

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21日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791542

研究課題名（和文）卵巣がんにおけるマイクロ RNA の新規治療標的としての有用性の検討

研究課題名（英文）MicroRNA as a new target for ovarian cancer therapy

研究代表者

長谷川 幸清（HASEGAWA KOSEI）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30534193

研究成果の概要（和文）：マイクロ RNA が卵巣がんにおいて治療標的分子として利用できるかを検討するために、マイクロ RNA の卵巣がんにおける機能解析を行った。Mir-182 の過剰発現により細胞増殖能の亢進が認められるだけでなく、mir-182 高発現卵巣癌において CD8T リンパ球の浸潤が少ないことがわかった。これらのことが予後に影響している可能性が示唆され、マイクロ RNA が卵巣がんにおいて臨床マーカー、あるいは治療標的分子として利用できる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To determine if the microRNA would be the therapeutic targets for ovarian cancer, we investigated the biological function of the microRNA in ovarian cancer. We observed increased proliferation in ovarian cancer cells with mir-182 overexpression, and less CD8 T lymphocytes infiltration with high mir-182 expressing ovarian cancers. These findings might contribute to the prognosis of ovarian cancer patients. The microRNA is therefore a candidate of new class targets for ovarian cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：婦人科腫瘍学、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんはもっとも死亡率の高い婦人科がんであり、プラチナ製剤, タキサン製剤の誕生により生存率の改善はある程度確認できたものの、多くの場合2年以内に再発しやがては化学療法耐性となり予後不良である。そのため新しい治療法の開発や、臨床上有用なマーカーの発見、さらには新規治療標的の同定は急務である。これまで卵巣がんについ

て行われてきた研究の多くは protein-coding genes について焦点が絞られていた。一方 protein-coding genes 以外の non-coding genes から転写される、いわゆる non-coding RNAs にも生物学的な機能を持った一群が存在することが明らかになってきている。しかし、これらの non-coding RNAs に対する研究ははまだ始まったばかりである。non-coding RNAs の中でもマイクロ RNA

(miRNA)と呼ばれる~22塩基からなる small RNA は protein-coding gene の発現制御をおこない、細胞増殖やアポトーシスに深く関わっていると考えられている。これまでの研究では特に miRNA は悪性転化や発生、幹細胞のホメオスタシスなどにおいて大きな役割を果たしていることがわかってきている。約 600 もの miRNA がすでに同定されており、理論的にはヒトゲノム上には約 1000 もの miRNA が存在すると考えられている。miRNA はまず核内で 60 から 70 塩基の precursor miRNAs (pre-miRNAs) へとプロセッシングされ、その後細胞質へと移動する。ここで pre-miRNAs はさらにプロセッシングを受け、22 塩基からなる成熟二本鎖 miRNA となる。そして RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる機能性複合体を形成し、ターゲットとなる遺伝子の mRNA の 3' 末端非翻訳領域 (3' UTR) に結合し、その遺伝子の発現制御に関与する。miRNA マイクロアレイによるがんと正常組織の比較において、多くのがん種において miRNA の異常発現が認められることがわかってきた。また miRNA の発現パターンを比較解析することによって、同じがん種であっても生物学的あるいは臨床的な違いを判別することが可能であることがわかってきた。これらのことから miRNA はがん抑制遺伝子あるいはがん原遺伝子としても機能する可能性があることが推測されている。事実、*Let-7* は *RAS* を、*mir-15* と *mir-16* は *BCL2* の発現を抑制することが明らかになり、*mir-17-92* cluster は肺がんおよび lymphoma でがん遺伝子としての役割が示唆されている。以上のことより腫瘍発生における miRNA の役割を理解することは今後の新しいマーカーの発見、予防、治療の開発の大きな手がかりとなる可能性がある。

