

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22849

研究課題名（和文）がん根治が望める老化関連マイクロRNAによるがん幹細胞抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of a cancer stem cell suppressing mechanism with senescence associated microRNA

研究代表者

山本 佑樹（Yamamoto, Yuki）

広島大学・医系科学研究科（薬）・助教

研究者番号：50881265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞増殖が不可逆的に停止する現象である「細胞老化」を誘導するmicroRNA（老化関連microRNA；SA-miRNA）に着目し、以前までの研究で同定していた349種類のSA-miRNAについて研究を行った。本研究では、通常のがん細胞だけでなく、がんの難治化や薬剤耐性に寄与するがん幹細胞をも抑制するSA-miRNAの同定を目的に、口腔扁平上皮がん細胞およびがん幹細胞様細胞を用いて、双方に増殖抑制効果を示すSA-miRNAを網羅的に同定した。また、AGO2 RIP-seq.解析により、がん細胞およびがん幹細胞様細胞それぞれにおいて、miRNAが標的とするmRNAを網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的ながんの薬物療法では、がん幹細胞や抗がん剤耐性がん細胞などの治療抵抗性がん細胞の残存によるがんの再発が問題視されている。本研究では、口腔扁平上皮がんに限定されているものの、がん細胞およびがん幹細胞に増殖抑制効果を示すmiRNAを網羅的に同定することができているため、同定されたmiRNA単剤でがんの根治が期待される。また、miRNAの標的遺伝子探索により、がん細胞とがん幹細胞の治療メカニズムの解明、さらには新たな治療標的の同定に寄与することも期待される。

研究成果の概要（英文）：We focused on the senescence-associated microRNA (SA-miRNA) which inducing "cellular senescence" shown irreversible growth arrest, then we identified 349 SA-miRNAs in previous study. In this study, we try to identify SA-miRNAs which suppress not only cancer progression but also cancer stem like cells. We performed a screening assessed a cancer cell viability using head and neck squamous cell carcinoma cell line and stem cell like cell line, and identified SA-miRNAs shown tumor suppressive effect on both cell lines. Additionally, we performed AGO2 RIP-sequence, and identified target mRNAs of a miRNA in each cancer cell and cancer stem like cells.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：microRNA senescence cancer stem like cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常細胞は、一定回数細胞分裂を繰り返すと不可逆的に増殖を停止し、細胞老化を引き起こす。また、がん遺伝子 Ras などの活性化に代表される過剰なストレスも、細胞老化を誘導することが分かっている。このため、細胞老化は正常細胞が持つ抗腫瘍メカニズムの一つとして考えられている。我々は細胞老化の誘導因子として、microRNA (miRNA) に注目し研究を行なっている。一部の miRNA は細胞老化に伴い発現量が増加することが知られており、このような miRNA は老化関連 miRNA (Senescence-Associated microRNA; SA-miRNA) と呼ばれる。また、一部の SA-miRNA の発現量はがん細胞で減少していることが知られており、我々は SA-miRNA の発現量を補充することで、がん細胞の老化プログラムを再起動させ、腫瘍を抑制しようと考えている。これまでの研究により、miR-22 を SA-miRNA として同定しており、乳がん・子宮頸がん細胞に抗腫瘍効果を示すことを報告している。上記の知見を基に、我々は miR-22 よりも強力に細胞老化を誘導する SA-miRNA を研究開始時までに網羅的に同定している。さらに、それら SA-miRNA のがん細胞抑制効果についても評価し、様々ながん種のがん細胞株に増殖抑制効果を示した SA-miRNA も同定している。またその内の 1 つが、がん幹細胞や治療抵抗性がん細胞にも増殖抑制効果を示すことを見出している。

2. 研究の目的

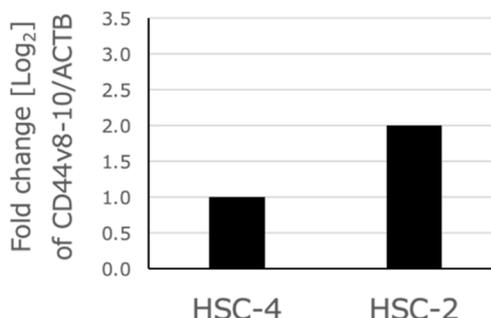
近年、腫瘍組織内にはゲノムの異なる複数のサブクローンが存在することが明らかとなった。これは腫瘍内不均一性と呼ばれ、がんの治療抵抗性に深く関与していると考えられている。中でもがん幹細胞や治療抵抗性がん細胞の出現による再発は、がん治療の大きな課題であり、通常のがん細胞だけでなく、がん幹細胞や治療抵抗性がん細胞も標的とする薬剤・治療でなければ、がんの根治は望めない。しかし現在、がん幹細胞や治療抵抗性がん細胞に対し有効な薬剤は少なく、がん幹細胞などの再発の可能性が高いがん細胞に対し増殖抑制効果を示す抗がん剤を開発することは非常に意義がある。本研究では、がん幹細胞や治療抵抗性がん細胞に対しても増殖抑制効果を示す SA-miRNA を、がん根治可能な新規抗がん核酸医薬として応用していくことを最終目的とし、SA-miRNA ががん幹細胞およびがん細胞の増殖を抑制するメカニズムを明らかとすることを試みた。

