

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16361

研究課題名(和文) Dcl1k1を標的とした癌幹細胞に対する新しい核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel nucleic acid medicine targeting cancer stem-related marker Dcl1k1

研究代表者

辻村 直人(Tsujimura, Naoto)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10804198

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)：癌幹細胞は、自己複製能・造腫瘍能・多分化能を有し、再発・転移の原因となる。癌幹細胞は極めて少数であるが、私達は癌幹細胞濃縮法を開発し、少数の癌幹細胞をstemnessを維持したまま段階的にスケールアップすることに成功した。本研究では、癌幹細胞特異的に発現するDcl1k1(doublecortin-like kinase 1)を標的とするmicroRNA(miRNA)候補をin silicoでピックアップして、濃縮法で得た癌幹細胞モデル細胞に効果を示すmiRNAをスクリーニングした結果、癌幹細胞に効果を示す新しい核酸医薬としてmiR-1291を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬による癌治療や癌幹細胞標的治療の開発は非常に有望な医学分野であり、世界規模で研究開発競争が展開されている。癌幹細胞を標的とした核酸医薬の開発は癌幹細胞が集団内に僅かしか存在せず、効果を評価することが困難であることから開発が遅れているが、私たちは、独自に開発した癌幹細胞濃縮法を用いて癌幹細胞を死滅させるmiRNAのスクリーニングを行い、消化管幹細胞マーカーの候補遺伝子であるDcl1k1を標的とした癌幹細胞に効果を示す新しい核酸医薬(miR-1291)の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are drug-tolerant and cause distant metastasis and recurrence in various cancers. Thus, CSC-targeted therapy may be an effective curative approach in CRC. In this study, we identified miR-1291 after screening of DCLK-1(doublecortin-like kinase 1) binding ability as a possible nucleic acid medicine against CSCs. MiR-1291 significantly suppressed the proliferation, invasion, migration, and colony formation capability of colon cancer cell lines. MiR-1291 caused altered expression of the cell cycle-regulatory proteins such as CDK inhibitors p21WAF1/CIP1 and p27KIP1, CDK4, CDK6, and cyclin E1, and CDC25A. We found that miR-1291 directly bound the 3' UTR sequence of DCLK-1 and suppressed its expression at both the mRNA and protein levels. Moreover, miR-1291 suppressed CSC markers Bmi1 and CD133. Our data suggest that miR-1291 has an anti-tumor effect by modulating multiple functions, including invasiveness, cell cycle, and cancer stemness.

研究分野：消化器外科、大腸癌

キーワード：microRNA colorectal cancer miR-1291 cancer stemness

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌治療において外科手術、化学療法、放射線治療の進歩に伴い、生存率は向上してきているが、ステージが進んだ場合の予後は依然として不良であり新たな治療法の開発が急務である。癌幹細胞は、自己複製能・造腫瘍能・多分化能を有し、抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示し再発・転移を繰り返す原因となる。CD44, CD133 などの細胞表面マーカーが癌幹細胞の絞り込みに使われるが、この方法では相当数の非癌細胞も混じることが問題となっている。癌幹細胞の治療開発には、癌細胞集団の中で極めて少数である真の癌幹細胞を同定する必要があるが、少数の細胞しか得られないということが治療薬開発の障壁となっている。私達は癌幹細胞濃縮法を開発し、少数の癌幹細胞を stemness を維持したまま段階的にスケールアップすることに成功した。これにより癌幹細胞を用いた各種のアッセイが可能となり、治療剤候補の選出、治療効果の評価などが容易となった。

2. 研究の目的

microRNA (miRNA)は複数の mRNA に結合し、mRNA の翻訳を阻害するため、近年癌治療に役立てようとする研究が盛んに行われている。本研究では、①正常幹細胞には発現せず癌幹細胞特異的に発現する Dclk1(doublecortin-like kinase 1)を標的とする microRNA (miRNA) 候補を in silico でピックアップする、②癌幹細胞濃縮法によって得られた癌幹細胞モデルに効果を示す miRNA をスクリーニングする、③候補 miRNA を用いた検証、を通じて Dclk1 を標的とした癌幹細胞に対する新しい核酸医薬の開発を目的とした。

3. 研究の方法

正常幹細胞には発現せず癌幹細胞特異的に発現する Dclk1 を標的とする microRNA (miRNA) 候補を in silico で選択し、32 種類の候補 miRNA について in vitro で抗腫瘍効果を示すかどうかを検討。有力な miRNA が得られれば、ルシフェラーズレポーターアッセイによる miRNA と Dclk1 との直接的な結合を確認し、この miRNA が細胞増殖、コロニー形成能、浸潤能、運動能、細胞周期と関連蛋白発現、幹細胞性(各種の CSC マーカー発現、スフェア形成能など)に与える影響について検討する。

4. 研究成果

①大腸癌 HCT116 とこれに ODC degran system を導入した癌幹細胞モデル細胞に候補 miRNA を導入し細胞増殖抑制効果を検討した。全部で 32 種類の候補 miRNA の効果を調べたところ、親株のみならず癌幹細胞モデル細胞の増殖をよく抑制した miRNA が 4 種類得られ、この中で大腸癌ではこれまでに報告のない miR-1291 に注目した。miR-1291 は、膵臓癌、食道扁平上皮癌、腎癌細胞において抗腫瘍効果が報告されている。

②HCT116 に miR-1291 を導入すると Dclk1 の蛋白、mRNA 発現が低下した(図1)。

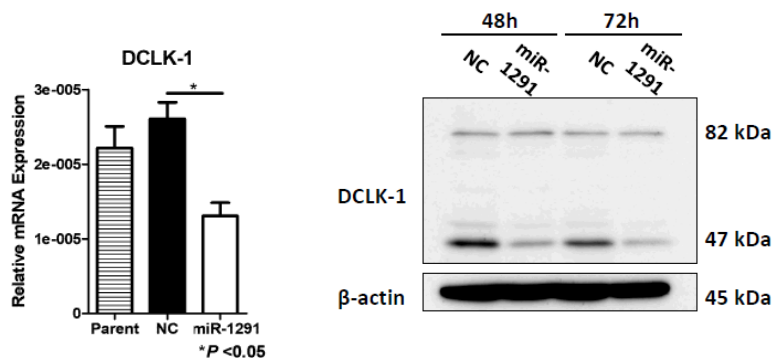


図1. miR-1291 より DCLK-1 mRNA(左)と DCLK-1 蛋白(右)の発現低下がみられた。

更にルシフェラーズレポーターアッセイで Dclk1 mRNA の 3' UTR 領域と miR-1291 の直接結合を確認した(図2)。

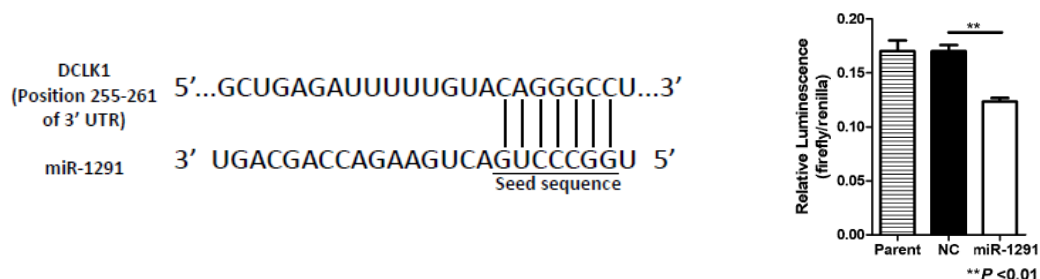


図2. TargetScan による理論的な適合配列(左)とレポーターアッセイによる直接結合が確認された。qRT-PCR で9種類の大腸癌細胞株と非癌細胞株 HEK293 に対して miR-1291 の発現量を測定したところ、DLD1、HT29、HCT116 などの7種類の大腸癌細胞で miRNA の発現が HEK293 より低いことが分かった。Target Scan Human による検索の結果、miR-1291 の標的遺伝子候補として癌関連分子である MUC1 (mucin 1) についても検討したが、miR-1291 導入による発現変化がなく標的ではなかった。③HCT116 に miR-1291 導入し、RT-PCR による CD133, Bmi1 mRNA 発現の低下、および FACS による Cd133 蛋白発現の低下がみられた(図3)。