私たちが以前行った miRNA マイクロアレイを用いた網羅的解析によると広範な miRNA が卵巣がんにおいて発現低下しており、そのうちの約 40% はゲノミックコピー数の低下、あるいはエピジェネティックサイレンスによるものと考えられた。これまでの研究でがん抑制遺伝子と強く示唆されている miRNA は *Let-7* である。*Let-7* family は肺がんにて発現低下が認められ、予後とも相関する。私たちの miRNA マイクロアレイの解析により *Let-7* family のひとつである *Let-7i* の発現低下は卵巣がんのプラチナ耐性に深く関わっており、予後とも相関することを発見した。このようにある種の miRNA は卵巣がんの予後や治療法に対するマーカーや治療標的となる可能性が明らかになってきた。

私たちがいくつかの miRNA が卵巣がん患者の予後や悪性度と強く相関していることをすでに報告した。*mir-182* は 30% の卵巣がんにおいて DNA コピー数の増加が認められ、

mature *mir-182* も DNA コピー数に相関して強発現していることから、卵巣がんにおいて潜在的ながん遺伝子としての役割を果たしている可能性が高い。また *mir-146* は卵巣がんの予後と強く相関することがわかっている。また *mir-376* や *mir-432* はがん抑制遺伝子としての役割を持つ可能性がある。これらのことから *mir-182*, *mir-146*, *mir-376* や *mir-432* の卵巣がんにおける役割を明らかにすることは、今後これらの miRNA がリスクファクターや予後因子としてのマーカー、あるいは卵巣がん治療のためのターゲットとして利用するために非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

miRNA が卵巣がんにおいて新規マーカーや治療標的として利用できるかを検討するために、卵巣がんにおいて特定の機能を持つと期待されている *mir-182*, *mir-146*, *mir-376* や *mir-432* などの生物学的な機能を明らかにし、さらにその miRNA が発現を制御しているターゲットとなる遺伝子を同定する。このことによって卵巣がんの進展や悪性化などのメカニズムに miRNA が重要な役割を果たしていることが明らかになる。つまり卵巣がんにおいて miRNA を新規マーカーあるいは治療標的として利用することが理論的にも裏付けることができる。

3. 研究の方法

(1) 卵巣がん細胞株における miRNA, mRNA の発現解析。

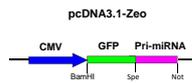
SKOV3, OVCAR3 をはじめとする卵巣がん細胞株より NucleoSpin miRNA (マッハライナール) を用いて small RNA を含む分画で抽出し、アジレントバイオアナライザーにて RNA の integrity を確認した。次に Universal cDNA Synthesis Kit (Exiqon), あるいは ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、SYBR Green master mix, Universal RT (Exiqon) あるいは Absolute QPCR ROX Mix (Thermo Scientific) を使用して、定量的 PCR を行いそれぞれの miRNA, mRNA の発現定量を行った。内部標準として U6snRNA および GAPDH を使用した。

(2) 細胞株への遺伝子導入

遺伝子導入については、pcDNA3.1-Zeo を改変した pcDNA3.1sp を利用した。このベクターの BamHI-SpeI 部位に GFP を挿入し、pcDNA3.1GFPsp を作成した。pcDNA3.1GFPsp の SpeI-NotI 部位に目的の pri-miRNA を挿入したものを遺伝子導入に利用した。卵巣がん細胞株 SKOV3, A2780 などを細胞数 5×10^3 でまき、12 時間後に $0.2 \mu\text{g}$ の pcDNA3.1GFP-mir182 を導入し、その 4 時間後に培地交換を行った。遺伝子導入試薬としては HilyMax (DOJINDO) を使用した。また miRNAmimic

(Applied biosystems) も利用した。細胞培養プレートに終濃度 10nM あるいは 50nM になるように miRNAmimic、miRNAinhibitor を添加したところに卵巣がん細胞株 SKOV3, A2780, TAYA, RMG1 を細胞数 1×10^3 でまいて遺伝子導入を行った。遺伝子導入試薬としては Lipofectamine RNAiMAX Reagent (invitrogen) を使用した。

Fig.1 miRNA expressing construct



(3) 細胞表面抗原測定

細胞表面の抗原の発現については、biolegend あるいは ebioscience の抗体を使用して、FacsCalibur (BD bioscience) を用いて測定した。

(4) 細胞増殖試験

細胞増殖に関しては CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて検討した。

(5) 標的遺伝子探索

miRNA の標的遺伝子予測には TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) を利用した。

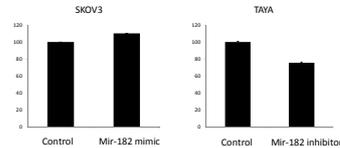
4. 研究成果

(1) mir-182 のもつ細胞増殖性の検討

mir-182 の発現は卵巣がんの予後不良と関連すること、また卵巣がん患者の 30% に DNA コピー数の増加が認められることから、細胞増殖に深く関わる機能をもつと考えた。まず、mir-182 が低発現の SKOV3, OVCAR3 を用いて、pcDNA3.1GFP-mir182 をそれぞれの細胞にトランスフェクションし、一過性の過剰発現系において、MTS 法により、細胞増殖能を検討した。しかし対照にくらべて明らかな差を認めなかった。

続いて安定発現系において確認することが必要と考え、トランスフェクション後に Zeocin 耐性遺伝子をマーカーとしてセクションを行った。SKOV3-GFP-mir182、SKOV3-GFP について細胞増殖能について検討を行ったが、明らかな差を認めなかった。mature miRNA を直接導入するために、mir-182 mimic を SKOV3 にトランスフェクションをしたところ対照群に比較して細胞増殖能が亢進していることがわかった。また逆に mir-182 inhibitor を用いると細胞増殖能が低下することがわかった。以上のことから mir-182 は細胞増殖能を亢進させるような癌原遺伝子候補となると考えられた。

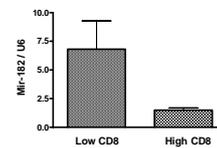
Fig. 2 mir-182 promotes ovarian cancer cells growth



(2) mir-182 と T 細胞浸潤

CD3, CD8T 細胞の浸潤は卵巣がんの予後良好な因子として報告されている (Zhang et al NEJM 2003)。以前行った卵巣がんの miRNA マイクロアレイと発現アレイを再解析し、Mir-182 の発現と CD8 の関連性を調べたところ、逆相関を認めた ($p < 0.001$) 定量的 PCR 法によって、mir-182, CD8 の発現をそれぞれ検討したところ。mir-182 高発現卵巣癌組織において CD8 の発現が少ないことがわかった。このことから mir-182 が何らかの機序により CD8 陽性 T リンパ球の卵巣がん組織への浸潤をブロックし、これが予後に影響している可能性が考えられた。

Fig. 3 High mir-182 expression in low CD8 infiltrated tumors



(3) mir-146b の発現と卵巣癌予後

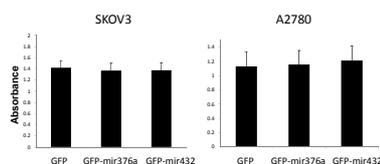
mir-146b の発現も卵巣がんの予後不良と関連していることが以前行った miRNA マイクロアレイより明らかになっている。様々な種類の細胞におけるおおよび mir-146b の発現を検討したところ、mir-182 は卵巣癌腫瘍細胞で過剰発現が認められるが、mir-146b はがん細胞ではなく、マクロファージに高発現していることがわかった。マクロファージの浸潤は卵巣癌の予後不良因子としても知られ、卵巣癌組織における mir-146 はマクロファージの浸潤を反映している可能性が考えられた。

(4) mir-376a 及び mir-432 と細胞増殖能

mir-376a および mir-432 の発現低下は卵巣がん予後増悪と関連することが報告されている。卵巣がん細胞株におけるその発現を検討したが、ほとんどの卵巣がん細胞株において mir-376a および mir-432 の発現は抑制されていた。一方で、DNA メチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によってそ

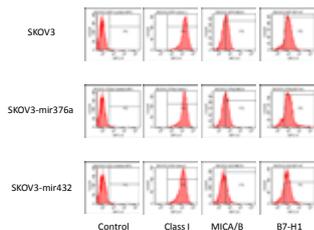
の発現が亢進することからエピジェネティックなサイレンスを受けており、卵巣がんにおけるがん抑制遺伝子候補とも考えられた。pcDNA3.1-GFPsp を用いて mir-376a および mir-432 を安定的に過剰発現する SKOV3 を作成、それぞれの増殖能を MTS 法により検討したが mir-376a および mir-432 による明らかな細胞増殖抑制効果は認めなかった。

