

岩手医科大学審査学位論文の要旨 (博士)

Loss of homeobox D10 gene expression induced by upregulation of microRNA-10b accelerates migration and invasion activities of human epithelial ovarian cancer cells

(microRNA-10b の過剰発現による homeobox D10 遺伝子の発現抑制は卵巣がん細胞における遊走・浸潤能を亢進させる)

(中山育慧, 柴崎晶彦, 阿保重紀子, 三浦史晴, 杉山徹, 増田友之, 前沢千早)

(International Journal of Oncology (43 巻 1 号 63 頁 2013 年))

I. 研究目的

卵巣がんは無症状で経過し、大部分が腹膜播種を有する進行期で発見される。それ故、卵巣がん細胞の浸潤・転移能を抑制する治療薬の開発が望まれている。

近年 non-coding RNA が、がん細胞の運動能や浸潤能の獲得に寄与することが明らかとなってきた。中でも microRNA (miRNA) である miR-10b や長鎖 non-coding RNA である HOTAIR は、転移性乳がんなどで過剰発現しており、その発現量と予後との相関が報告されている。卵巣がんにおいても、複数の miRNA の発現と浸潤能や薬剤感受性との関連が示唆されているが、miR-10b および HOTAIR の発現を検討したものはない。さらに、miR-10b および HOTAIR は、homeobox (HOX) 遺伝子である HOXD10 の発現をエピジェネティックに抑制し、その下流に於いてがん細胞の遊走・浸潤能の獲得に寄与する MMP14 や RHOC を誘導する事も知られている。

本研究では、卵巣がんにおいて miR-10b/HOTAIR の発現を解析し、HOXD10/MMP14/RHOC の発現制御ならびに浸潤、転移能に与える影響を検討した。

II. 研究対象ならび方法

理研バイオリソースセンター（筑波）より購入した卵巣がん培養細胞株 8 株と岩手医科大学産婦人科学講座で経験した卵巣がん臨床検体 68 症例（倫理委員会 受付番号 HG H23-6）を使用した。培養細胞株において miR-10b, HOTAIR, HOXD10, MMP14, RHOC の発現量を real-time PCR 法及び Western blotting 法を解析した。また、pre-miR precursor (Ambion, TX, USA) を用いて miR-10b を一過性発現、または siRNA (Life Technologies, Inc., MD, USA) により HOTAIR を発現抑制させ、遊走・浸潤能の変化を、マトリゲル法を用いて解析した。未治療の卵巣がん 68 症例の原発巣のパラフィンブロックから RNA を抽出し、real-time PCR 法を用いて miR-10b の定量を行った。また同一症例に於いて、自動免疫染色装置を使用し、avidin-biotin 法にて HOXD10, MMP14 タンパクの免疫組織学的染色を行った。染色性の評価は陽性細胞比率と染色強度をスコアリングし、染色陽性症例と陰性症例とに区分した。結果の統計学的解析には Fisher's exact test あるいは Mann-Whitney U test を用いた。

III. 研究結果

1. 卵巣がん培養細胞株 8 株における miR-10 および HOTAIR の発現はバリエーションがあり, HOXD10 の発現量との間には統計学的相関は認められなかった.
2. 卵巣がん培養細胞において miR-10b を一過性発現させたところ, HOXD10 の発現抑制がみられ, 細胞の遊走・浸潤能が亢進した ($p < 0.05$).
3. miR-10b の過剰発現は, 卵巣がん培養細胞で MMP14 および RHOC の発現を誘導した ($p < 0.05$).
4. HOTAIR の発現抑制は, HOXD10 の発現に影響を与えないものの, 1 種類の細胞株で遊走能の低下がみられた ($p < 0.05$).
5. 卵巣がん原発巣での HOXD10 の陽性率は 69% (47/68) で, MMP14 は 36% (25/68) であった.
6. HOXD10 と MMP14 の染色性は逆相関した ($p < 0.05$).
7. HOXD10 陰性群での miR-10b の発現量は, 陽性群に比較して高値であった ($p < 0.05$).

IV. 考 按

今回我々は、卵巣がんの転移に関与するnon-coding RNAとしてmiR-10bとHOTAIRに注目した。HOTAIRとHOXD10の逆相関の関係は卵巣がん細胞においては成り立たなかった。しかし、HOTAIRのノックダウンにより卵巣がん細胞の浸潤・遊走能に影響を及ぼしたことからHOTAIRと卵巣がん細胞の浸潤には何らかの関連がある事が予測された。一方、miR-10bとHOXD10の逆相関関係は培養細胞、臨床検体どちらにおいても成り立った。これらのことからmiR-10bが卵巣がんの転移におけるバイオマーカーとなりうる事が示唆された。

V. 結 語

以上の結果より、卵巣がんにおいて miR-10b の過剰発現は HOXD10 の発現を抑制し、下流の MMP14 および RHOC などの転移関連分子の発現を誘導することで、卵巣がん細胞の遊走・浸潤の獲得に寄与していることが明らかとなった。