

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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390313

 研究課題名(和文) 機能的スクリーニング法を用いた子宮体癌関連マイクロRNAの探索と
核酸医薬への応用

 研究課題名(英文) Exploration of endometrial cancer-associated microRNAs by using
a functional screening method and its application to medication

研究代表者

青木 大輔 (AOKI DAISUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30167788

研究成果の概要(和文):

子宮体癌においてエピジェネティックな異常メチル化により発現が抑制されている癌抑制型マイクロRNA(miRNA)を同定し、その機能を解析することを目的とした。ヒト子宮体癌由来細胞株に脱メチル化剤(5-Aza-CdR)を添加し発現が増加したマイクロRNAの中からmiR-34bを同定した。miR-34bは体癌組織で発現が抑制されており、培養細胞に導入するとコロニー形成能および遊走能を低下させた。マウス移植腫瘍に対しては抗がん剤の効果を増強したことから新たな子宮体癌治療のツールとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

The aim of this study is to identify a tumor-suppressor microRNA (miRNA) silenced by aberrant DNA methylation in endometrial cancer. By investigating escalation of expression level of microRNAs after exposure of 5-Aza-CdR in endometrial cancer cells, miR-34b was identified as a candidate for the tumor-suppressor miRNA. A low level of miR-34b expression was confirmed in endometrial cancer and its transfection into endometrial cancer cell lines reduced colony formation and cell migration. And administration of miR-34b plus paclitaxel more inhibited growth of the mouse xenograft than paclitaxel alone. These results suggested that miR-34b could be a therapeutic tool to treat endometrial cancer.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

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，マイクロRNA，エピゲノム異常，DNAメチル化，癌抑制型マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮体癌は増加の一途をたどり、婦人科悪性腫瘍の中では罹患率と死亡率共に最も高くなることが予想されている。しかしながら、その病態については不明な点も多く、治療の個別化にはほど遠い状況であり、本疾患の発がん機構の解明とこれらに基づいたがんの予防と至適治療法の確立は急務の課題である。本研究は子宮体癌の新たな診断や治療体系の構築に寄与すべく、ゲノム情報発現系の新たな調節制御分子として注目されている機能的低分子 RNA である miRNA に着目した。そこで、RNA 創薬の開発による臨床応用を目的として、がん特異的エピゲノム異常を指標とした miRNA の網羅的探索と詳細な解析を行い、子宮体癌の発がん進展過程における miRNA とそのがん遺伝子様標的分子の探索を行い、オーダーメイド医療実現のための新たな分子機構・機序の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1)子宮体癌でエピジェネティック制御を受けている miRNA の網羅的解析と癌抑制型 miRNA の検出

miRNA は non-coding RNA であり、ヒトにおいて 1000 種近く同定されている。我々は子宮体癌においてエピジェネティックな異常メチル化により発現が抑制されている miRNA を同定し、その癌抑制型 miRNA としての機能を解析することを目的とした。

miRNA アレイを用いて、子宮体癌細胞株を 5-Aza-CdR などの脱メチル化剤で処理することにより発現が 2 倍以上上昇する miRNA を網羅的に解析する。その発現をプロファイリングすることにより、子宮体癌の発癌に寄与する癌抑制型 miRNA や抗癌剤感受性に影響する miRNA を同定するとともに、miRNA の導入に

よる子宮体癌に対する新たな核酸医薬の可能性を追求する。

3. 研究の方法

(1)子宮体癌細胞でエピジェネティックな制御を受けている miRNA の網羅的解析と癌抑制型 miRNA の検出

4 種のヒト子宮体癌由来細胞株 (SNG-II, HEC-108, HHUA, Ishikawa) を用いて、脱メチル化剤である 5-Aza-CdR 処理前後における miRNA 発現の変化を miRNA アレイを用いて網羅的に解析を行う。脱メチル化剤の添加により、発現が 2 倍以上に増加した miRNA はエピジェネティックな制御により発現が抑制されている可能性が推測される。さらに、子宮体癌細胞株における miRNA のアレイのプロファイリングを行い、子宮体癌の発癌に重要な癌抑制機能を有する miRNA の候補を選別する。miRNA のアレイ解析は Affinmetrix 社のシステムを使用する。候補となる癌抑制型 miRNA の脱メチル化剤添加による発現の回復を Taq-man PCR 法で確認した後、臨床検体を用いて子宮体癌において候補となる癌抑制型 miRNA が正常子宮内膜に比して発現が抑制されていることを確認する。

