発現異常との相関を検討した。one-way ANOVA と Bonferroni 検定を機能解析の多群間の比較検定に用いた。いずれの検定も危険率 p 値が有意水準5%以下である場合に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 漿液性腺癌および類内膜腺癌における miRNA プロファイリングの比較

miRNA マイクロアレイにより UPSC で正常子宮内膜と比較して146の miRNA で発現の増減を認めた。このうち類内膜腺癌でも発現の増減がみられたものは84種類、UPSC においてのみ発現の異常が見られたものは62種類で、そのうち発現の増加が55、発現の低下が7種類であった。一方、類内膜腺癌のみで発現の

異常が認められた miRNA は86種類であった。発現の増減を確認するためリアルタイム RT-PCR を行ったが、正常内膜と比較して miR-101, miR-10b*, miR-133a, miR-133b, miR-152, miR-29b, miR-34b, miR-411 の発現が低下していることが確認された。また、miR-205 では、漿液性腺癌において発現が増加していることが確認された。

(2) 臨床病理学的因子との関連

漿液性腺癌における臨床病理学的因子との相関を確認した。miRNA の発現低下と UPSC の全生存率を比較したところ、miR-101, miR-10b* (図1), miR-139-5p, miR-152, miR-29b, miR-455-5p の発現低下群においては、発現正常群と比較して有意に全生存率が悪いことが明らかとなった。また、miR-10b*, miR-29b, miR-455-5p の発現と脈管侵襲の有無と統計学的有意差をもって相関していた。

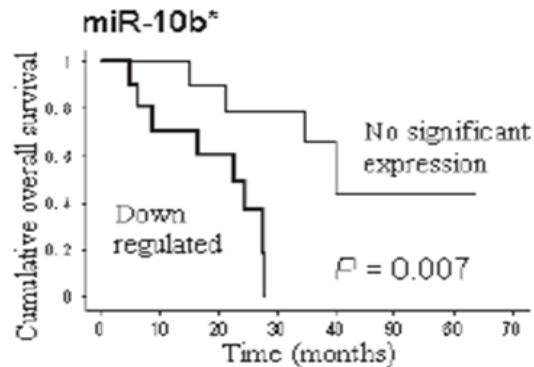


図1 miR-10b 発現と生存率

(3) 漿液性腺癌における miR-34b の発現異常と臨床病理学的因子との関連

UPSC の癌化・進展には p53 の異常が関与していることは知られており、miR-34b が p53 の直接的なターゲットであると考えられているため、miR-34b に着目し研究を進めた。UPSC においては、正常内膜組織と比し2倍以上減少した73種類の miRNA のうち、miR-34b は40.2倍の減少を示し上位2番目であった。miR-34b の発現低下と臨床病理学的因子の関連の検討を行った。進行期、筋層浸潤の深さ、リンパ節転移、脈管侵襲の有無については miR-34b の発現低下と相関が認められなかった。病理学的因子の一つとして p53 の免疫染色を行ったが、漿液性腺癌21例のうち18例(85.7%)に p53 タンパクの過剰発現が認められた。これに対しすべての正常内膜組織は p53 陰性を示した。miR-34b の発現低下と p53 タンパクの過剰発現は有意な関連を認めた (P=0.003)。(図2)

(4) miR-34b の導入による漿液性腺癌由来細胞株における細胞増殖能、遊走能、浸潤能およびカスパーゼ活性における影響

miR-34b が漿液性腺癌細胞の増殖を抑制す

る作用をもつかどうかを明らかにするために、SPAC-1-LにmiR-34bの前駆体分子とネガティブコントロールを導入した。その結果、統計学的有意差をもって細胞増殖の抑制が認められた ($P < 0.01$) (図3A)。次に、遊走能および浸潤能に対する作用について検討したところ、miR-34bを導入後、いずれにおいても肉眼的に明らかに抑制が認められた。遊走能においては-40%の細胞数の減少 ($P < 0.01$)、浸潤能においては-80%の細胞数の減少 ($P < 0.001$) という非常に際立った抑制作用が認められた (図3B, C)。さらに、カスパーゼ活性についても検討を行った。ネガティブコントロール 247.8 ± 6.8 に対し、miR-34b導入後は 284.4 ± 17.7 と、軽度ではあるが統計学的有意差をもってカスパーゼ活性を上昇させた ($P < 0.05$) (図3D)。

