

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791417

研究課題名(和文) リプログラミング関連miRNAによる肝細胞癌への影響および治療への応用

研究課題名(英文) Therapeutic applications and effects on liver cancer cells by reprogramming related miRNA

研究代表者

古賀 睦人 (Koga, Chikato)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70597468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞株に対してmiR-302を導入し、培養することでiPS細胞と形態学的に類似した細胞塊の出現を認めた。これらは未分化マーカーの発現上昇を認め、分化誘導によって、三胚葉の分化マーカーが上昇していた。

そしてこれらの細胞塊は親株と比較し、細胞増殖の抑制、間葉上皮移行の誘導、複数の薬剤に対する感受性の改善、アポトーシス細胞の増加を認めた。miR-302を導入した細胞塊においては、c-Mycの発現が低いことが特徴であり、miR-302の標的遺伝子のなかで、c-Mycの発現に影響のあるヒストン脱メチル化酵素AOF2の関与を認めた。

研究成果の概要(英文)：Among three miRNAs that were previously presented for miRNA-mediated reprogramming, miR-302 was expressed at low levels in HCC cells. After transfecting three times with miR-302, the cells were incubated in ES medium for 3 weeks, and then characterized. iPSC-like-spheres were obtained after the 3-week incubation. Spheres presented high NANOG and OCT4 expression, low proliferation, high apoptosis, low epithelial-mesenchymal transition marker expression, and sensitization to drugs. Several miRNAs were changed. cMyc was decreased, and methylation was elevated on histone 3 at lysine 4 (H3K4). Differentiated cells expressed markers of each germ layer (GFAP, FABP4, and ALB). AOF2 (also known as LSD1 or KDM1), one of the targets for miR-302, was repressed in iPSC-like-spheres. Silencing of AOF2 resulted in similar features of iPSC-like-spheres, including cMyc down-regulation and H3K4 methylation. In drug-resistant cells, sensitization was achieved through miR-302-mediated reprogramming.

研究分野：消化器外科、肝胆膵外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 microRNA ヒストン リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌の治療としては切除、TACE・ラジオ波などの局所療法および分子標的治療薬(ソラデニブ)などの全身投与がある。肝切除もしくは局所療法などが可能であった場合としても、5年生存率は50%に過ぎず、さらに慢性肝炎を発生母地としているため、治療後に新たな癌が発生してくる確率が非常に高く、新たな治療法の出現が望まれている。

(2) 2006年にYamanakaらのグループが4つの転写因子(Oct3/4, Sox2, cMyc, Klf)を体細胞に導入することで、ES細胞と同様の形態で多分化能を持つiPS細胞を作成して以降、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たところ、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た。この細胞はもともとの癌細胞と比べて、悪性度の低下、すなわち増殖能の低下と薬剤感受性の改善を認めた。

(3) 一方、近年になってノンコーディングRNAのひとつであり、17~22個の塩基からなるmicroRNA(以下miRNA)が注目されており、様々な遺伝子の発現に関与していることがわかってきている。教室では、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を同定しており、これら複数の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ことを報告した。

(4) われわれは、前述の通り、Yamanaka S.らが報告した4つの転写因子を導入することで癌細胞のリプログラミングを通じた治療が可能であると考えている。しかしながら、4つの転写因子は癌遺伝子であるc-Mycを含むこと、ベクター等により導入する必要があることから、技術的に閾値が高い。miRNAによる癌細胞のリプログラミングが可能であれば、臨床応用の可能性はより広がると考えた。

2. 研究の目的

2006年にYamanakaらが4つの転写因子による体細胞のリプログラミングを報告して以降、様々な手法によるリプログラミングが報告されている。その中で教室からは大腸癌をリプログラミングすることで悪性度が低下することを報告した。また近年ノンコーディングRNAのひとつであるmicroRNA(以下miRNA)が注目され、様々な遺伝子の発現に関与していることが報告されている。教室では、miRNAを用いた体細胞のリプログラミングに成功した。今回肝細胞癌に対する

