

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23800039

研究課題名（和文） マイクロ RNA 情報ネットワークに基づく癌幹細胞の包括的制御

研究課題名（英文） Identification of microRNA expression profile of cancer stem cells

研究代表者

原口 直紹 (HARAGUCHI NAOTSUGU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30528609

研究成果の概要（和文）：

肝臓癌において、網羅的マイクロ RNA 解析を行い、癌幹細胞が血管新生とヒストンの脱メチル化を行う特徴的なマイクロ RNA を発現していることを同定した。また、大腸癌において、活性酸素種（ROS）の代謝が低い細胞で、特徴的にエクソゾーム包埋型のマイクロ RNA が産生され、その中に、let7 family を含む特徴的なマイクロ RNA 発現を同定した。さらに、これらの因子が周囲環境の代謝機構を変化させる可能性について見出し、現在、これらの解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have identified specific microRNAs that regulate angiogenesis and histone modification in liver cancer stem cell (CSC) fraction. In colorectal cancer, we have also identified microRNA profiles of CSC fraction. These microRNAs were mainly involved in the secretory type and suggested to effect on surrounding microenvironment for cancer progression and metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞、マイクロ RNA、エクソゾーム、情報ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

従来、癌幹細胞を標的化することにより癌の根治が可能であると考えられてきた。しかし、癌幹細胞が生み出す細胞学的多様性、癌幹細胞への再移行現象、癌幹細胞自身の特性と周囲環境が絡み合って形成された治療抵抗性メカニズムを考慮すると、一過的な癌幹細胞を標的とした治療法では癌の根治は難しいと考えられる。

2. 研究の目的

癌幹細胞が産生する分泌型 microRNA を介した情報ネットワークを解明し、その制御を行うことにより癌幹細胞を中心とした癌の社会構築を破綻させる新しい癌幹細胞標的治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

われわれが同定した、semi-quiescent な CD13+肝臓癌幹細胞をセルソーターで分離採

取し、CD13-肝臓癌細胞との、microRNA 発現の違いを、microRNA array を用いて解析を行った。また、大腸癌において、網羅的な表面抗原スクリーニングを行い、その中から同定された細胞分画の造腫瘍性の確認を行った。さらに、新しく同定した細胞分画におけるmicroRNA と mRNA 発現プロファイルをマイクロアレイにより解析した。

4. 研究成果

肝臓癌において、網羅的マイクロ RNA 解析を行い、癌幹細胞が血管新生とヒストンの脱メチル化を行う特徴的なマイクロ RNA を発現していることを同定した。また、大腸癌において、新規の大腸癌マーカーの検索を行った。大腸癌細胞株の分化誘導を行い、分化に関連して変動する細胞表面マーカーのスクリーニングを行った。その結果、CD49f の発現が分化誘導に伴って著明に減少することを見出した (表 1)。

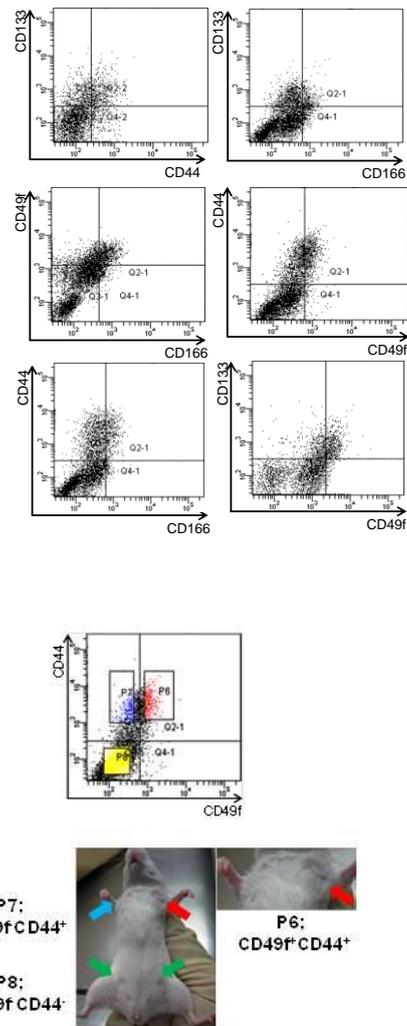
表 1. Tumor initiating ability of each cell populations.