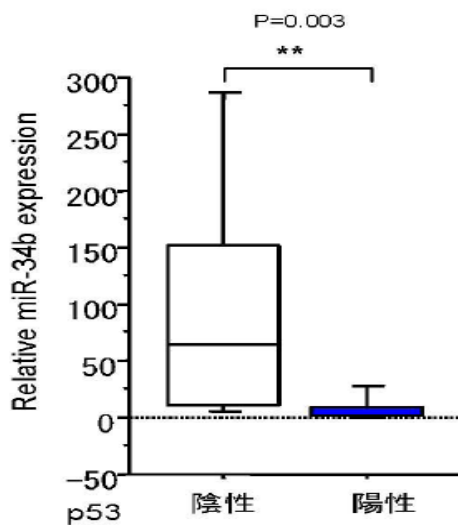


図2 p53免疫染色の発現とmiR-34b発現異常との関連

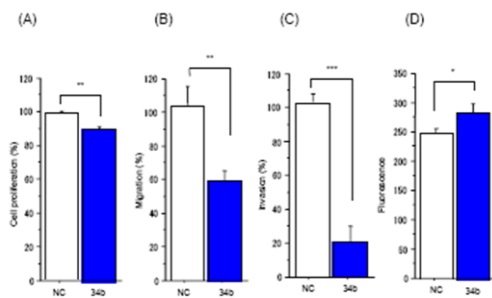


図3 miR-34b導入後の細胞増殖能、遊走能、浸潤能およびカスパーゼ活性解析

(5) miR-34bの導入によるMETタンパクの発現レベルへの影響

miR-34bの導入によるタンパク発現レベルへの影響について検討するために、miR-34bの標的遺伝子の一つと報告されてい

るMET遺伝子について、ウェスタンブロット解析を行った。METタンパクのバンドは145kDaの位置に認められた。図4に示すように、miR-34b導入から72時間後のMETタンパクの発現は明らかに減少していた。

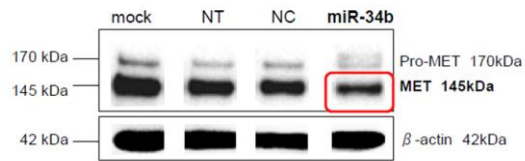


図4 miR-34b導入によるMET発現の変化

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4件)

- ① Hiroki E, Suzuki F, Akahira J, Nagase S, Ito K, Sugawara J, Miki Y, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma. Int J Cancer. 2011 査読有 Epud ahead of print
- ② 鈴木史彦、永瀬智 婦人科がんの Molecular Biology～7. エピジェネティクス 査読無 78:67-73, 2011
- ③ Nagase S, 他 28 名; Japan Society of Gynecologic Oncology. Evidence-based guidelines for treatment of uterine body neoplasm in Japan: Japan Society of Gynecologic Oncology (JSGO) 2009 edition. Int J Clin Oncol. 2010 査読有 15: 531-542.
- ④ Hiroki E, Akahira JI, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. Cancer Sci. 査読有 2010; 101: 241-249.

〔学会発表〕(計6件)

- ① 鈴木 史彦、永瀬 智、子宮体部漿液性腺癌(UPSC)における microRNA-34b の発現制御および機能の解明、第 70 回日本癌学会学術総会、平成 23 年 10 月 3 日 名古屋
- ② 永瀬 智、子宮体部漿液性腺癌 (UPSC) におけるマイクロ RNA の発現異常および機能の検討、Rare Tumor 研究会 (日本婦人科腫瘍学会)、平成 22 年 12 月 5 日 佐賀
- ③ 廣木 恵理、永瀬 智、子宮体部漿液性腺癌において microRNA-34b は癌抑制的な役割をもつ可能性がある、第 69 回日本癌学会学術講演会、平成 22 年 9 月 24 日 大阪

④鈴木 史彦、永瀬 智、子宮体部漿液性腺癌におけるマイクロRNAの役割、第69回日本癌学会学術講演会、平成22年9月22日 大阪

⑤鈴木 史彦、永瀬 智、子宮体部漿液性腺癌におけるマイクロRNAの役割、第62回日本産婦人科学会学術講演会、平成22年4月24日 東京

⑥廣木恵理、永瀬 智、Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. 第68回日本癌学会学術総会、平成21年10月1日 横浜

〔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〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 智 (NAGASE SATORU)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00292326

(2) 研究分担者

大槻 健郎 (OTSUKI TAKEO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：40531330

岡本 聡 (OKAMOTO SATOSHI)
東北大学・病院・臨床検査技師
研究者番号：40420020