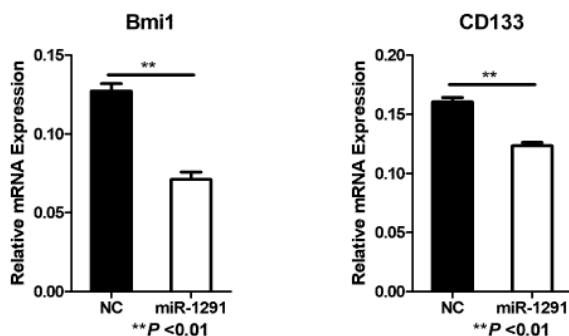


図3. miR-1291 は Bmi1, CD133mRNA の発現を抑制した。

④HCT116, DLD-1, HT29 細胞に miR-negative control (NC)、及び miR-1291 を導入し、48 時間、72 時間後 WST assay によって細胞増殖能を検討すると、miR-NC 群と比較して miR-1291 投与群での細胞増殖が有意に抑制されていることが分かった。

⑤マトリゲル膜を用いた浸潤実験において、miR-NC 群と比較して miR-1291 群において浸潤能が有意に低下した。

⑥DLD-1、HT29 細胞に miR-1291 を導入し、0、24、48、72 時間後に細胞の移動面積を計測して、miR-NC 群と比較すると miR-1291 群において細胞移動が小さく、72 時間後には有意な差がみられた。

⑦miR-1291 導入による細胞周期関連蛋白の発現量について評価した。その結果、DLD-1 では miR-1291 導入により 48 時間後において p21^{WAF1/CIP1}、p27^{KIP1} が増加し(図4)、CDC25A、CDK4 が減少した。HT29 においては p21^{WAF1/CIP1}、p27^{KIP1} が miR-1291 導入から 48 時間後に増加し、Cyclin E1、CDC25B、CDK4/6、P-cdc2 は miR-1291 導入から 72 時間後に遅れて減少した。

⑧miR-1291 の導入により細胞周期の変化を Flow cytometry によって検討した。DLD-1 において miR-1291 投与群では miR-NC 投与群に比べて、12 時間において、G₁期から S 期への移行が抑制されて遅延した。HT29 では明らかな G₁-arrest はみられず、全体として細胞周期の進行の遅延がみられた。

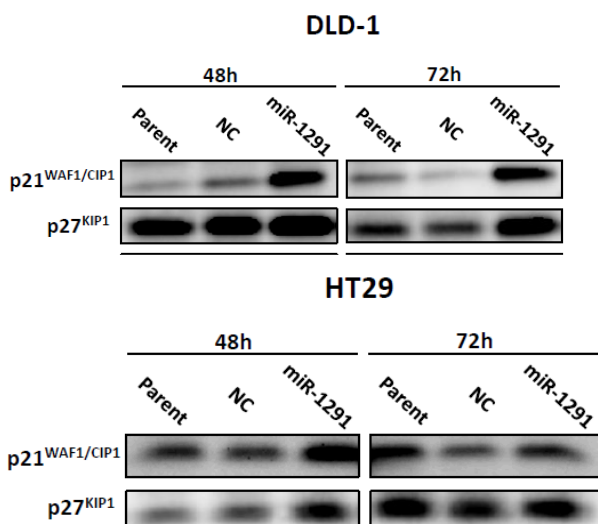


図4. miR-1291 によって CDK 阻害蛋白 p21WAF1/CIP1, p27KIP1 の発現誘導がみられた。

以上のことから、miR-1291 は大腸癌に対する癌幹細胞、非癌幹細胞の両方の治療に適した核酸医薬である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----