Fig. 4 No growth inhibitory effect for mir-376a and mir-432



(5) mir-376a 及び mir-432 と標的遺伝子
mir-376a 及び mir-432 の標的候補遺伝子を TargetScan 及び PicTar を用いて選び出し、それらの Gene Ontology 解析を行った。その結果、免疫反応に関わる分子が mir-376, mir-432 と関わりが強いことがわかった。そこで標的遺伝子候補から免疫にかかわる遺伝子に注目すると MICB, HLA class II 分子がその両方の標的遺伝子候補であることがわかった。それぞれフローサイトメーターにより MICB の発現について確認すると SKOV3 細胞において mir-432 を過剰発現した場合に MICB の発現低下が確認できた。このことから MICB は mir-432 の標的遺伝子となる可能性が示唆された。また卵巣がん細胞株では HLA class II を発現する細胞は確認できなかった。

Fig. 5 mir-432 overexpression downregulates MICA/B expression in ovarian cancer cells



(6) まとめ

mir-182, mir-146b, mir-432 の卵巣がんにおける役割の一部が明らかになり、その生物学的機能と臨床における特徴との関連づける一つの要因となることが明らかになった。このような機能を持つマイクロ RNA は卵巣がんの新規バイオマーカーあるいは治療標的としても有用であると考えられた。

(7) 今後の展望

今回の結果から卵巣癌において新しい機

能性分子群である、マイクロ RNA が臨床マーカーとして利用できる可能性が示された。今後は進行期卵巣がんに対するより良い治療法の開発、治療有効な患者の選別のため、dose-dense Paclitaxel/Carboplatin 腹腔内投与併用療法という新たな投与方法による TC 療法の臨床研究 (DOFMET Protocol #4/UMIN00001713) の卵巣癌組織を用いて網羅的マイクロ RNA 解析を行い、その有用性と安全性に関する予測因子を明らかにする予定である。さらに新規分子標的候補を網羅的マイクロ RNA 解析、網羅的遺伝子発現解析ならびに分子腫瘍学・バイオインフォマティクスの手法を用いて同定を試みる予定である。

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 3 件)

1. Nagao S, Iwasa N, Kurosaki A, Nishikawa T, Ohishi R, Hasegawa K, Goto T, Fujiwara K.

Intravenous/intraperitoneal paclitaxel and intraperitoneal carboplatin in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal carcinoma: a feasibility study.

Int J Gynecol Cancer. 22(1):70-5, 2012
査読あり

2. Goto T, Takano M, Ohishi R, Iwasa N, Shimizu M, Hasegawa K, Nagao S, Fujiwara K.

Single nedaplatin treatment as salvage chemotherapy for platinum/taxane-resistant/refractory epithelial ovarian, tubal and peritoneal cancers. J Obstet Gynaecol Res.

36(4):764-8, 2010
査読あり

3. Kozawa E, Matsuo Y, Hasegawa K, Fujiwara K, Sakurai T, Kimura F.

Spontaneously ruptured endometrioma associated with endometrioid adenocarcinoma: MR findings. Magn Reson Med Sci. 9(4):233-6, 2010
査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 長谷川幸清

シンポジウム：がん薬物療法のバイオマーカー・婦人科がん
第 49 回日本癌治療学会学術集会 2011 年 10 月 27 日名古屋

2. 長谷川幸清

健常人末梢血単核球を用いたカツマキソマブの in vitro における抗腫瘍効果の検討
第50回日本婦人科腫瘍学会 2011年7月23日札幌

3. 長谷川幸清

婦人科がんに対する維持化学療法のエビデンス構築に向けて
第9回山形骨盤外科研究会 2011年1月22日山形

〔図書〕(計1件)

長谷川幸清
婦人科系がん
免疫細胞治療 II、p184-189
幻冬舎
2011年

〔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
<http://www.saitama-med.ac.jp/kokusai/fujinshuyo/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 幸清 (HASEGAWA KOSEI)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：30534193