リプログラミング関連miRNAの影響を検証し、肝細胞癌の新たな治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) リプログラミング関連miRNAの肝癌細胞株における発現の検討
教室では体細胞に対してmiR-200c, miR-302, miR-369を導入してリプログラミングに成功したことから、肝細胞癌株6種(PLC/PRF/5, HuH7, HepG2, Hep3B, HLE, HLF)を用いて、関連するmiRNAの発現を確認した。

(2) リプログラミング関連miRNA導入による肝癌細胞株の形質変化
発現結果をもとに、miRNAの選定を行い、肝癌細胞株に導入を行い、肝癌細胞株の形質変化に関して検討を行った。評価項目としては「リプログラミングできているか」と「癌細胞の悪性度が低下するか」について検討した。リプログラミングできているかどうかについてはmiRNA導入後、経時的な形態観察、未分化マーカー(Nanog, Oct3/4, Sox2)の発現、分化誘導に対する反応について検討を行った。癌の悪性度の評価については増殖能、アポトーシス、薬剤感受性について検討した。

(3) 悪性度変化の機能解明
上記(2)で検証した性質の変化をもたらしたメカニズムについて検討した。導入したmiRNA(miR-302)の標的遺伝子の中からAOF2に着目して検討した。

(4) 耐性株での検討
教室で保有している肝細胞癌のIFN耐性株を用いて、同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 肝癌細胞株においてこれらリプログラミング関連miRNA(miR-302, miR-369, miR-200c)の発現を確認した。参考値としてヒト多能性胎生期癌(N-TERA2)を用いた。いずれのmiRNAの発現においても細胞株間で差異を認めた。miR-302においては他のmiRNAとは異なり、N-TERA2と比べ、肝癌細胞株では著明に発現が低値であった。

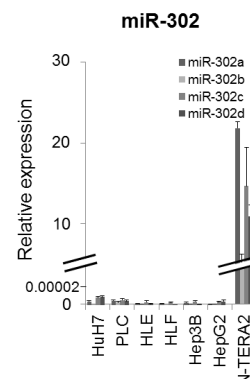


図1 肝癌細胞株における miR-302 の発現 (2) 体細胞のリプログラミングに準じて同 miRNA を導入したところ、iPS 細胞と形態学的に類似した細胞塊 (iPS 細胞類似細胞塊) の出現を認め、アルカリフォスターゼ染色が陽性であった。この細胞塊においては、Nanog、Oct3/4 等の未分化マーカーの発現が上昇しており、分化誘導によって、三胚葉の分化マーカーが上昇していた。また、親株と比較し、細胞増殖の抑制、間葉上皮移行の誘導、複数の薬剤に対する感受性の改善、アポトーシス細胞の増加を認めた。

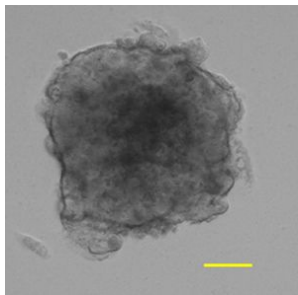


図2 iPS 細胞類似細胞塊

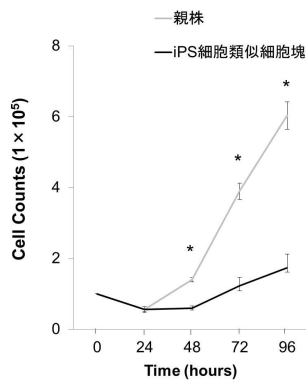


図2 iPS 細胞類似細胞塊の細胞増殖

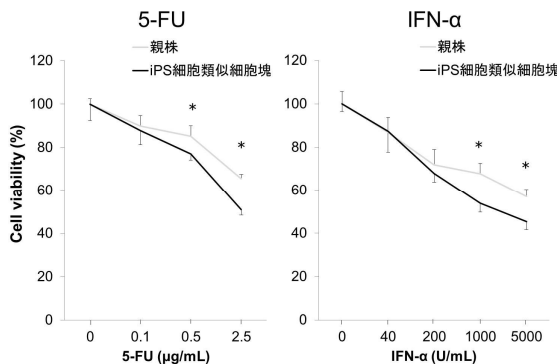


図3 iPS 細胞類似細胞塊の薬剤感受性

(3) miR-302 の標的遺伝子としては、AOF2, NR2F2, TGFBR2, CDK2 などが報告されている。miR-302 を導入した細胞塊においては、転写 4 因子 (Oct3/4 · Sox2 · Klf4 · c-Myc)

を導入した細胞と異なり、c-Myc の発現が低いことが特徴であった。そのため、上記 miR-302 の標的遺伝子のうち、c-Myc との関連が報告されていたヒストン脱メチル化酵素 AOF2 に着目した。細胞塊では AOF2 の発現低下およびヒストン H3 のリジン残基 (H3K4) のメチル化を認めた。AOF2 の抑制実験では、同様に H3K4 のメチル化を認め、さらにアポトーシス、薬剤感受性において、細胞塊と同様の変化を確認した。

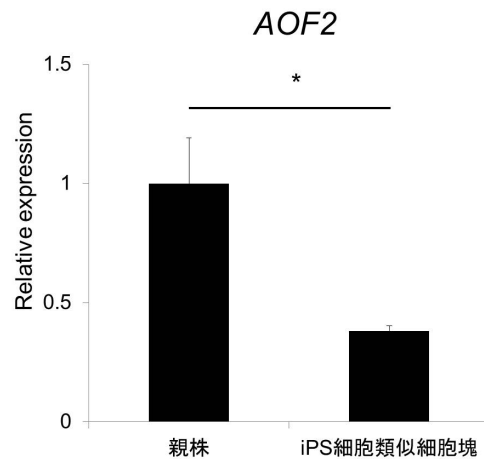


図4 AOF2 の発現

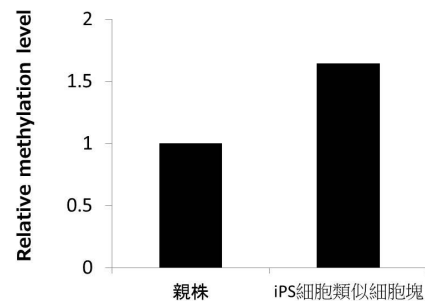


図5 H3K4 メチル化レベル

(4) 教室で保有している肝細胞癌の IFN 耐性株に対して、miR-302 の導入を行ったところ、親株と同様に iPS 細胞と形態学的に類似した細胞塊の出現を認め、アルカリフォスターゼ染色が陽性であった。この細胞塊においては、Nanog、Oct3/4 等の未分化マーカーの発現が上昇していた。さらにこれらの細胞塊は、親株と同様に薬剤感受性の改善を認めた。

このように肝癌細胞株に対して miR-302 を導入するリプログラミング技術を用いることで、癌の悪性度を低下させることができた。今後は臨床応用に向けて、ヒストン脱アセチル化酵素の影響についての検討および動物実験等による評価を行うことが必要と考える。

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)

〔雑誌論文〕(計1件)

Chikato Koga, Shogo Kobayashi, Hiroaki Nagano, et al. Reprogramming using microRNA-302 improves drug sensitivity in hepatocellular carcinoma cells, *Annals of Surgical Oncology*, 査読有, 2014 in press
DOI: 10.1245/s10434-014-3705-7

〔学会発表〕(計4件)

miR-302によるリプログラミング手法を用いた肝細胞癌治療の可能性の検討
発表者: 古賀 睦人
第68回日本消化器外科学会総会 2013, 7/17-19 宮崎

miR-302導入による肝細胞癌への影響

発表者: 古賀 睦人
第113回日本外科学会総会 2013, 4/11-13 福岡

microRNA導入による肝細胞癌リプログラミングへの試み

発表者: 古賀 睦人
第67回日本消化器外科学会総会 2012, 7/18-20 富山

リプログラミングに関連したmicroRNAの肝癌細胞における発現に関する検討

発表者: 古賀 睦人
第112回日本外科学会総会 2012, 4/12-14 千葉

〔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

古賀 睦人 (Koga Chikato)
大阪大学附属病院消化器外科医員
研究者番号: 70597468

(2) 研究協力者

永野 浩昭 (Nagano Hiroaki)
大阪大学附属病院准教授
研究者番号:

小林 省吾 (Kobayashi Shogo)
大阪大学附属病院消化器外科助教
研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: