

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462195

研究課題名(和文) 癌幹細胞関連マイクロRNAに着目した悪性胸膜中皮腫の新規治療法の開発

研究課題名(英文) New treatment strategy for malignant pleural mesothelioma focusing on microRNAs related to cancer stem cell makers

研究代表者

宗 淳一 (SOH, JUNICHI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90559890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫(MPM)は治療抵抗性を示す予後不良な疾患で、病態の解明と新しい治療法の確立が急がれる。治療標的となる癌幹細胞と、癌幹細胞関連マイクロRNA(miRNA)に注目することで、MPMの病態解明と新しい治療法の開発を試みた。網羅的解析から、miRNA-34とmiRNA200ファミリーを候補miRNAとして、その発現や、遺伝子導入による幹細胞分子マーカー発現、細胞増殖や薬剤感受性の変化について解析を終了し、細胞株から癌細胞特性をもつ細胞を抽出し、解析することで、新たな候補miRNAを同定することを試みている。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a well-known tumor which shows treatment resistance and dismal prognosis. There is a need to resolve the cause of this disease and to develop a new treatment. We investigated the cause of MPM and the new treatment strategy by focusing on the cancer stem cell and micro-RNA (miRNA) related to cancer stem cell markers. We performed a comprehensive miRNA expression analysis to find the families of miRNA-34 and miRNA-200 as candidate of cancer stem cell related miRNA of MPM. We analyzed the effect of transduction of these miRNAs on expression of cancer stem cell related makers, cell viability, and drug sensitivity. We are investigating the new candidates of miRNAs related to cancer stem cell of MPM by cell sorting method.

研究分野：胸部悪性腫瘍

キーワード：悪性胸膜中皮腫 癌幹細胞 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1)アスベスト曝露が原因と考えられる悪性胸膜中皮腫は予後不良で治療抵抗性な腫瘍であり、早期の病態解明と新規治療法の確立が求められている。申請者は、悪性胸膜中皮腫の分子生物学的異常として、RASSF1A等の腫瘍抑制遺伝子のDNA異常・メチル化異常・発現異常を明らかにしてきたが(豊岡ら Oncogene 2005)、新規治療法の確立までには至っていない。

(2)癌幹細胞は、自己複製能・多分化能を備え、さらに薬剤および放射線に対し耐性を示すことも知られており、結果として予後不良の大きな要因である可能性が示唆されているが、悪性胸膜中皮腫における癌幹細胞については実態は不明である。一般的に癌幹細胞が非癌幹細胞に分化する過程ではメチル化をはじめとしたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が関与していることが報告されており(Kagaraら Am J Pathol. 2012)、中でも、癌幹細胞に特徴的なマイクロRNA(miRNA)のメチル化による制御機構の存在が示唆されている(Tellezら Cancer Res 2011)。

(3)miRNAはヒトではメッセンジャーRNAのC末端に存在する非翻訳領域に作用し、RNA干渉によりメッセンジャーRNAのタンパク質への翻訳を抑制する。申請者は悪性胸膜中皮腫においてmiRNA-34b/cのメチル化による発現低下、強制発現による抗腫瘍効果を報告しておりmiRNAのエピジェネティック異常が胸膜悪性中皮腫の発癌機構に関与する可能性を示している(宗ら、Clin. Cancer Res 2011)。

2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫は従来の治療に抵抗性を示す予後不良な疾患であり、その病態の解明、並びに新しい治療法の確立が急がれる。癌幹細胞は自己複製能・多分化能を備え、薬剤・放射線治療に対しても高い抵抗性を示すことが報告されており、新しい癌治療戦略における標的と考えられる。miRNAの中には、癌幹細胞と関連のあるmiRNAが報告され、新規治療法に結びつく可能性が示唆されている。本研究の目的は、悪性胸膜中皮腫における癌幹細胞特性に関連するmiRNAを同定・解析し、悪性胸膜中皮腫の病態の解明と新しい治療法の開発を目指すことである。具体的には、

(1)癌幹細胞特性に関連したmiRNAをエピジェネティクス異常、薬剤耐性癌幹細胞様細胞に着目して網羅的解析により同定し、その機能を解析する。

(2)(1)で同定したmiRNAの悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果を検討する(*in vitro* & *in vivo*)。