(2)子宮体癌細胞に対する癌抑制型 miRNA の遺伝子導入と抗腫瘍効果の検討

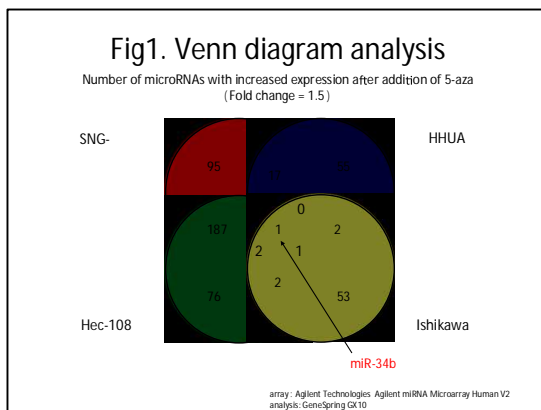
子宮体癌由来培養細胞株に対して、候補である癌抑制型 miRNA を遺伝子導入し、癌細胞に対する効果を増殖曲線の変化、コロニー形成能、FACS による細胞周期の変化、MTT アッセイなどにより細胞増殖能およびアポトーシス誘導能の点で検討する。さらに、*in vivo* における抗腫瘍効果をヌードマウ皮下腫瘍に対する miRNA の投与により検討する。皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果は、腫瘍体積の変化、Ki67 染色、TUNEL 法により解析を行う。さら

にデータベースによる in silico 解析により、候補である癌抑制型 miRNA が制御する分子を解析し、関連するシグナル伝達経路を明らかとし、癌抑制機構を明らかとする。

4. 研究成果

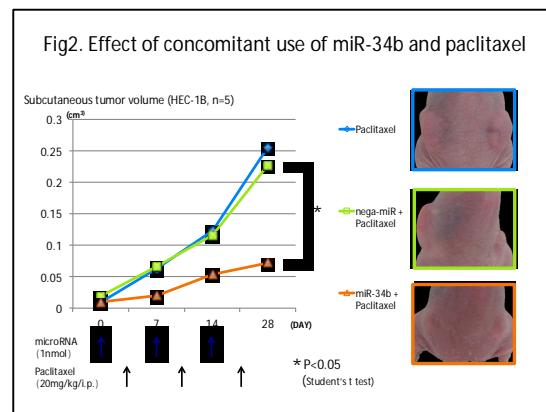
(1)4 種のヒト子宮体癌由来細胞株 (SNG-II, HEC-108, HHUA, Ishikawa) を用いて 5-Aza-CdR 処理前後における miRNA 発現の変化解析したところ、821 種のヒト miRNA のうち、5-aza-dc 添加により 4 種すべての体癌細胞株で発現が上昇したのは miR-34b のみであった (Fig1)。miR-34b は CpG アイランド内に位置し、p53 により制御されている癌抑制型 miRNA であった。

IC のもとに採取した正常内膜 (n=9) と類内膜腺癌部 (n=11) における miR-34b の発現を TaqMan PCR 法で解析したところ、臨床検体においても体癌検体で有意に発現が低下していた ($p < 0.01$)。



(2)子宮体癌由来細胞株 HEC-108 に miR-34b を導入したところ、コロニー形成能および遊走能が非導入時に比し有意に低下し ($p < 0.05$)、G1arrest の細胞割合が増加した。また、miR-34b 導入 HEC-108 では標的遺伝子である MYC や MET の発現が低下していることがあきらかとなった。