Cell population	Tumor initiation	
	10,000 cells	5,000 cells
CD133-CD44-	(-) 0/3	(-) 0/4
CD133+CD44-	(-) 0/3	(-) 0/4
CD133+CD44+	(+) 3/3	(+) 3/4
CD133-CD166-	(-) 0/3	(-) 0/3
CD133+CD166-	(+) 3/3	(+) 1/3
CD133+CD166+	(+) 3/3	(+) 1/3
CD44-CD166-	(-) 0/3	(-) 0/3
CD44+CD166-	(+) 3/3	(+) 2/3
CD44+CD166+	(+) 3/3	(+) 2/3
CD133-CD49f-	(-) 0/4	(-) 0/4
CD133+CD49f-	(-) 0/4	(-) 0/4
CD133+CD49f+	(+) 3/4	(+) 6/8
CD44-CD49f-	(-) 0/4	(-) 0/6
CD44+CD49f-	(-) 0/4	(-) 0/6
CD44+CD49f+	(+) 4/4	(+) 6/8

CD49f の発現と、既存の癌幹細胞マーカー (CD44, CD133, CD24, CD166, CXCR4) との関連を検索したところ、CD49f は CD44 および CD133 分画の中に含まれることを見出した。腫瘍造成能を検討したところ、CD44 および CD133 が発現していても CD49f の発現がない場合には (CD44+CD49f- および CD133+CD49f-)

造腫瘍性を認められない一方、CD49f を発現している場合には (CD49f+) 高い造腫瘍性を示すことが示され (limiting dilution assay)、CD49f が高い癌幹細胞分画の分離性能を有することが示された (図 1)。

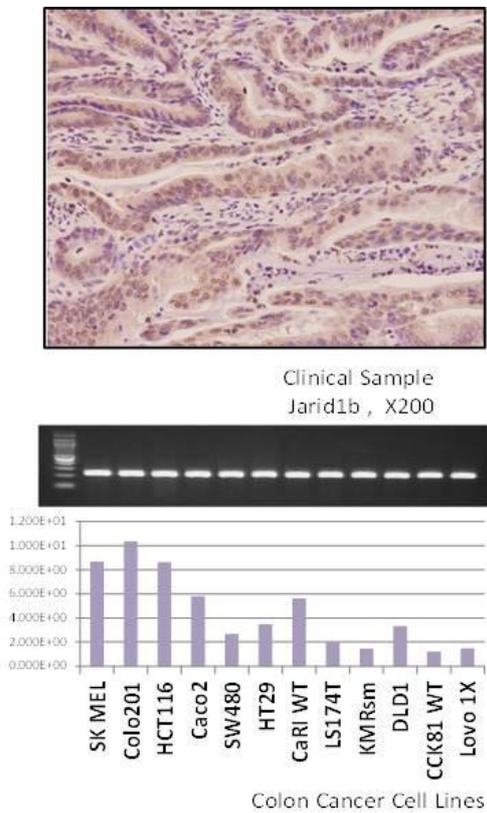
図 1. Tumor initiating ability



また、さらなる幹細胞マーカーの純離をめざし、活性酸素種 (ROS) の代謝と ALDH との相関を認める細胞表面マーカーの分離を行っていった。その結果、新規の機能性マーカーを見出すことに成功し、現在その細胞分画の機能解析を行っている。興味深いことに、同マーカー陽性細胞は ROS が低い細胞に特異的に発現しており、その microRNA 発現プロファイルの解析の結果、エクソソーム包埋型の分泌型のマイクロ RNA の発現が亢進していることを見出した。現在、これらの分泌型 microRNA がどのような細胞にどのような生物学的活性を付与するのかを検討している。

一方、一連の解析により大腸癌において、ヒストン修飾を行う因子である JARID1B が癌幹細胞分画で発現が亢進していることを見出した (図 2)。

図 2. Ubiquitous Expression of JARID1B in Colon Cancer.



その機能解析により JARID1B は p16INK4A を標的としており、p16INK46 を介した細胞老化 (senescence) からの防御・維持を行っていること (図 3)、更には、JARID1B を抑制すると癌幹細胞分画が減少し、造腫瘍性が抑制されることを明らかにした (図 4 A, B)。

図 3. JARID1B and p16/INK4A expression inversely correlated.