(3)(1)で同定したmiRNAの薬剤・放射線感受性の改善効果を検討する。

3. 研究の方法

(1)癌幹細胞特性に関連したmiRNAをエピジェネティクス異常、薬剤耐性癌幹細胞様細胞に着目して網羅的解析により同定し、その機能を

解析する。

癌幹細胞特性を有するmiRNA発現異常の同定:悪性胸膜中皮腫細胞株、正常中皮細胞株などを使用し、悪性胸膜中皮腫細胞株に対して脱メチル化処理の前後でmiRNAを抽出し、各々の発現を網羅的に解析して比較することで、メチル化により発現が抑制されているmiRNA群を推定する。癌幹細胞が薬剤耐性に関与することに着目して、抗癌剤(白金製剤)の長期暴露により樹立した薬剤耐性癌幹細胞様細胞株(NCI-H290R)について、耐性化前後でmiRNA発現を網羅的に比較検討することで、薬剤耐性に関与する癌幹細胞関連miRNAを同定する。

候補miRNAの癌幹細胞特性に注目した機能解析と標的メッセンジャーRNAの同定:で同定した候補miRNAが腫瘍抑制型である場合は、発現ベクターに組み込み、悪性胸膜中皮腫細胞株に導入し、導入前後の癌幹細胞特性の変化を検証する。候補miRNAが腫瘍促進型である場合は、ロックダウンベクターを用いて、発現を抑制し、同様の検討を行う。miRNAが翻訳を抑制する標的メッセンジャーRNAを決定するために、メッセンジャーRNAのuntranslated region(UTR)部とmiRNAのシード配列や、miRNAのターゲット予測データベース(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)を利用する。

(2)miRNAの悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討(*in vitro* & *in vivo*):(1)で作成したmiRNA発現ベクターや、アデノウイルスmiRNA発現ベクターを用いて、候補miRNA導入による悪性胸膜中皮腫細胞の増殖能の変化を*in vitro*・*in vivo*に行う。候補miRNAが腫瘍促進型の場合はロックダウンベクターを用いて検討する。

(3)同定されたmiRNAの薬剤・放射線感受性の改善効果の検討(*in vitro*):(1)で同定された候補miRNAを遺伝子導入(またはロックダウン)することにより、薬剤・放射線感受性の変化を検討し、既存の治療効果の改善を目指す。申請者は、miRNA-34b/c発現ベクターの導入によりNCI-H28、NCI-H2052の放射線感受性(clonogenic survival assay)が改善したことをすでに発見しており(宗ら、Anticancer Res. 2012)、今後は種々の抗癌剤(白金製剤・ペメトレキセドなど)の薬剤感受性(MTT assay)の改善効果について検討する。さらに新規に同定したmiRNAについても、同様の手法を用いて検討を行う。

4. 研究成果

(1)癌幹細胞特性に関連したmiRNAをエピジェネティクス異常、薬剤耐性癌幹細胞様細胞に着目した網羅的解析:

癌幹細胞特性を有するmiRNA発現異常の同定:悪性胸膜中皮腫細胞株(NCI-H28, NCI-H290, NCI-H2052, NCI-H2452, MSTO-211H)および申請者が樹立した4株(YUMC8, YUMC44, YUMC63, YUMC64)、正常中皮細胞2株(Met5A, LP-9)を使用した。特に、申請者が樹立した4株については、樹立株として報告を行

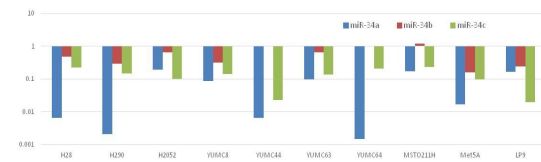
っている(雑誌論文)。これまで、NCI-H290 と MSTO-211H の2株において発現アレイ(Agilent Human miRNA array)を行い、候補miRNA群の絞り込みを行った(下表)。