また、子宮体癌細胞株 HEC=1B をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍を形成させた。その



皮下腫瘍に対し、パクリタキセル (20mg/kg)、パクリタキセル (20mg/kg) + nega-miR (1nmol)、パクリタキセル (20mg/kg) + miR-34b (1nmol) の群に分け薬剤投与を行ったところ、群は他の群に比し有意に腫瘍の増殖が抑制された ($p < 0.05$, Fig 2)。さらに、皮下腫瘍を摘出し免疫染色を行ったところ、群は他の群に比し Ki67 の染色性が低下していることが明らかとなった。

以上より miR-34b は子宮体癌において異常メチル化により高頻度に発現が抑制されている癌抑制型 miRNA で、体癌細胞の増殖、遊走に重要な役割を果たしており、新たな子宮体癌治療のツールとなる可能性が示唆された。

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)

Banno K, Yanokura M, Kisu I, Yamagami W, Susumu N, Aoki D: MicroRNAs in endometrial cancer. International journal of clinical oncology, 査読有, 18: 186-192, 2013. DOI: 10.1007/s10147-013-0526-9

Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Kobayashi Y, Ueki A, Tsuji K, Yamagami W, Nomura H, Susumu N, Aoki D: Endometrial Cancer and Hypermethylation: Regulation of DNA

and MicroRNA by Epigenetics. Biochemistry Research International, 査読有, 2012: 738274, 2012. DOI: 10.1155/2012/738274.

Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Susumu N, Aoki D: Epigenetics and genetics in endometrial cancer: new carcinogenic mechanisms and relationship with clinical practice. Epigenomics, 査読有, 4: 147-162, 2012. DOI: 10.2217/epi.12.13

Yanokura M, Banno K, Kisu I, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Tsuji K, Yamagami W, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D: MicroRNA in endometrial cancer. Trends Cancer Res, 査読有, 7: 49-55, 2011.

URL:<http://www.researchtrends.net/tia/title.asp?id=57>

〔学会発表〕(計6件)

Banno K: Aberrant epigenetic DNA hypermethylation in liquid-based endometrial cytology samples: evaluation and potential use in diagnosis. 37th European congress of Cytology, 2012年10月1日, ドゥブロヴニク(クロアチア)

矢野倉 恵: Antitumor effect of combined miR-34b and paclitaxel on endometrial cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月21日, ロイトン札幌・札幌市教育文化会館・さっぽろ芸文館(北海道)

矢野倉 恵: 子宮体癌においてエピジェネティックに制御される miR-34b の同定とその癌抑制効果. 第64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日,

神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場(兵庫県)

Banno K: Epigenetically controlled *miR-34b* has antitumor activity against endometrial cancer cells. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場(愛知県)

鶴田智彦: エピゲノム異常により発現抑制され細胞増殖抑制活性を有する子宮体がん関連 microRNA 及びその標的分子の同定. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 2011年8月30日, リーガロイヤルホテル大阪・大阪国際会議場(大阪府)

Tsuruta T: Functional screening of tumor-suppressive microRNA silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月24日, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府)

〔図書〕(計1件)

Masuda K, Banno K, Yanokura M, Tsuji K, Kisu I, Ueki A, Kobayashi Y, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D: London, UK: Academic Press, Epigenetics in Human Disease, 2012: 592(471-480)

〔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

青木 大輔 (AOKI DAISUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30167788

(2) 研究分担者

阪埜 浩司 (BANNO KOUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70265875

平沢 晃 (HIRASAWA AKIRA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90296658

(3) 連携研究者

野村 弘行 (NOMURA HIROYUKIU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50327590

(4) 連携協力者

稲澤 讓治 (INAZAWA JOHJI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551

小崎 健一 (KOZAKI KEN-ICHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教

授

研究者番号：50270715