

学内グラント 報告書

平成21-23年度 学内グラント終了時報告書

卵巣がんにおける micro RNA の新規マーカー
および分子標的としての有用性の検討

研究代表者 長谷川 幸清（国際医療センター 婦人科腫瘍科）

緒 言

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に対する研究はい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。

私たちはいくつかの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。

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。

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 (マッハライナーゲル) 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 (Fig. 1)。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 μ 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 miRNA mimic, miRNA inhibitor (Applied Biosystems) も利用した。細胞培養プレートに終濃度 10 nM あるいは 50 nM になるように miRNA mimic, miRNA inhibitor 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。

3. 細胞表面抗原の測定

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

遺伝子導入を行ってから 96 時間後に CellTiter 96 Aqueous One Solution CellProliferation Assay (Promega) を用いて検討した。

5. 標的遺伝子探索

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

結 果

1. *mir-182* のもつ細胞増殖能の検討

mir-182 の発現は卵巣がんの予後不良と相関すること、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レクションを行った。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 (Fig. 2)。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。

2. *mir-182* と T 細胞浸潤

CD3, CD8T 細胞の浸潤は卵巣癌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

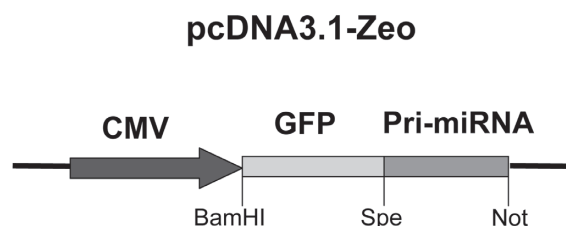


Fig. 1. miRNA expressing construct.

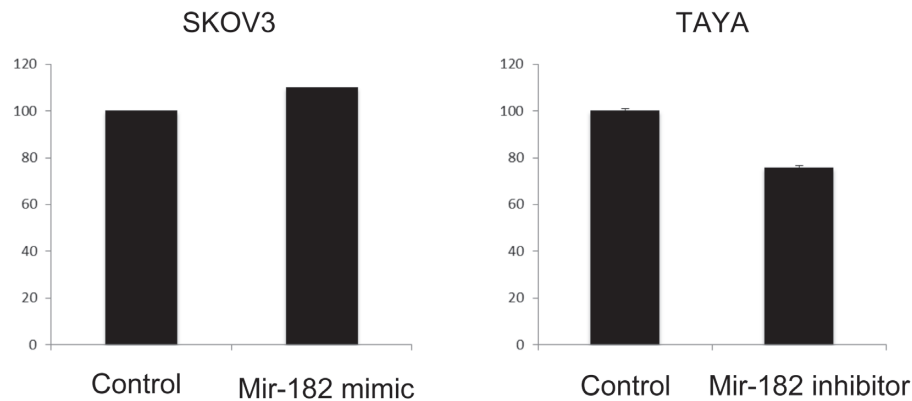


Fig. 2. mir-182 promotes ovarian cancer cells growth.

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 (Fig. 3). 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。

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*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)。

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 (Fig. 5)。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。

考 察

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。

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

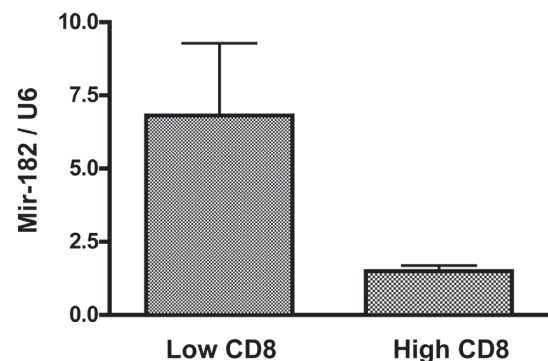


Fig. 3. High mir-182 expression in low CD8 infiltrated tumors.

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/UMIN000001713) 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．

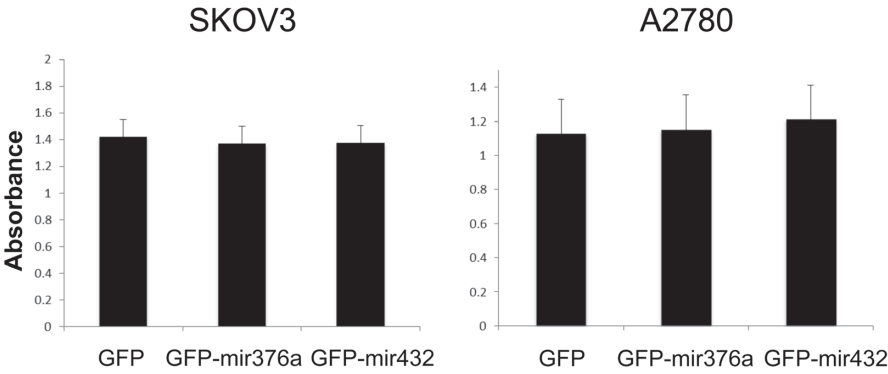


Fig. 4. No growth inhibitory effect for mir-376a and mir-432.