miRNAs	Fold change to control	
	NCI-H290	MSTO-211H
hsa-miR-886-3p	2298.86	6613.82
hsa-miR-1287	2092.21	42.26
hsa-miR-629*	702.24	41.67
hsa-miR-371-5p	687.41	5.96
hsa-miR-874	568.29	7.43
hsa-miR-134	450.53	6.34
hsa-miR-135a*	427.10	9.96
hsa-miR-142-3p	382.54	603.14
hsa-miR-192	274.68	10.17
hsa-miR-34b*	250.41	4.42
hsa-miR-1208	248.72	287.36
hsa-miR-132	228.62	5.42
hsa-miR-215	206.44	291.31
hsa-miR-663	195.11	7.65
hsa-miR-1226*	179.65	212.81
hsa-miR-513a-5p	160.12	4.67
hsa-miR-299-5p	150.14	6.60
hsa-miR-373*	111.95	118.19
hsa-miR-373	111.00	27.54
hsa-miR-372	101.20	20.67
hsa-miR-492	99.95	138.79
hsa-miR-196a	98.73	229.24
hsa-miR-524-3p	97.09	17.20
hsa-miR-572	90.63	87.82
hsa-miR-9	90.07	54.15
hsa-miR-181a-2*	48.12	46.94
hsa-miR-513b	47.52	151.15
hsa-miR-1181	10.20	8.98
hsa-miR-150*	6.55	8.45
hsa-miR-1915	5.53	6.75
hsa-miR-1207-5p	5.32	4.89

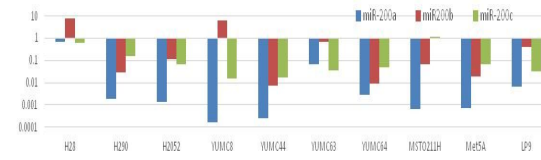
これまで癌幹細胞関連 miRNA として報告のある、miR-34 family に注目してその後の解析を行った。また同時に、これまで癌幹細胞関連 miRNA として報告のある、miR-200 family に注目して検討した。

候補 miRNA の癌幹細胞特性に注目した機能解析と標的メッセンジャーRNA の同定：miR-34 family については、すでに発現ベクターの作成を用いた詳細な検討をこれまで行っており、これ以上の機能解析は行っていない(宗ら、Clin. Cancer Res 2011)。新規候補である miR-200 family (miR-200a と miR-200b と miR200c の3種類の miRNA) について、発現ベクターを作成し、検討した。まず、8種類の中皮腫細胞株と正常中皮細胞2株について、miR-34 family, miR-200 family, Nanog, SOX2, OCT4 の RNA 発現レベル(リアルタイム PCR 法)、ZEB1, N-cadherin, E-cadherin, -catenin, Vimentin, ALDH1A1, Oct3/4 などの幹細胞関連マーカーの発現プロファイル(Western blotting)を確認した。

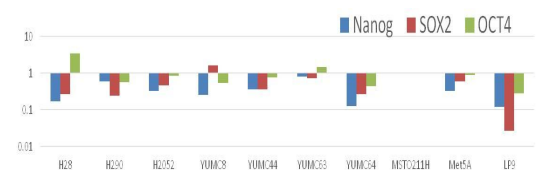
<リアルタイム PCR 法による miR-34 発現プロファイル>



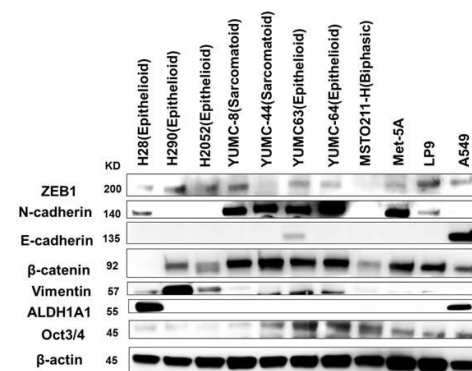
<リアルタイム PCR 法による miR-200 発現プロファイル>



<リアルタイム PCR 法による Nanog/SOX2/OCT4 発現プロファイル>



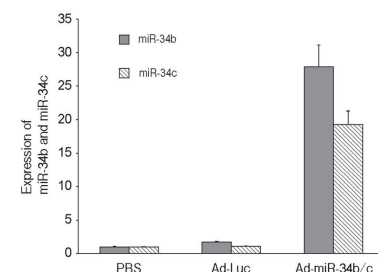
<ウエスタンブロッティング法による発現プロファイル>



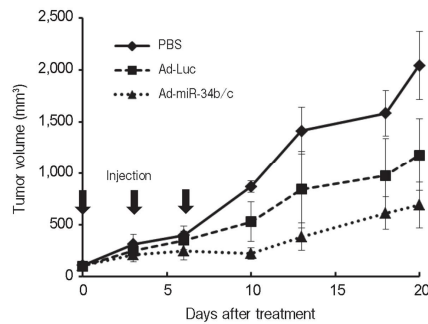
次に、上記細胞株について、発現ベクターのトランスフェクションを行い、トランスフェクション効率を各 miRNA の定量的 PCR 法で確認した。

