

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791718

研究課題名(和文)子宮体癌におけるmiRNA治療薬の開発および診断への応用

研究課題名(英文)Application to the development and diagnosis of miRNA therapeutic agent in endometrial cancer

研究代表者

矢野倉 恵 (YANOKURA, MEGUMI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20433732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：microRNAは、癌の発症・進展・薬剤耐性とも大きく関わる事が明らかになっている。我々は、子宮体癌においてエピジェネティックに発現抑制される癌抑制型microRNAとしてmiR-34bを同定し、さらにmiR-34bと抗癌剤の併用による抗腫瘍効果を検討した。3種の子宮体癌細胞株に対しパクリタキセルを作用させた時は、全ての細胞株においてmiR-34b添加時に細胞生存率の低下が認められた。また、HEC-1Bをヌードマウスの皮下に移植後、28日目にはパクリタキセル+miR-34b群は他の群に比し有意に腫瘍径の縮小が認められた(P<0.05)。

研究成果の概要(英文)：[Objective] microRNAs have key roles in the onset, development and drug resistance of cancer. We identified miR-34b as a tumor suppressor-type microRNA with expression that is epigenetically suppressed in endometrial cancer. In this study, the antitumor effect of combined miR-34b and antitumor drugs on endometrial cancer was examined.

[Results] There was no change in cell viability after administration of miR-34b following application of cisplatin or adriamycin to HEC-108, HEC-1B and KLE cells. However, after treatment with paclitaxel, cell viability after administration of miR-34b decreased in all three cell lines. Tumor development occurred 14 days after transplantation of HEC-1B cells in nude mice. Drugs were administered on that day and thereafter. The tumor diameter significantly decreased in mice treated with paclitaxel + miR-34b compared with the results for other treatments (P<0.05). The GFP fluorescence signal also markedly decreased after treatment with paclitaxel + miR-34b.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：miR-34b 子宮体癌 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

2003年のヒトゲノム配列解析の結果、タンパク質をコードする領域は、ゲノムのわずか2%ほどに過ぎないことが明らかになった。そして、これまでは特別な生理活性を持たないと考えられていたノンコーディング RNA (ncRNA) に、遺伝子転写制御などの重要な機能があることも明らかとなった。

ncRNAの中で、特に注目されているのが microRNA (miRNA) である。miRNA は 18~25 塩基長の小さな ncRNA で、標的となる mRNA の 3' UTR にある相補的配列部位に結合し、遺伝子の翻訳抑制または分解をされると考えられている (Lu, J. et al., Nature 435, 834-838 2005)。既にヒトでは 1000 種以上の miRNA が同定されており、発生、分化、増殖、アポトーシスなど様々な生物学的プロセスに関与していることが明らかになっている。

近年、肺癌や乳癌などで miRNA である let-7 の発現低下が報告され、癌抑制的に機能する可能性が示唆された。また、癌抑制型 miRNA は、それを体内に戻すだけで一定の治療効果が得られる可能性が高く、let-7 補充による肺癌治療薬や miR-34b の補充による肝癌治療薬の開発が進められている。

2. 研究の目的

miRNA の発現低下には、染色体欠失とともに DNA メチル化やヒストン脱アセチル化が関与していることが明らかとなっている (Sato, F. et al., FEBS J 278(10), 1598-1609, 2011)。我々はこれまで、子宮体癌と DNA メチル化に関する研究を行ってきた (Banno K*, Yanokura M*. et al. Oncology Rep. 16(6), 1189-1196, 2006, Yanokura M*, Banno K*. et al., Anticancer Res 26(2), 851-856, 2006)。その結果、子宮体癌の約 4 割に何らかの DNA 異常メチル化が認められ、しかも癌化の早期から起こっていることを明らかとした。

そこで今回我々は、子宮体癌において DNA メチル化により発現が抑制されている miRNA を同定し、その癌抑制型遺伝子としての抗腫瘍効果を検証し、子宮体癌治療へ向けた RNA 医薬としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 子宮体癌細胞でエピジェネティック制御を受けている癌抑制型 miRNA の検出

4 種のヒト子宮体癌由来細胞株を用いて脱メチル化剤である 5-aza 処理前後の miRNA 発現変化を、miRNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。5-aza 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。そこで、子宮体癌由来細胞株における 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 を選別する。候補となる癌抑制型 miRNA の 5-aza 添加による発現回復を Taq-man PCR 法で確認する。さらに、in

slico 解析により候補となる癌抑制型 miRNA のターゲット遺伝子を解析し、癌抑制機構を明らかとする。

また、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 の抗腫瘍効果

子宮体癌由来細胞株に対して候補となる癌抑制型 miRNA を導入し、癌細胞に対する効果をコロニー形成能、細胞周期変化、細胞遊走・浸潤能、アポトーシス誘導能を指標に検討する。

