

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861186

研究課題名(和文) microRNAによる癌リプログラミング治療の臨床応用

研究課題名(英文) MicroRNAs Induce Epigenetic Reprogramming and Suppress Malignant Phenotypes of Human Colon Cancer Cells

研究代表者

小川 久貴(Ogawa, Hisataka)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20621022

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)：大腸癌細胞株HT29にmiRNA302s, 369sを過剰発現させるとES細胞様の細胞塊を形成し、増殖能低下、抗癌剤感受性改善を認めた。また遺伝子発現解析では癌関連遺伝子CDK2, CMYCの発現低下、分化関連遺伝子MUC2, VILLINの発現変化を認めた。これらはエピゲノム関連遺伝子AOF1, MECP1/2の発現低下を伴う、グローバルな脱メチル化を認めた。IN VIVO実験ではこれらのmiRNAs投与群では抗腫瘍増殖効果を認め、細胞実験と同様の遺伝子発現変化を認め、ヒストン修飾の変化を伴っていた。miRNA302s, 369sによるエピゲノム変化を伴う“癌リプログラミング”の有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：Although cancer is a genetic disease, epigenetic alterations are involved in its initiation and progression. Previous studies have shown that reprogramming of colon cancer cells using Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc reduces cancer malignancy. Therefore, cancer reprogramming may be a useful treatment for chemo- or radiotherapy-resistant cancer cells. It was also reported that the introduction of miRNA302s and miR369-3p or -5p resulted in the induction of cellular reprogramming. The reprogramming process resulted in inhibition of cell proliferation and stimulation of the MET phenotype in colon cancer cells. Importantly, the introduction resulted in epigenetic change of DNA demethylation and histone modification. Furthermore, in vivo administration of these miRNAs elicited apoptosis, which involves the mitochondrial Bcl2 protein family. The present study shows that the introduction of these miRNAs could induce cellular reprogramming and modulate malignant phenotypes of human colon cancer cell.

研究分野：消化器外科

キーワード：miRNA302s, 369s

1. 研究開始当初の背景

Yamanaka らにより、2006 年にマウス、2007 年にはヒト正常皮膚線維芽細胞より 4 種類の多分化能を規定する転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, C-Myc) をレトロウイルスベクターで導入することで人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が作成可能であることが報告された (Takahashi and Yamanaka et al. Cell 2006, 2007)。正常分化細胞が胚葉を超えて分化可能となる iPS 細胞の出現が再生医療の分野に与えたインパクトは計り知れない。本来細胞は同一のゲノム情報を保持しているが、iPS 細胞作成過程：リプログラミング (初期化ともいう) の過程を経ることで、細胞のエピゲノムが変化し、その phenotype は変化する。当科では 2009 年より Yamanaka らと同様の手法でヒト癌細胞を初期化することで、癌細胞が本来有する増殖能、浸潤能、腫瘍形成能といった悪性を低下し、一方で他胚葉への分化傾向も示すことを報告した (Miyoshi et al. PNAS 2009)。細胞の悪性度を変化させ得る、新規癌治療法の可能性を我々は考慮し、いわゆる“癌リプログラミング療法”の研究を進めることとした。しかしウイルスベクターを用いるリプログラミングは genome integration による二次的癌化のリスクを排除できない。そこで我々はエピゲノム構造の 1 つである miRNA (約 20 塩基ほどの小核酸であり、主に蛋白翻訳抑制を作用とする) に注目し、マウス ES 細胞、iPS 細胞と脂肪幹細胞での miRNA アレイから、ES 細胞、iPS 細胞でのみ高発現している 3 種の miRNA を同定し miRNAs のトランスフェクションによるヒト脂肪幹細胞や皮膚線維芽細胞からのリプログラミングに成功した (Miyoshi et al. Cell stem cell 2009)。

2. 研究の目的

miRNAs による癌リプログラミングにより、悪性度を低下させるか検討すること。

3. 研究の方法

用いる大腸癌細胞株の選定には、皮下腫瘍における良好な miRNA 分布を期待し、豊富な皮下腫瘍血管を有する細胞株を用いた。また用いる miRNA は先行実験の結果および大腸癌細胞株 (HT29, DLD-1, SW480 など) の内因性 miRNA の発現を確認し、miRNA トランスフェクションプロトコルを確立し、リプログラミングにより作成培養された細胞塊の細胞実験 (増殖アッセイ、抗癌剤感受性アッセイ、アルカリフォスファターゼ (AP) 活性アッセイ、細胞蛍光免疫染色、qRT-PCR、エピゲノム解析) を施行する。用いた miRNA の anti-onco miR としての作用を細胞実験 (増殖アッセイ、細胞周期アッセイ、細胞蛍光免疫染色、qRT-PCR、Western Blotting、ルシフェラーゼアッセイ、浸潤アッセイ、アポトーシスアッセイ) を施行する。免疫不全マウスを用いた皮下腫瘍モデルにおける実験は miRNA 尾静脈からの全身投与による癌リプログラミング療法の有効性を検討する。具体的な in vivo 実験としては皮下腫瘍増殖曲線、皮下腫瘍の遺伝子発現解析、組織学的検討 (HE 染色、化学免疫染色、Alcian Blue 染色)、エピゲノム解析を施行する。投与した miRNA の生体内分布は qRT-PCR で確認する。副作用に関してはマウス体重、血液検査、RES 系の HE 染色で施行する。また miRNA delivery system としては当科で開発している炭酸アパタイト (Kure et al, PloS one 2015) を in vitro, in vivo で用いる。

4. 研究成果

皮下腫瘍における腫瘍血管の anti-CD31 抗体 (血管内皮細胞) を用いた検討の結果、HT29 が最も多血性の腫瘍であった。またヒト ES 細胞、iPS 細胞と類似した miRNA 発現パターンを示す NTERA2 (ヒト teratocarcinoma 株) と比較し (ref)、HT29 は

miR200c が高発現していた。以上より HT29 に対する miR302s 単独および miR302s369s 併用補充による癌リプログラミングの有用性を検討することとした。miRNA トランスフェクションプロトコールでの約 4 週間の培養の結果、HT29 はヒト ES 細胞に形態の類似した細胞塊へと形態変化を認め、多能性マーカーである AP 染色および OCT3/4,SOX2,NANOG の発現を認めた(A)。これらの細胞塊は qRT-PCR 法でも miR302s,OCT3/4,SOX2 mRNA の発現を確認し、自然分化アッセイにより腸型形質マーカーである MUC2,VILLIN の発現低下を認めた。細胞機能解析において、これらの細胞塊は親株と比較して、細胞増殖速度は低下し、5-FU 抗癌剤感受性も改善していた。癌の悪性度に関与する癌関連遺伝子である C-MYC,CDK2 発現の低下および間葉上皮転換を認めたため、癌リプログラミングによるエピゲノム変化を検索したところ、DNA メチル化関連遺伝子の AOF1,MECP1/2 の発現低下およびグローバルな脱メチル化および癌抑制遺伝子 (APC,BRCA1,2,MSH2,EXT1,TSC1,PTEN,WT1,RB1,NF2)の脱メチル化を認めた (B)。また癌リプログラミングの過程で間葉上皮転換、細胞死の誘導、増殖抑制効果を認めた。これらは癌治療の観点から非常に重要な点であり、miR302s、miR369s の anti-oncomiR としての作用を検討した。miR302s,miR369s により細胞形態が spindle-shape から round shape へと移行し qRT-PCR 法、WB 法、細胞免疫染色、浸潤アッセイによりこれらの miRNA は単独でも間葉上皮転換を誘導することがわかった。細胞死に関して、Annexin-PI アポトーシスアッセイおよび WB 法により、miR302s の MCL-1 翻訳抑制によるアポトーシス誘導能を示した。細胞周期解析により miR302s は CDK2,CDK4,CyckinD1 翻

訳抑制による G1-S arrest を引き起こすことがわかった。以上の細胞実験により miR302s は単独もしくは miR369s 併用により癌リプログラミング、間葉上皮転換、アポトーシス、G1-S arrest と抗癌細胞作用を有することがわかり、皮下腫瘍モデルでの実験に移行した。

mi302s 単独、miR302s369s 併用両者ともに miR 投与群は negative control miR 群、生食投与群と比較して有意差を持って腫瘍増殖の抑制を認めた。組織学的な検索で、HE 染色で局所的な核の変性した領域を認め、同部位は TUNEL 染色によりアポトーシスであることを確認した。また免疫染色により Ki-67 index 低下を認め、また細胞実験と同様に C-MYC,CDK2 発現の低下、CDH1 発現の上昇と間葉上皮転換を認めた。腺癌組織以外の組織形成は認めなかった (teratoma,teratocarcinoma への transformation を認めず)が特記すべきことに OCT3/4,SOX2 の発現上昇かつ MUC2,VILLIN 発現低下を認めた。さらには腺癌組織を示す指標である Alcian blue 染色による粘液産生の低下、CK20 発現の低下を認めた。エピゲノム解析においては主要組織においても AOF1,MECP1/2 低下やこれらによるグローバルな H3K4 メチル化の増加を認めた。また投与した miRNA は皮下腫瘍に良好に分布しており、HE 染色でみた RES 系への副作用は特に認めず、血液検査上、マウスの体重推移でも特に副作用は認めなかった。これらの知見により miRNA による癌リプログラミングはエピゲノム変化を根底とした、癌の悪性度を低下させる新規癌治療法になりうる可能性を認めた (Ogawa et al. PloS one 2015)。

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 1 件)

MicroRNAs induced epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells
Ogawa H, Xin W, Kawamoto K, Nishida N, Konno M, Koseki J, Matsui H, Noguchi K, Gotoh N, Yamamoto T, Nishiyama N, Nagano H, Yamamoto H, Obika S, Kataoka K, Doki Y, Mori M, Ishii H. PLOS ONE 2015 accepted.

〔学会発表〕(計 4 件)

1、PLS-7-2 新規癌治療法としての癌リプログラミング療法(PLS-7 プレナリーセッション(7)「大腸・消化管」
小川久貴 他、第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年 4 月 3 日 京都

2、miRNA による癌リプログラミング療法
小川久貴 他、第 115 回外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 18 日、名古屋

3、An Innovative MicroRNA Mediated Cancer Reprogramming Therapy
Hisataka Ogawa et al、第 72 回日本癌学会学術集会、横浜

4、MicroRNA-mediated cancer reprogramming is efficacious in a xenograft colon cancer model
Hisataka Ogawa et al、第 73 回日本癌学会学術集会、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川久貴 (Ogawa Hisataka)
大阪大学医学部附属病院・医員
研究者番号：20621022

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし