

令和元年8月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10539

研究課題名(和文) 正常大腸幹細胞を傷めない大腸癌幹細胞特異的治療ターゲットの解明

研究課題名(英文) miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells through the Inhibition of DCLK1

研究代表者

久森 重夫 (Hisamori, Shigeo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50534351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：正常大腸幹細胞(NCoSCs)と比較し大腸癌幹細胞(CoCSCs)に特有の腫瘍形成能制御機構を解明することを目的とした。

ヒト大腸手術標本にてDCLK1の免疫染色を施行。大腸癌組織では広範にDCLK1陽性細胞が分布していたが、正常大腸上皮ではDCLK1陽性細胞はほぼ認めなかった。miR-137はNCoSCsに高発現し、CoCSCsでの発現が抑制されていた。一方でDCLK1 mRNAはCoCSCsで高発現しNCoSCsでの発現が抑制されていた。大腸癌細胞株にmiR-137を強制発現させると腫瘍形成が抑制されたが、正常大腸細胞株にmiR-137を強制発現させても、細胞増殖に影響は与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常大腸幹細胞(NCoSCs)と大腸癌幹細胞(CoCSCs)は、組織再形成・細胞増殖のため共通のメカニズムを有していると考えられている。近年マウスを用いた研究で、DCLK1が、正常大腸には発現せず、小腸腺腫の幹細胞にのみ発現していることが報告されたが、ヒトCoCSCsとDCLK1の発現については詳細な研究は進んでいなかった。今回の我々の研究結果から、miR-137はDCLK1発現を制御することでCoCSCsの腫瘍形成能を抑制することが示唆された。本結果から正常大腸組織を障害せずCoCSCsを標的とした新規治療戦略を提示できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DCLK1-positive colon cancer cells were widely distributed in the colon cancer specimens, while DCLK1-positive epithelial cells were rarely detected in normal colon tissues, including the crypt bottoms. MiRNA-137(miR-137) was highly expressed in the NCoSC population, whereas the DCLK1 mRNA expression was significantly upregulated in the CoCSC population. The defect in organoid development by the transduction of miR-137 and shRNAs were substantially rescued by co-expression of the exogenous DCLK1. Although miRNA-137 overexpression did not affect the organoid development of the normal intestine, miRNA-137 knockdown promoted the organoid development of normal colon cells. miR-137 has the potential function to suppress the tumorigenicity of CoCSCs and that maintained expression of miR-137 in NCoSCs contributes to suppress uncontrolled cell proliferation through the inhibition of DCLK1 expression.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 マイクロRNA 大腸癌幹細胞 正常大腸幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常大腸幹細胞(normal colon stem cells; NCoSCs)と大腸癌幹細胞(colon cancer stem cells; CoCSCs)は、組織再形成・細胞増殖のため共通のメカニズムを有していると考えられている。近年マウスを用いた研究で、DCLK1(doublecortin-like kinase 1)が、正常大腸には発現せず、小腸腺腫の幹細胞にのみ発現していることが報告されたが、ヒト CoCSCs と DCLK1 の発現については詳細な研究は進んでいない。また、過去に CoCSCs の腫瘍形成能を制御する因子として、複数の microRNAs(miRNAs)が報告されているが、NCoSCs に影響を与えず CoCSCs の腫瘍形成能を特異的に抑制する miRNA を同定したとする報告はない。

2. 研究の目的

今回我々は、大腸癌とくに CoCSCs における DCLK1 および miRNA の発現状況およびその役割に着目し、NCoSCs と比較して CoCSCs に特有の腫瘍形成能制御機構を解明することを目的として研究を立案した。

3. 研究の方法

ヒト大腸手術標本にて DCLK1 の免疫染色を行う。また、同検体の正常大腸/大腸癌組織各々から、flow cytometry を用いて NCoSCs および CoCSCs 細胞集団を抽出し(いずれも EpCAM⁺/CD44⁺/CD66a⁻)、miRNA 発現を網羅的に解析し、NCoSCs に高発現し CoCSCs での発現が抑制されている miR を見出す。Luciferase assay および Western blotting にてその miR と DCLK1 の関係を調べる。さらに大腸癌細胞株にレンチウイルスを用いてその miR を強制発現させ、in vitro および in vivo のレベルで腫瘍形成が抑制されるか確認する。

4. 研究の結果

ヒト大腸手術標本での DCLK1 免疫染色の結果、大腸癌組織では広範に DCLK1 陽性細胞が分布していたが、正常大腸上皮では腺窩底も含め DCLK1 陽性細胞はほとんど認めなかった。ヒト正常大腸および大腸癌組織から、flow cytometry を用いて各々 NCoSCs および CoCSCs 細胞集団を抽出し、384 種の miRNA 発現 profile を作成し比較したところ、miRNA-137(miR-137)は NCoSCs に高発現し、CoCSCs での発現が抑制されていた。一方 DCLK1 mRNA は CoCSCs で高発現し NCoSCs での発現が抑制されていた。

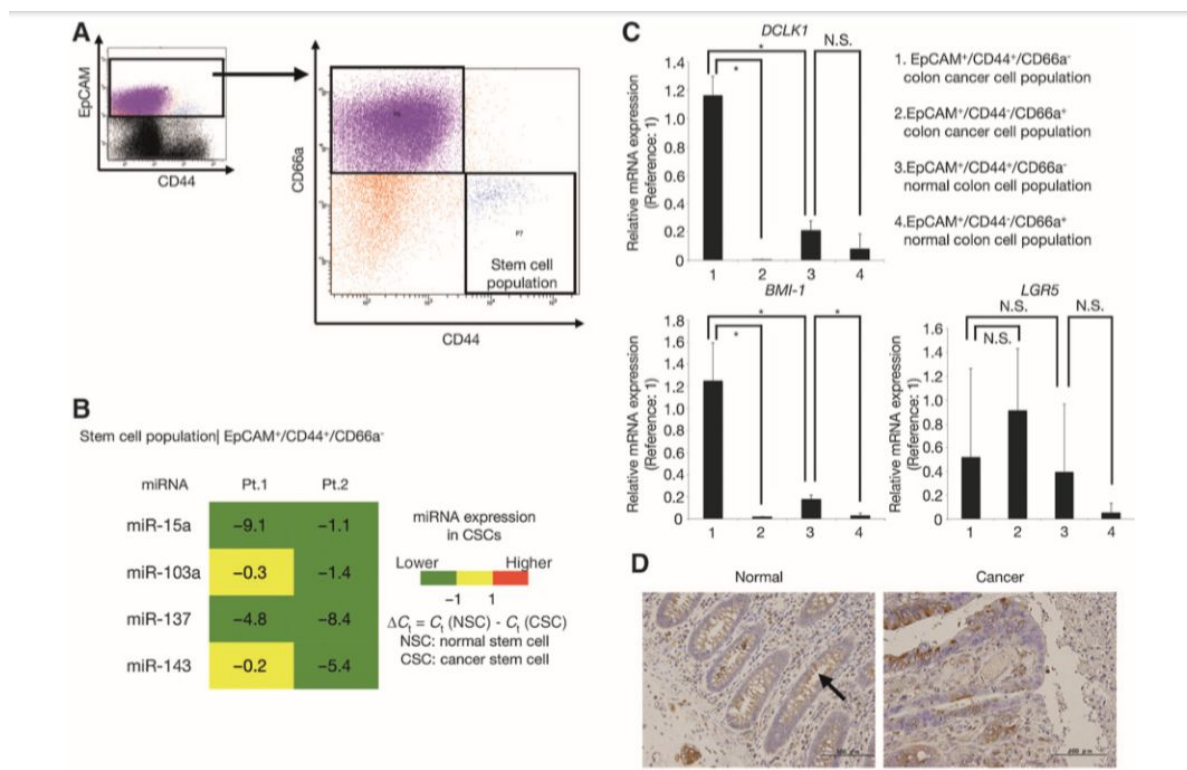
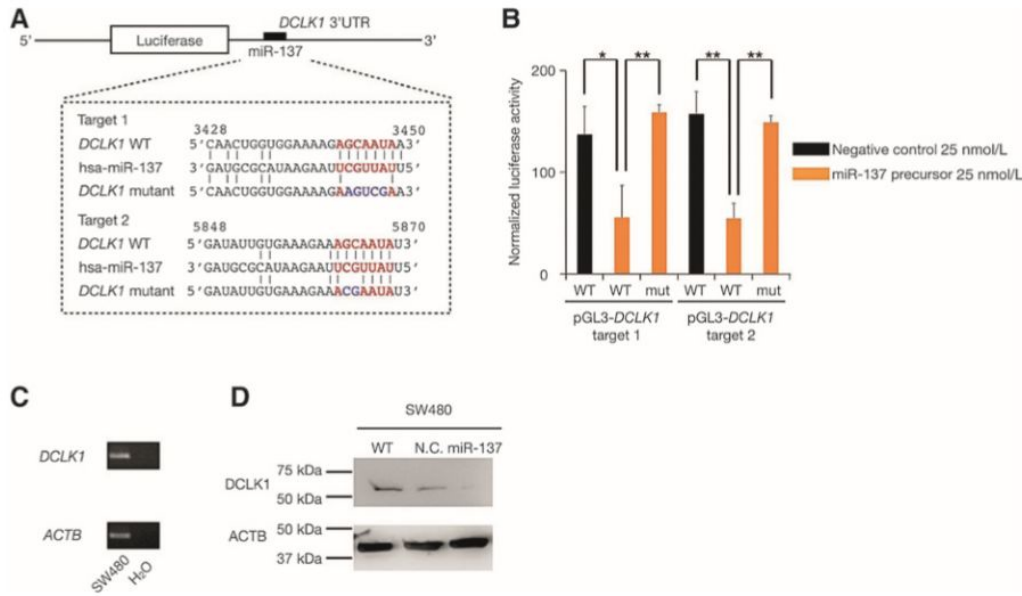


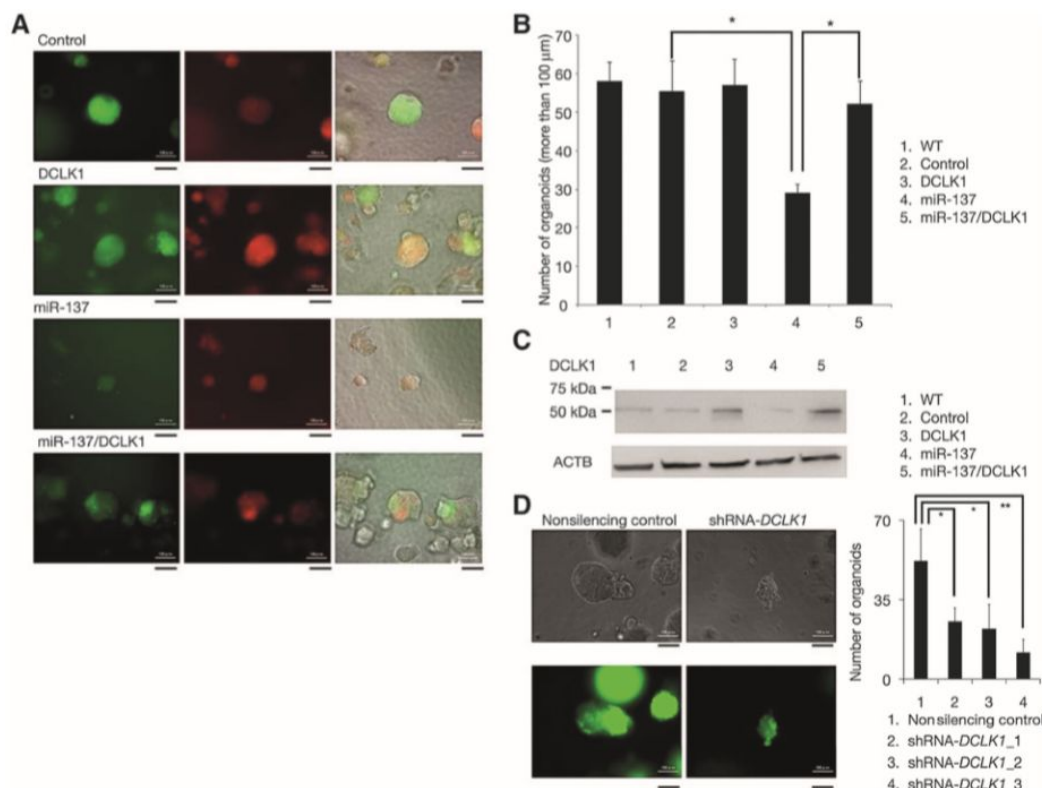
Figure 1.

Analysis of human normal colon and colon cancer specimens. A, representative flow-cytometric plot. EpCAM⁺/CD44⁺/CD66a⁻ cells and EpCAM⁺/CD44⁻/CD66a⁺ cells in both colon cancer tissues and normal colon tissues were collected by flow cytometry. B, expression pattern of 384 miRNAs in the EpCAM⁺/CD44⁺/CD66a⁻ population of colon cancer tissues. The amount of miRNA expression (C_i value) was analyzed by multiplex quantitative real-time PCR. Only miR-15a and miR-137 were suppressed in the EpCAM⁺/CD44⁺/CD66a⁻ population of both colon cancer specimens. Numbers indicate the difference of C_i values (ΔC_i) between normal stem cells and CSCs. C, qRT-PCR results of several intestinal stem cell markers. The *DCLK1* mRNA expression in the EpCAM⁺/CD44⁺/CD66a⁻ colon cancer cell population was significantly higher than that of EpCAM⁺/CD44⁻/CD66a⁺ normal colon cells ($n = 3$, $P < 0.05$, N.S., not significant). D, IHC analysis. Normal tissues adjacent to cancers showed positive DCLK1 immunoreactivity but DCLK1-positive cells were rare (arrow) and no cells located at the bottom of the crypts (left). Cancer tissues showed diffuse DCLK1-positive pattern (right). Scale bar: 100 μm .

Luciferase assay および Western blotting にて miR-137 と DCLK1 の関係を調べたところ、miR-137 は DCLK1 の発現を直接抑制することが示された。



大腸癌細胞株にレンチウイルスを用いて miR-137 を強制発現させると、in vitro および in vivo のレベルで腫瘍形成が抑制されたが、正常大腸細胞株に miR-137 を強制発現させても、細胞増殖に影響は与えなかった。



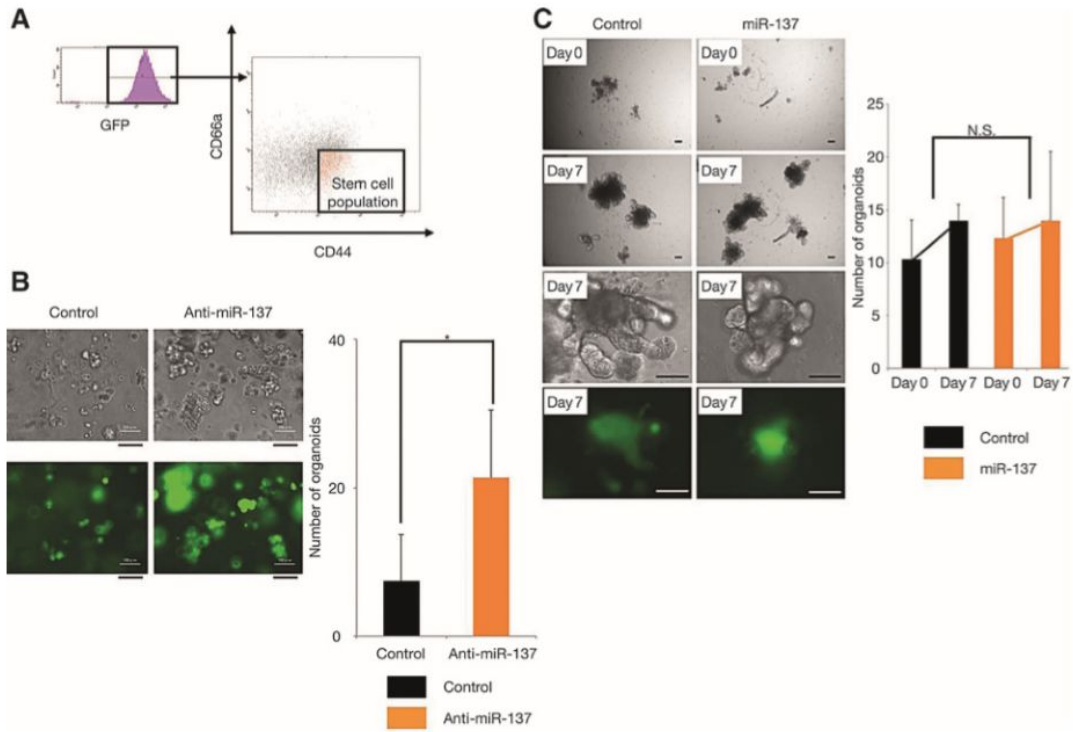


Figure 4. Influence of miR-137 on normal intestinal organoid. A, hPCCs infected by control lentivirus or anti-miR-137-expressing lentivirus were cultured for 7 days. GFP⁺/CD44⁺/CD66a⁻ hPCCs were collected by flow cytometry. B, Anti-miR-137 enhanced organoid development. Representative images of the organoids derived from GFP⁺/CD44⁺/CD66a⁻ hPCCs. The top panels are the phase-contrast images of the organoids, and the bottom panels are the fluorescent microscopic images for the detection of GFP. Scale bar: 100 μ m. The data are mean \pm SD ($n = 9$, *, $P < 0.01$). C, organoids derived from mouse small intestine infected with miR-137-expressing lentivirus grew as well as those infected with control lentivirus. The bottom panels are the fluorescent microscopic images for the detection of GFP, and the other panels are the phase-contrast images of the organoids. Day 0 and Day 7 indicate the day of infection and 7 days after infection, respectively. Scale bar: 100 μ m. The data are mean \pm SD ($n = 6$, N.S., not significant, $P > 0.05$).

以上より、miR-137 は DCLK1 発現を制御することで CoCSCs の腫瘍形成能を抑制する。本機構は正常大腸組織を障害せず CoCSCs を標的とした新規治療戦略となる可能性があると考えられた。

5 . 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計1件)

[Sakaguchi M, Hisamori S, Oshima N, Sato F, Shimono Y, Sakai Y.](#)
miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells through the Inhibition of DCLK1.
Mol Cancer Res. 2016 Apr;14(4):354-62.

〔学会発表〕(計2件)

1 . 第9回世界癌大会 Bit's 9th Annual World Cancer Congress-2016
Dysregulation of miR-137/DCLK1 axis plays an important role in colon cancer stem cells
[坂口正純](#) [久森重夫](#)

2 . 第116回日本外科学会定期学術集会
microRNA-137-DCLK1 axis による大腸癌幹細胞特性制御の解明
[坂口正純](#) [久森重夫](#) [大嶋野歩](#) [坂井義治](#)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願・取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし。

6 . 研究組織

研究協力者

氏名：坂口正純

ローマ字氏名：Sakaguchi Masazumi

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：消化管外科

職名：大学院生

氏名：下野洋平

ローマ字氏名：Shimono Yohei

所属研究機関名：藤田医科大学医学部

部局名：生化学講座

職名：教授

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。