さらに、miR-34b を定常的に発現する子宮体癌細胞を作成し、ヌードマウス皮下への正着能の変化を検討する。

(3) 子宮体癌に対する抗癌剤感受性に寄与する miRNA の同定と創薬への応用

本研究で得られた子宮体癌由来細胞株の miRNA 発現データと子宮体癌治療の key drug とされるタキサン製剤やドキシソルピシンの感受性を比較検討し、各種抗癌剤の感受性と相関する miRNA を抽出する。子宮体癌細胞株に候補 miRNA を導入し、その際の抗癌剤感受性の変化を CD-DST 法で解析する。さらに、ヌードマウスを用いて in vivo における miRNA の抗腫瘍効果、並びに抗癌剤との併用による抗腫瘍効果の増強を確認する。

4. 研究成果

(1) 4 種類の子宮体癌細胞株 (HEC-1B、Ishikawa, HHUA, KLE) を用いて、脱メチル化前後で発現が 2 倍以上上昇する microRNA をマイクロアレイを用いて解析した結果、すべての細胞株に共通して発現が上昇した miRNA は miR-34b のみであった。TaqMan PCR を用いて、脱メチル化処理後の miR-34b の発現上昇を確認した。

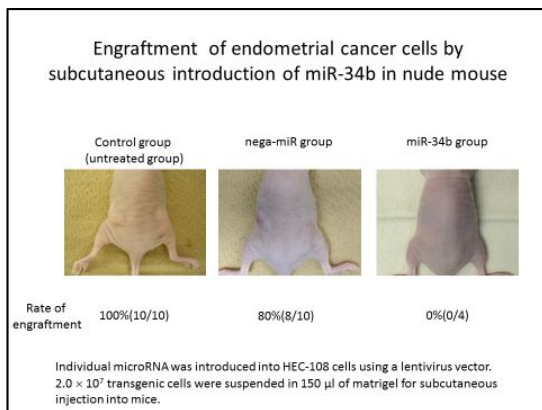
また、インフォームドコンセントを得て、正常子宮内膜 11 例、異型内膜増殖症 6 例、子宮体癌臨床検体 11 例の miR-34b の発現を TaqMan PCR にて解析した結果、正常子宮内膜と異型内膜増殖症では、ほとんど発現量に差は認められないのに対し、子宮体癌臨床検体では正常子宮内膜や異型内膜増殖症に比し、有意に miR-34b の発現が低下していることが明らかとなった ($p < 0.01$)。

この miR-34b は、CpG アイランド内に位置し、p53 により発現が抑制されている癌抑制型 miRNA であった。

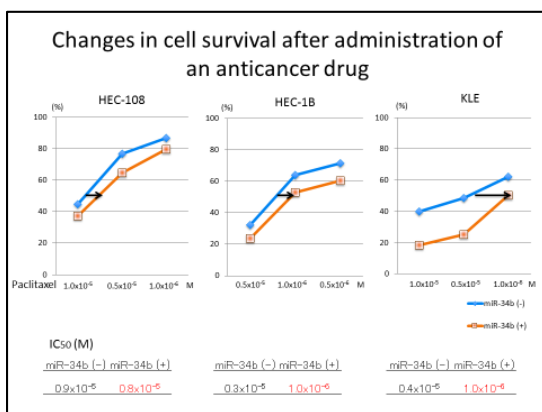
(2) 子宮体癌細胞株 (HEC-108) に miR-34b を一過性に導入し、標的遺伝子の発現抑制および細胞に与える影響を colony formation assay、flow cytometry、セルカルチャーインサートを用いて解析した。その結果、miR-34b の導入により標的遺伝子である

c-Myc や MET の発現がタンパクレベルでコントロールの約 50%まで低下していることが明らかとなった。また、コロニー形成能の低下 ($p < 0.01$)、細胞遊走能の低下 ($p < 0.05$)、細胞浸潤能の低下傾向 ($P < 0.1$)、G1 arrest が認められた。

また、レンチウイルスベクターを用いて miR-34b または control-miR を定常的に発現する子宮体癌細胞株 (HEC-108) を作成した。各細胞 2.0×10^7 コ (control-miR; $n=10$, miR-34b; $n=4$) をヌードマウスの皮下に移植し、1ヶ月後の腫瘍の正着を検討した。その結果、control-miR 群では 80%で腫瘍が正着したのに対し、miR-34b 群では 1例も正着は認められなかった (下図参照)。



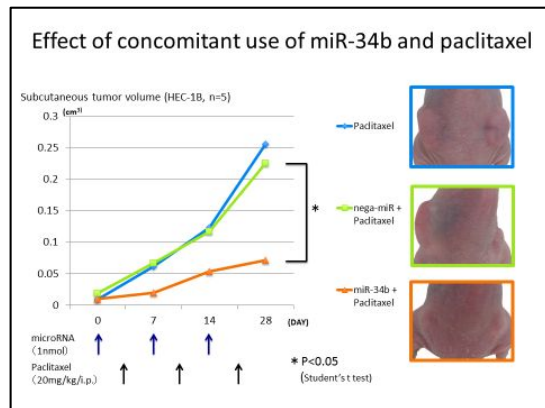
(3) 3種類の子宮体癌細胞株 (HEC-1B、HEC-108、KLE) を用いて miR-34b 導入による各種抗癌剤感受性への影響を MTT assay にて測定した結果、ドキソルビシンとシスプラチンでは miR-34b 導入による感受性への影響は認められなかったが、パクリタキセルでは miR-34b 導入により感受性が増強することが明らかになった (下図参照)。



別の薬剤感受性試験法である CD-DST 法でも同様の結果を得ている。

さらに、パクリタキセルに対し抵抗性を示す HEC-1B をヌードマウスの皮下に移植し腫瘍を形成させた。マウスをパクリタキセル単独群、パクリタキセル + nega-miR 群、パクリタキセル + miR-34b 群の 3 群に分け、腫瘍移

植 2 週間後から各薬剤を投与し、腫瘍径を経時的に計測した。その結果、薬剤投与 4 週後にパクリタキセル + miR-34b 群は他の群に比し有意に腫瘍径の縮小が認められた ($P < 0.05$)。また、摘出した皮下腫瘍を Ki67 にて染色した結果、パクリタキセル + miR-34b 群はパクリタキセル + nega-miR 群に比し、染色陽性細胞数の減少傾向が認められた ($P < 0.1$) (下図参照)。



子宮体癌における miR-34b の機能に関する検討は、国内外を問わずこれまでほとんど行われていない。しかし、miR-34b は子宮体癌と同様にパクリタキセルが保険適応となっている肺癌や乳癌などの関連も報告されており、本研究は子宮体癌のみならず広く癌治療への応用が期待できる。

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 6 件)

Banno K, Iida M, Yanokura M, Irie H, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. Drug repositioning for gynecologic tumors: a new therapeutic strategy for cancer.

Scientific World Journal. 2015; 2015: 341362. doi: 10.1155/2015/341362 査読あり

Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D.

Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics.

J Obstet Gynaecol Res. 2014;40(8):1957-67. doi: 10.1111/jog.12442. 査読あり

Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Nogami Y, Umene K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Aoki D.

Application of microRNA in diagnosis and

treatment of ovarian cancer.
Biomed Res Int. 2014;2014:232817. doi:
10.1155/2014/232817. Review. 査読あり

Banno K, Iida M, Yanokura M, Kisu I,
Iwata T, Tominaga E, Tanaka K, Aoki D.
MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and
tumor suppressor miRs in diagnosis and
treatment.
ScientificWorldJournal. 2014;2014:178075.
doi: 10.1155/2014/178075. Review. 査読
あり

Banno K, Yanokura M, Kisu I, Yamagami W,
Susumu N, Aoki D.
MicroRNAs in endometrial cancer.
Int J Clin Oncol. 2013;18(2):186-92. doi:
10.1007/s10147-013-0526-9. Review. 査読
あり

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.
Biochem Res Int. 2012;2012:738274. doi:
10.1155/2012/738274. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

矢野倉 恵、
「ジェノゲストとメトホルミンの併用はメ
チル化状態を変化させ子宮体癌の増殖を抑制する」、第 36 回日本エンドメトリオーシス
学会、2015 年 1 月 25 日、ハイアットリージ
エンシー（東京都新宿区）

矢野倉 恵
「メトホルミンとディナゲスト併用による
新たな子宮体癌治療の可能性」、第 73 回日本
癌学会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜
（神奈川県横浜市）

矢野倉 恵
「ジェノゲストおよびメトホルミンの併用
による子宮内膜癌細胞に対する増殖抑制効
果の基礎的検討」、第 66 回日本産科婦人科学
会、2014 年 4 月 20 日、東京国際フォーラム
（東京都千代田区）

矢野倉 恵
「子宮体癌における miR-34b の分子標的薬と
しての可能性」、第 12 回日本婦人科がん分子
標的研究会、2013 年 7 月 6 日、東大寺総合文
化センター（奈良県奈良市）

矢野倉 恵
「子宮体癌細胞に対する miR-34b と抗癌剤併
用による抗腫瘍効果の検討」、第 65 回日本産

科婦人科学会、2013 年 5 月 11 日、ロイトン
札幌（北海道札幌市）

矢野倉 恵
「子宮体癌に対する miR-34b とパクリタキセル
西洋による抗腫瘍効果の検討」、第 71 回日
本癌学会、2012 年 9 月 21 日、ロイトン札幌
（北海道札幌市）

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、2012 年 4
月 13 日、神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
矢野倉 恵 (YANOKURA Megumi)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：20433732