

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861073

研究課題名(和文) miRNAを利用した細胞初期化技術による薬剤抵抗性悪性腫瘍への治療開発

研究課題名(英文) Development of a therapeutic option for anti-cancer drug-resistant malignancies via reprogramming method using microRNAs.

研究代表者

富原 英生 (Tomihara, Hideo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30724231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：教室では再生医療で発達したリプログラミング技術を癌細胞に応用することで獲得していた薬剤耐性を解除すること、また従来のもから独自に発展させたmiR-302を用いたリプログラミング手法について報告してきた。このリプログラミングによって引き起こされる変化は可逆的な変化であることが判明したため、miR-302単独導入による肝癌細胞株のリプログラミングを行い、エピジェネティクス関連因子についての検討を行った。結論としてmiR-302の標的遺伝子の一つであるLSD1がヒストンH3K4の脱メチル化抑制により抗がん剤への感受性を増強しアポトーシスを亢進することを証明し、LSD1阻害剤の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported two original issues; 1. Applying the conventional reprogramming technology for cancer cells attenuated malignant potentials including the resistance ability to anti-cancer drugs. 2. An induction of several microRNAs including miR-302, can reprogram somatic cells as well as the conventional reprogramming technology. Since the change were reversible, microRNA-induced reprogramming procedure may include certain epigenetic mechanisms. To reveal the mechanisms, we investigated the hepatocellular carcinoma cells reprogrammed with miR-302 transduction. We found that the suppression of LSD1, which was one of the target genes of miR-302, increased anti-cancer drug sensitivities through the suppression of deacetylations of Histone H3-K4 and introduced them to an apoptosis. Taken together these results, LSD1 inhibitor could be a new therapeutic option for anti-cancer therapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：リプログラミング miR-302 LSD1 ヒストン脱アセチル化

1. 研究開始当初の背景

2006年にYamanakaらが転写因子Oct3/4, Sox2, cMyc, Klfを体細胞に導入することで、ES細胞様の形態と多分化能を持つiPS細胞を樹立して以降、様々なリプログラミング方法が報告されている。教室ではこの方法を大腸癌細胞株に応用し、ES細胞と同様の形態と多分化能をもった細胞の作成に成功し、またリプログラミングされた癌細胞は増殖能の低下と薬剤感受性の改善を認めた。このことからリプログラミングによる癌治療の可能性が示唆されたが、臨床応用に当たったの問題は、転写因子の導入にウイルスベクターを用いること、導入する転写因子自体に癌遺伝子であるc-Mycが含まれることなどであった。そこで我々は、解決手段として、ノンコーディングRNAの一種であるmicroRNA(以下miRNA)に注目した。近年、miRNAが様々な遺伝子の発現に関与していることが報告されており、我々はES細胞とiPS細胞のmiRNAの発現の網羅的解析を通じて、細胞のリプログラミングに関与するmiRNAを同定し、複数のmiRNA(miR-302, miR-369, miR-200c)を導入することで体細胞のリプログラミングに成功した。本手法の利点はウイルスベクターやc-Mycの導入を用いず、リプログラミングが可能となった点である。

<引用文献>

- Takahashi K, Yamanaka S. *Cell* 2006; 126: 663
Miyoshi N, et al. *PNAS* 2010; 107: 40
Lee RC, et al. *Cell* 1993; 75: 843
Miyoshi N, et al. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 633
Hayami S, et al. *Int J Cancer* 2011; 128: 574
Lv T, et al. *PLoS One* 2012; 7: e35065

2. 研究の目的

我々は、癌細胞に対してもmiRNAを導入することによりリプログラミングが可能となる、さらに転写因子を用いたリプログラミングと同様、悪性度の低下を示せるのではないかと考えた。教室では2006年に

Yamanakaらが報告した4つの転写因子導入によるリプログラミング手法を応用し、大腸癌細胞の悪性度を低下させる方法を開発した。またこの手法の臨床活用への問題点を解決する手段としてmiRNAに注目し、miRNAを用いた体細胞のリプログラミングに成功した。本研究の目的はmiRNAによるリプログラミングにエピジェネティック治療を組み合わせることによる影響を検討し、薬物耐性に対する新しい治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) miRNAによるリプログラミング手法の確立