3. 研究の方法

- (1) 口腔扁平上皮がん細胞株を対象に、がん幹細胞マーカーとしても知られる CD44 バリエーションの発現量を比較し、幹細胞性の高い細胞株と低い細胞株を同定した。
- (2) 同定された細胞株について、これまで我々が同定していた SA-miRNA に対して、増殖抑制効果を評価するスクリーニングを行い、いずれの細胞株についても増殖抑制効果を示す SA-miRNA を網羅的に同定した。
- (3) 同定された SA-miRNA について、実際に増殖抑制効果を示すかどうかバリデーションを行った。
- (4) 同定された SA-miRNA の増殖抑制メカニズムを明らかとするため、がん細胞および幹細胞様がん細胞を用いて、AGO2 RIP シークエンス解析を行った。

4. 研究成果

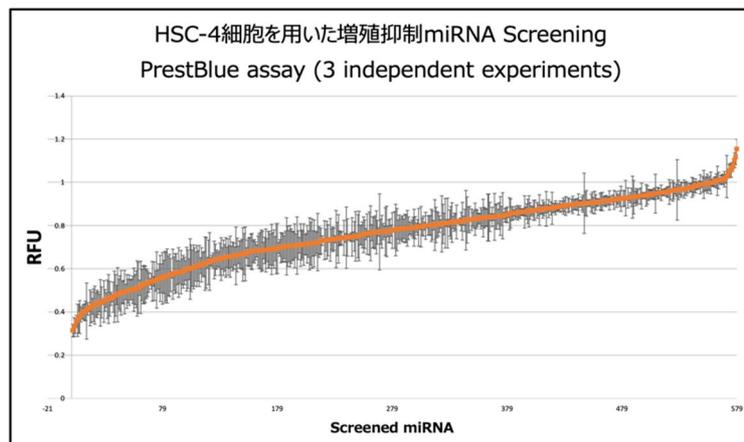
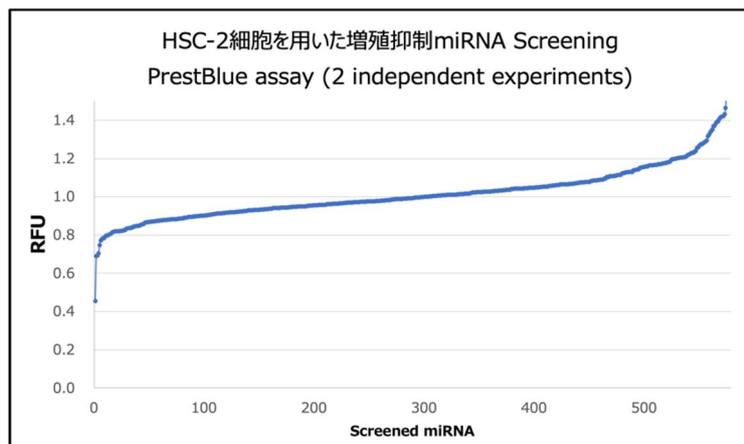
- (1) miRNA を核酸医薬として応用する際の問題点として、標的がん細胞への特異的なデリバリーがある。我々は、これまでに局所投与型のドラッグデリバリーシステムを用いて、SA-miRNA を核酸医薬へと応用することを試みている。本研究においても、同定された SA-miRNA を新規抗がん剤として応用することを最終目標とするため、局所投与が比較的可能な口腔扁平上皮がんに着目し、かつ既報告にて、がん幹細胞様細胞としても使用されたことある口腔扁平上



皮がん細胞株である HSC-2 細胞および通常の口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-4 細胞を使用した。まず、実際に HSC-4 細胞と比較して、HSC-2 細胞の方ががん幹細胞性が高いかどうかを検討するため、がん幹細胞マーカーの一つである CD44 バリエーションの発現量を qRT-PCR により解析を行った。その結果、HSC-4 と比較して HSC-2 細胞において、CD44 バリエーション発現量が高いことが明らかとなった。つまり、HSC-2 細胞は HSC-4 細胞より

も幹細胞性が強いことが示唆された。以降、HSC-4 を通常のがん細胞として、HSC-2 をがん幹細胞様細胞として用いることとした。

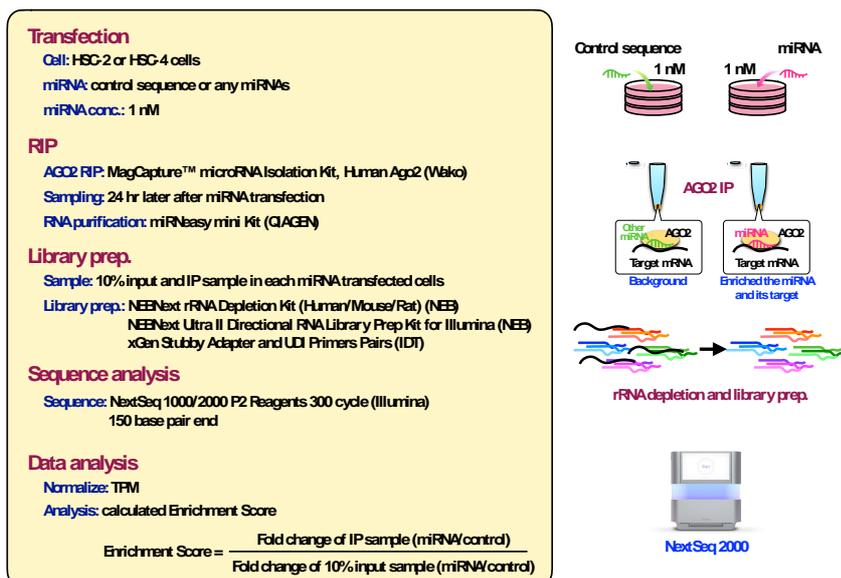
- (2) 上述の通り、以前までの研究成果によって細胞老化の表現型を指標としたスクリーニングを行い、miR-22 よりも強力に細胞老化を誘導する SA-miRNA を 349 種類同定している。本研究では、同定された 349 種類の SA-miRNA のがん細胞およびがん幹細胞様細胞に対する増殖抑制効果を検討するため、HSC-2 および HSC-4 用いて、エンドポイントにおける細胞生存率を指標としたスクリーニングを行った。その結果、それぞれの細胞について、増殖抑制効果を示す SA-miRNA を同定することができた。以上の結果から、がん幹細胞様細胞およびがん細胞双方に増殖抑制効果を示す SA-miRNA が同定された。



- (3) スクリーニングにより得られた SA-miRNA が、実際に細胞増殖の抑制に寄与しているかどうかを検討するため、同定された SA-miRNA の一部について、HSC-2 および HSC-4 細胞にトランスフェクションし、細胞計数を行うことで細胞増殖を評価した。その結果、同定された SA-miRNA によって HSC-2 および HSC-4 細胞の細胞増殖能が実際に抑制されることが明らかとなった。

- (4) 得られた SA-miRNA の増殖抑制メカニズムについて明らかとするため、標的遺伝子の解析を行った。miRNA の標的 mRNA への結合には、Argonaute タンパク質が重要であることがわかっている。そこで、miRNA を過剰発現させた細胞に対して、Argonaute タンパク質の1つである AGO2 に対する抗体を用いた RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) を行い、目的の miRNA が結合した RNA がエンリッチした RNA サンプルを得た。得られた RNA を用いて、次世代シーケンサー解析を行うことで、標的 mRNA を網羅的に同定した。コントロール配列導入細胞および miRNA 導入細胞における 10%インプット RNA および RIP 後 RNA のリード数から、エンリッチメントスコアを算出し、コントロール導入細胞と比較してエンリッチした RNA を、その miRNA の候補標的遺伝子とした。

AGO2 RIP sequence analysis



In silico 解析により、miRNA が結合しうる mRNA を配列ベースで予測し、標的遺伝子候補を絞り込んだ。以上の結果から本研究では、2 種類の miRNA について、HSC-2 および HSC-4 それぞれの細胞において、標的遺伝子候補を網羅的に同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Yamamoto, Ayaka Nishiura, Kimiyoshi Yano, Noriaki Matsuda, Ryou-u Takahashi, Yasuhiro Tsutani, Morihito Okada, Hidetoshi Tahara
2. 発表標題 Preclinical evaluation of a novel senescence-associated miRNA miR-3140-3p for malignant pleural mesothelioma
3. 学会等名 AACR（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Yamamoto, Kimiyoshi Yano, Noriaki Matsuda, Ryou-u Takahashi, Morihito Okada, Hidetoshi Tahara
2. 発表標題 A treatment of malignant pleural mesothelioma using a novel senescence-associated miRNA miR-3140-3p
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Yamamoto, Ayaka Nishiura, Kimiyoshi Yano, Saori Fukunaga, Ryou-u Takahashi, Morihito Okada, Hidetoshi Tahara
2. 発表標題 The development of a novel approach for malignant pleural mesothelioma using a novel senescence associated microRNA
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------