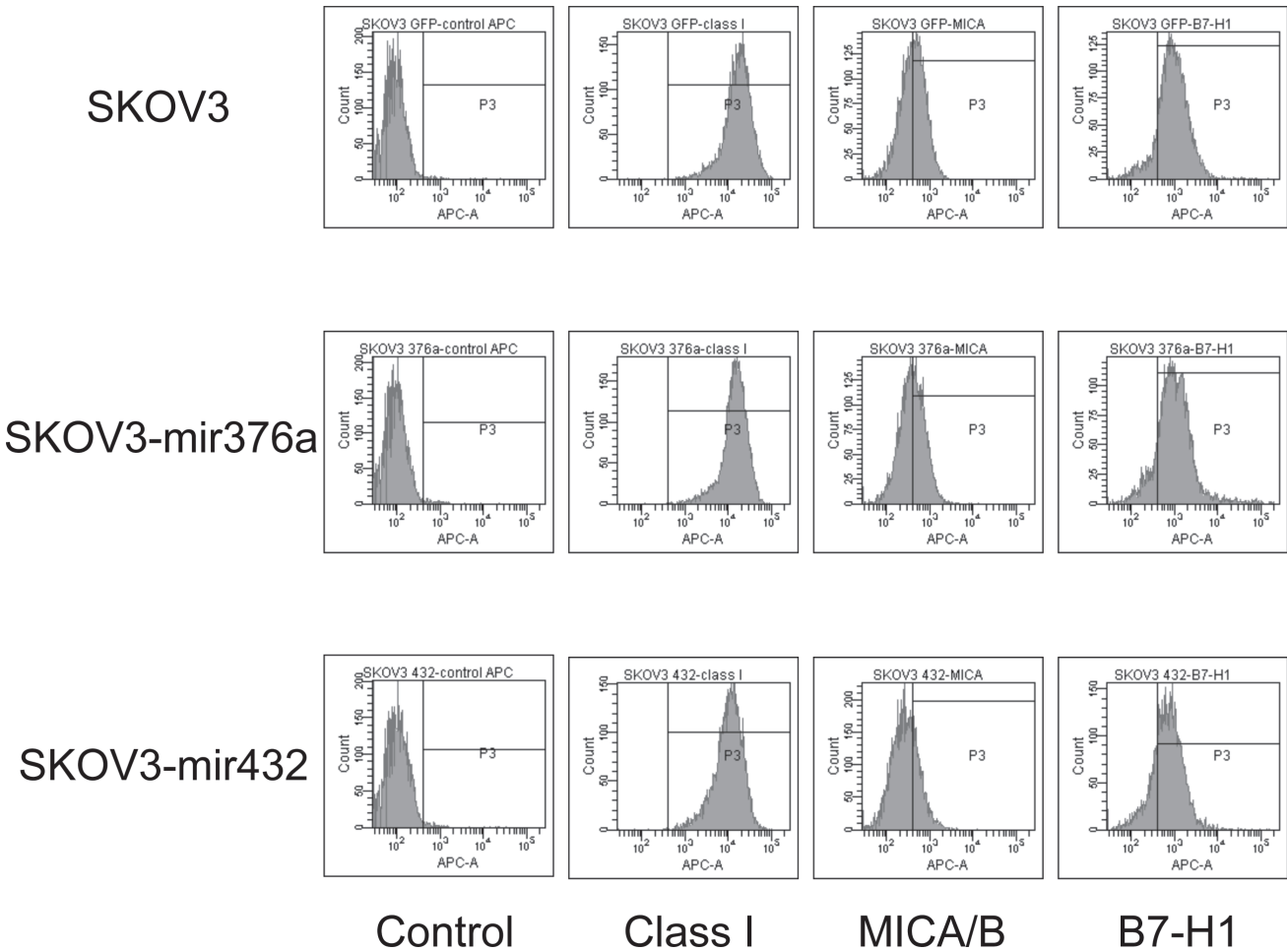


Fig. 5. mir-432 overexpression downregulates MICA/B expression in ovarian cancer cells.

研究成果リスト

雑誌論文

- 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* 2012;22(1):70-5.
- 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* 2010;36(4):764-8.

- 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* 2010;9(4):233-6.

学会発表

- 1) 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回山形骨盤外科学研究会, 2011年1月22日, 山形
- 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. 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