

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659285

研究課題名(和文) 癌形質を消失させるマイクロRNA群の薬物応用への試み

研究課題名(英文) Therapeutic application of miRNAs converting malignant properties to non-malignant level

研究代表者

三浦 典正 (MIURA, Norimasa)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：30325005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞を形態上は正常形質に回帰させるヒトマイクロRNAを発見した。それは未分化型肝癌細胞の肝組織形成、奇形腫形成で発見し、そのメカニズム解析を本検討で行った。脱分化誘導の実態を、導入後3日目、5日目、7日目と経時的にそのDNAメチル化レベル及びRNAメチル化レベルを検討し、脱メチル化誘導が原因が重要な原因の1つと考えられた。メタボローム解析では、5日目にsilencingされ、その2日後にiPS細胞レベルの別の種類の細胞になることが分かった。520dの標的遺伝子の検討では、ELAVL2をはじめとする計3種類をルシフェラーゼアッセイで同定し得た。癌細胞は正常細胞になり得る初めての報告である。

研究成果の概要(英文)：To identify the factors inducing stemness by miR-520d-5p, we investigated the effects of lentivirally inducing miR-520d expression in 293FT and HLF cells in vitro. Subsequently, we evaluated tumor formation in a xenograft model. Transformed HLF cells were Oct4 and Nanog positive within 24 h, showed p53 upregulation and hTERT downregulation, and mostly lost their migration abilities. After lentiviral infection, the cells were intraperitoneally injected into mice, resulting in benign teratomas (6%), the absence of tumors (87%) or differentiation into benign liver tissues (7%) at the injection site after 1 month. We are the first to demonstrate the loss of malignant properties in cancer cells in vivo through the expression of a single microRNA (miRNA). This miRNA successfully converted 293FT and hepatoma cells to hiPSC-like cells. The regulation of malignancy by miR-520d appears to be through the conversion of cancer cells to normal stem cells, maintaining p53 upregulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：miRNA 癌 幹細胞 脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

我々がクローニングしたマイクロ RNA 前駆遺伝子 (RGM249) の機能解析を行い、

未分化型の悪性度の高い、治療抵抗性の癌細胞において発現制御されていること (Miura N, et al., BMC Mol. Biol., 2009)

RGM249 の抑制やこの遺伝子から作り出されるマイクロ RNA の抑制により、未分化型癌細胞の増殖を抑制できること、

RGM249 が抑制されると高発現する 8 個のマイクロ RNA のうち、hsa-miR-520d-5p に注目し、このマイクロ RNA 発現ベクターで未分化型癌細胞 (肝癌、膵癌、悪性腫瘍、脳腫瘍、甲状腺腫瘍など) に導入すると、悪性細胞形質を喪失させるだけでなく、Oct4、Nanog、P53 が強発現する特徴的な次世代型多能性幹細胞へ形質転換させ、*in vivo* で奇形腫や発生由来正常組織を形成することを見出したことを受け、未分化型癌細胞を形態的に正常化または良性化させ得ることを確認した。

2. 研究の目的

未分化型肝癌細胞の悪性形質喪失の原因、メカニズム解明、正常細胞への影響の有無を検討すること、マイクロ RNA (520d) 導入細胞における標的遺伝子の解明をルシフェラーゼアッセイで行い、導入細胞におけるメチル化関連遺伝子や多能性幹細胞マーカー、がん抑制遺伝子関連マーカー、癌幹細胞マーカー、細胞特異的マーカーの変化に影響を及ぼすメカニズムを推定した。P53, Oct4, Nanog の高発現、AICDA の低発現が、520d の特徴的な誘導結果であった。導入後 3 日目、5 日目、7 日目、多能性マーカーでソーティングし奇形腫や肝組織を作製し得た細胞群 R1、R2、また iPSC でメタボローム解析、マイクロ RNA アレ

