OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Paclitaxel exposure downregulates miR-522 expression and its downregulation induces paclitaxel resistance in ovarian cancer cells
Author(s)	宮本, 真由子
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/81920
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	宮本　真由子
論文題名 Title	Paclitaxel exposure downregulates miR-522 expression and its downregulation induces paclitaxel resistance in ovarian cancer cells (PTX投与によりmiR-522の発現が低下し卵巣癌細胞のPTX抵抗性が生じる)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

卵巣癌は我が国において年々増加しており、厚生労働省の統計では2011年の罹患者は9314名であったが、2016年には13338 名と急増している。現病死するものは4784名であり、約3分の1の患者が死亡する“致死的な”疾患である。卵巣癌の治療は手術に続いてパクリタキセル（PTX）とカルボプラチンを中心とした化学療法が行われ、治療により進行癌患者の約8割が一時的な完全寛解が得られるが、その約2/3が再発し、再発を繰り返すうちに抗癌剤に対する耐性を獲得し、最終的には死亡に至る。従って、卵巣癌の治療成績向上のためには抗癌剤に対する耐性獲得メカニズムの解明とその克服が必要である。過去にカルボプラチンを始めとする白金製剤に対する耐性獲得に関する基礎的な報告は複数存在するが、PTX耐性獲得のメカニズムに関する研究は未だ少ない。ヒトでは、ゲノムにコードされる 2500 種類以上のマイクロ RNA（miRNA）が時に重複しながら様々な遺伝子の転写翻訳を抑制している。そして、その半数以上が癌遺伝子の近傍に存在し、発癌、癌の進展に重要な役割を果たしている。そこで、今回卵巣癌におけるPTX耐性獲得のメカニズムの解明を目的とし、その原因をmiRNA に求め、PTXに対する耐性獲得に関わる役割を明らかにすることにした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

卵巣癌細胞株SKOV3ip1とHeyA8に対してPTXを添加し継続培養することにより、PTX耐性卵巣癌細胞株を作成し、各々の親株、耐性株を用いてmiRNA microarray によるmiRNA発現解析を行った。両細胞株で0.5倍以下に発現が低下する5つのmiRNAを抽出した。miRNA RT-PCR 法による確認試験を行い、PTX持続投与により卵巣癌細胞において発現が低下するmiR-522-3pを抽出した。まずmiR-522-3pの卵巣癌臨床における意義を明らかにするべく、Public databaseによる解析を行い、miR-522の発現が低いと無病生存期間および全生存期間が有意に短く、予後因子の1つである可能性が示された。次にmiR-522の役割を検証するため、PTX耐性株にmiR-522を、親株にmiR-522阻害剤を導入し、PTXに対する感受性をMTS assayで評価した。耐性株にmiR-522を強制導入すると、PTXに対するIC 50 値が低下、即ち、PTXに対する感受性が増した。逆に親株にanti-miR-522を強制導入するとIC 50 値は上昇し、PTXに対する感受性が低下した。結果 miR-522-3pにより卵巣癌細胞におけるPTX感受性が制御できる可能性が示唆された。そこで、miR-522-3pの標的遺伝子を検索するため耐性株にcontrol miRNA と miR-522-3p を強制導入した細胞よりRNAを抽出し、細胞周期に焦点を当てて miRNA RT- qPCR array を行った。発現が低下している複数の細胞周期関連遺伝子の中から、過去の報告をもとに、E2F2 を抽出した。E2F2のLuciferase reporter assayを行い、miR-522-3p がE2F2の3’UTRと直接結合し、発現を制御していることを証明した。そこで E2F2 の発現を Western Blot と RT-PCR で確認し、親株に比較して PTX 耐性株において E2F2 の発現は増加していることを確認した。更に耐性株にmiR-522-3p を強制導入することによりE2F2の発現が低下することを確認した。続いて E2F2 の PTX 耐性化に関するメカニズムを明らかにするべく、PTX耐性株にE2F2-siRNAを用いてE2F2 の発現をknockdown した。E2F2をknockdownするとPTX に対するIC 50 値が有意に低下しPTXに対する感受性が増した。即ち、E2F2 の発現がPTX耐性を制御していることが判明した。細胞周期解析とWestern blot法による蛋白発現解析をおこない、E2F2 の発現抑制により、E2F2 の下流である細胞周期のG1/SチェックポイントにおけるRbのリン酸化が抑制され、卵巣癌細胞株においてG1/S arrestが起こることを確認した。

〔総　括(Conclusion)〕

PTXの持続投与により、卵巣癌におけるmiR-522-3p の発現が低下することを証明した。miR-522-3pの発現低下に伴い、PTX耐性株ではE2F2 の発現が増加していた。miR-522-3p の強制導入およびE2F2 のKnockdown によりE2F2の発現が低下し、PTXに対する耐性が部分的に解除された。即ち、卵巣癌におけるPTX耐性の獲得にmiR-522-3pが関与していることを報告し、新たな治療標的としての可能性を提示した。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　宮本　真由子

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	木村　正
副　査	大阪大学教授	野々村祝夫
副　査	大阪大学教授	河原行郎

論文審査の結果の要旨

化学療法耐性の克服は卵巣癌治療において重要な課題であり、卵巣癌の標準治療で使用される薬剤はプラチナ製剤とパクリタキセル（PTX）である。本研究ではPTX耐性を制御するmiRNAを同定し、治療標的としての可能性を検討した。PTX耐性卵巣癌細胞株を作成し、各々の親株、耐性株を用いてmiRNA発現解析を行い、耐性株で発現が低下していたmiR-522に着目した。miR-522がPTX感受性を制御していることをin vitroの実験で確認し、miR-522のtarget geneを検索した。E2F2を抽出し、Luciferase reporter assayで証明した後、miR-522とE2F2がPTX耐性に関与するメカニズムについて検証した。E2F2をknockdownするとPTXに対する感受性の増加が見られ、また細胞周期のG1/Sチェックポイントにおけるリン酸化が抑制され、G1/S arrestが生じた。miR-522をtransfectionすることで同様の結果が確認でき、結果PTX投与によりmiR-522の発現が低下し、卵巣癌細胞のPTX抵抗性が生じると考えられた。

上記の論文は博士（医学）の学位授与に値する。