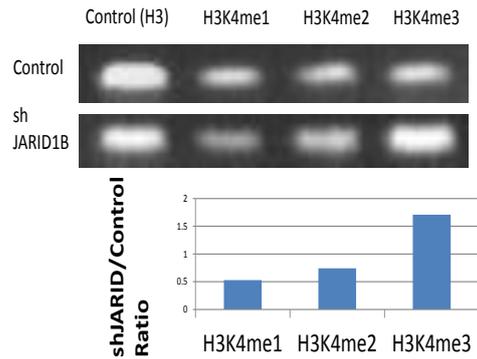
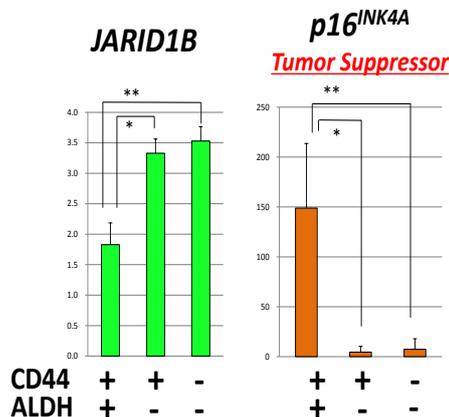
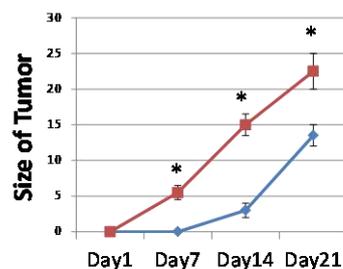
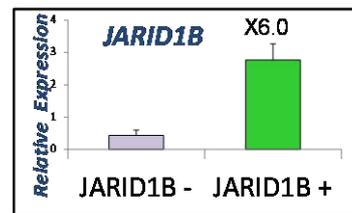
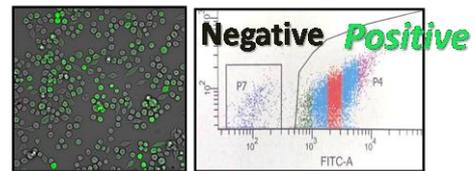


図 4A. JARID1B Negative Cells Resulted in Growth Reduction.



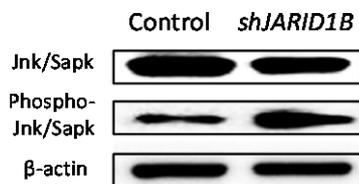
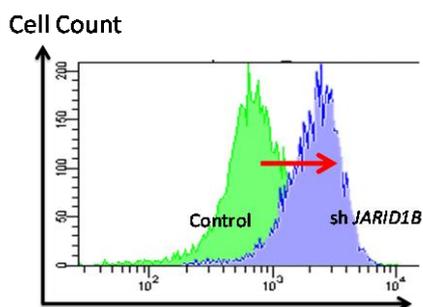
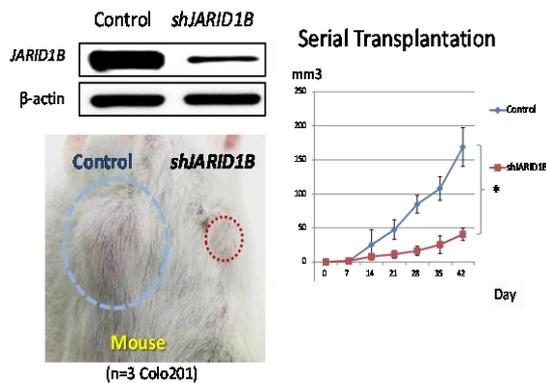
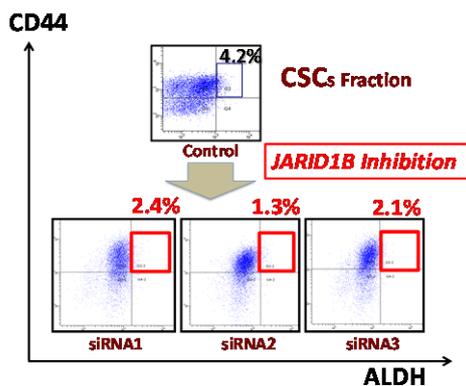


図 4B. Inhibition of JARID1B Changed CSCs Fraction.



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. Ohta K, Haraguchi N, Kano Y, Kagawa Y, Konno M, Nishikawa S, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Noguchi Y, Ozaki M, Kudo T, Sakai D, Satoh T, Fukami M, Ishii M, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H. Depletion of JARID1B induces cellular senescence in human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2013 Apr;42(4):1212-8.
2. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer cancer-initiating cells. *Int J Oncol.* Accepted.

[学会発表] (計 1 件)

1. 第 113 回 日本外科学会. 定期学術集会 消化器癌における癌幹細胞の特性と標的化. 2013. 4. 10 (福岡)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gesurg/study/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 直紹 (HARAGUCHI NAOTSUGU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30528609