イ、DNA メチレーションレベルを検討した。線維芽細胞、血管内皮細胞など正常細胞へは腫瘍形成性、脱分化誘導の有無を検討した。

3. 研究の方法

マイクロ RNA (520d) 導入細胞における標的遺伝子の解明をルシフェラーゼアッセイで行い、導入細胞におけるメチル化関連遺伝子や多能性幹細胞マーカー、がん抑制遺伝子関連マーカー、癌幹細胞マーカー、細胞特異的マーカーの変化に影響を及ぼすメカニズムを推定した。P53, Oct4, Nanog の高発現、AICDA の低発現が、520d の特徴的な誘導結果であった。導入後 3 日目、5 日目、7 日目、多能性マーカーでソーティングし奇形腫や肝組織を作製し得た細胞群 R1、R2、また iPSC でメタボローム解析、マイクロ RNA アレイ、DNA メチレーションレベルを検討した。線維芽細胞、血管内皮細胞など正常細胞へは腫瘍形成性、脱分化誘導の有無を検討した。

4. 研究成果

脱分化誘導による悪性形質喪失の主因は、脱メチル化誘導によること、正常細胞へは悪性形質を誘導しないため、安全であることを証明し得た。まだ未解明なメカニズムがあると思われる、次世代シーケンスによる遺伝子変異、染色体解析、ヒストン修飾タンパクの影響など行う必要があることを再確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Miura N, Shimizu M, Shinoda W, Tsuno S, Sato R, Wang X, Jo J, Tabata Y, Hasegawa J. Human RGM249-derived small RNAs may regulate tumor malignancy. Nucleic Acid Ther. 23(5): 332-343, 2013. (査読有)
2. Tsuno S, Wang X, Shomori K, Hasegawa J, Miura N. Hsa-miR-520d

induces hepatoma cells to form normal liver tissues via a stemness-mediated process. Scientific Reports, 4: 3852, 2014. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. 津野智史、王心慧、篠田和香、長谷川純一、**三浦典正**「microRNA 単独導入による癌の幹性誘導治療の基礎技術」第 32 回日本臨床薬理学会 12 月 1 日 浜松
2. Tsuno S, Shomori K, Hasegawa J, **Miura N**. Hsa-mir-520d Induces Hepatoma Cells to Form Normal Liver Tissues via A Stemness-mediated Process. 10th World Congress of IHPBA July 2nd, 2012 Paris.
3. **Miura N**, Tsuno S, Shomori K, Hasegawa J. Hsa-miR-520d induces hepatoma cells to form teratomas or normal liver tissues via a stemness-mediated process *in vivo*. 71th JCA 2012 September 19, 2012 Sapporo.
4. 津野智史、王心慧、篠田和香、銭衛斌、長谷川純一、**三浦典正**. microRNA 単独導入による癌の幹性誘導に関するメタボローム解析. 日本臨床薬理学会 Nov 29, 2012 沖縄.
5. Tsuno S, **Miura N**, Hasegawa J. Reversion of undifferentiated hepatoma cells to pluripotent cells by hsa-miR-520d and a candidate of targeted genes. 第72回日本癌学会学術集会 Oct. 5, 2013 横浜
6. **三浦典正**、津野智史、長谷川純一. 脱分化誘導作用を有するマイクロRNA のトランスレーショナル癌研究. 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会 Dec. 5, 2013 東京
7. 津野智史、銭衛斌、長谷川純一、**三浦典正**. microRNA 単独導入による癌の幹性誘導に関するミトコンドリア機能解析. 第34回日本臨床薬理学会学術総会 Dec. 4, 2013 東京.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

名称: 新規の脱分化誘導方法を用いた多能性幹細胞化

発明者: 三浦典正

権利者: 鳥取大学

種類: 特願

番号: 2012-278330

出願年月日: 2012.12.20

国内外の別: 国内

名称: 細胞のアンチエイジングに関連する生体分子群

発明者: 三浦典正

権利者: 鳥取大学

種類: 特願

番号: 2013-177763

出願年月日: 2013.8.29

国内外の別: 国内

名称: 新規の脱分化誘導方法を用いた多能性幹細胞化

発明者: 三浦典正

権利者: 鳥取大学

種類: PCT

番号: PCT/JP2013/82399

出願年月日: 2013.12.2

国内外の別: 国外

取得状況(計 1 件)

名称: miRNA 導入による新規 hiPSC 作製法

発明者: 三浦典正

権利者: 鳥取大学

種類: 特願

番号: 2011-530189

取得年月日: 2012.8.18

国内外の別: PCT 経由日本 早期査定

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

三浦典正 (MIURA Norimasa)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：30325005

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：