癌細胞にmiRNAを導入することによって、転写因子の導入によるリプログラミングと同等のエピジェネティックな変化を起こすことができれば、癌をリプログラミングすることが可能となり悪性度の低下をもたらすことができると考えられる。しかしながら、miR-302導入によるリプログラミングについて、現時点では限られた細胞株でしか成功していないことや効率の悪さ(約0.03%)が問題点として挙げられるために、肝癌細胞株以外にも膵癌細胞株などを用い同様の検討を行う。また、リプログラミング効率については、バルプロ酸(VPA)がリプログラミングの効率をあげたと報告されており、VPAをはじめとした複数のHDAC阻害剤(Vorinostat, Belinostat)の利用についても検討する。

(2) リプログラミング関連miRNAの下流分子制御による細胞への影響

リプログラミング関連miRNAの一つであるmiR-302のターゲットとして報告のあるLSD1(AOF2)の発現の意義について肝癌細胞株を用いて検討する。LSD1の意義についてはsiRNAによるLSD1阻害を行い、その条件下での細胞の性質の変化を検討する。検討項目としては増殖、形態学的変化、薬剤感

受性、アポトーシスなどの他にヒストンのメチル化を中心としたエピジェネティックの変化を挙げた。LSD1 については選択的 LSD1 阻害剤が存在し、LSD1 阻害剤の影響について検討する。抗腫瘍効果という側面だけでなく、ヒストンのメチル化、アセチル化への影響を中心に検討する。

4. 研究成果

再生医療で発達したリプログラミング技術を、癌細胞に用いることで体性幹細胞様の形態 (Sphere) をとるだけでなく、癌細胞の悪性能 (増殖能, 浸潤能, 転移能) を減弱化し、さらには獲得していた薬剤耐性を解除することを教室では報告してきた。リプログラミング方法として、当初から用いられている 4 つの転写因子を使用した手法には癌遺伝子である c-Myc を含んでいるなど問題も含まれているため、様々な別手法が模索・開発されているが、教室では ES 細胞のマイクロアレイ情報から幹細胞維持に必要としている候補 microRNA を同定し、これらの導入による体細胞のリプログラミング方法を開発し使用している。この方法で得られた癌細胞への効果は、永続的に維持することが困難な可逆的な変化であることからエピジェネティクス機構が関与していると考えた。そこで、用いた microRNA の標的遺伝子群に関連するエピジェネティクス機構を検討し、これが治療標的になると仮説を立てた。まず我々は先行研究の結果から最も影響が強かった miR-302 に着目し、miR-302 単独導入で肝癌細胞株に今まで報告してきたものと同様の効果が得られることを確認した。そこで miR-302 の複数の標的遺伝子のうちエピジェネティック関連分子 LSD1/2、MECP1/2 のうち LSD1 に着目した。LSD はヒストンの脱メチル化により様々な遺伝子の転写を抑制することが報告されており、これが主要な働きをしている場合は LSD 阻害剤の使用

で同様の効果が期待される。miR-302 の導入肝癌細胞で形成された Sphere の癌細胞では LSD1 の発現低下を確認し、ヒストン H3-K4 の脱メチル化が抑制されていることを確認した。LSD1 をノックダウンした細胞株では Sphere の形成が認められ、H3-K4 の脱メチル化が抑制され、抗がん剤への感受性が増してアポトーシスが亢進することを確認した。今後さらに LSD1 のノックダウンを行い癌細胞の悪性能が同様に減弱化されるかを検討する予定である。

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)

Koga C, Kobayashi S, Nagano H, et al. Reprogramming using microRNA-302 improves drug sensitivity in hepatocellular carcinoma cells. *Ann Surg Oncol* 2014; Suppl 4:S591-600
Noguchi K, Eguchi H, Konno M, et al. Susceptibility of pancreatic cancer stem cells to reprogramming. *Cancer Sci* 2015; 106: 1182-7

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

富原 英生 (TOMIHARA, Hideo)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
医員
研究者番号: 30724231

(2)研究分担者

永野 浩昭 (Nagano, Hiroaki)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号: 10294050

(3)連携研究者

小林 省吾 (Kobayashi, Shogo)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号: 30452436