(2) miRNA の悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討 (in vitro & vivo)：miR-34b/c については、抗腫瘍効果について in vitro にすでに検証済みである。今回、アデノウイルス発現ベクターを作成し、その抗腫瘍効果について in vivo に検証した(雑誌論文)。

<アデノウイルスベクターの発現効率>

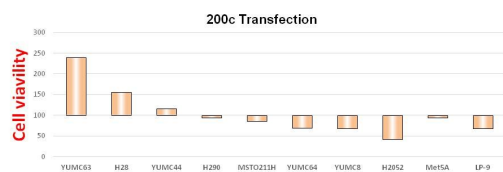


< アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果 >



次に、miR-200 family については、代表的な miR-200c 発現ベクターをトランスフェクションし、*in vitro* に検証した。

< miR-200c 発現ベクターの抗腫瘍効果 >



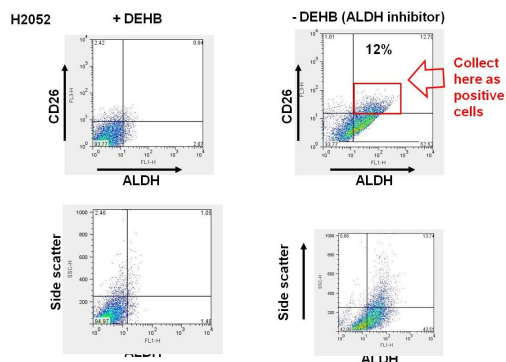
miR-200c 強発現により、一部の中皮腫細胞株で抗腫瘍効果を認めましたが、正常細胞株でも増殖能が低下していた。

また、白金製剤や葉酸拮抗剤への薬剤感受性の変化を検討したが、一定した結果は得られなかった(未公開データ)。

miR-34b/c は標的となり得ると考えられたが、miR-200 は不十分であったため、その他の候補 miRNA 遺伝子を検討したが、これまでの網羅的解析では候補 miRNA 遺伝子の絞り込みが不可能であった。

新規候補 miRNA を検討するために、中皮腫細胞株について、ALDEFLUOR assay と CD26 ラベルにより、細胞ソーティングを行い、幹細胞様細胞群を抽出して、幹細胞様細胞群と残りの細胞群の両方について、miRNA 発現の網羅的解析を行い、比較することで、新たな幹細胞関連 miRNA 候補を絞り込むこととした。

< フローサイトメトリを用いた細胞ソーティングによる幹細胞様細胞群の抽出 >



これまで、NCI-H2052、YMC63、YMC64 について細胞ソーティングを行い、網羅的解析の準備を行っており、今後更なる候補 miRNA の同定を試み、悪性胸膜中皮腫に対する新しい治療法の確立を目指していく。

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)

Suzawa K, Yamamoto H, Murakami T, Katayama H, Furukawa M, Shien K, Hashida S, Okabe K, Aoe K, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Mimura Y, Toyooka S, Miyoshi S. Establishment and molecular characterization of cell lines from Japanese patients with malignant pleural mesothelioma. *Oncol Lett.* 2016 Jan;11(1):705-712. (査読有)

Ueno T, Toyooka S, Fukazawa T, Kubo T, Soh J, Asano H, Muraoka T, Tanaka N, Maki Y, Shien K, Furukawa M, Sakaguchi M, Yamamoto H, Tsukuda K, Miyoshi S. Preclinical evaluation of microRNA-34b/c delivery for malignant pleural mesothelioma. *Acta Med Okayama.* 2014;68(1):23-6. (査読有)

(学会発表)(計 0 件)

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

(その他)

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宗 淳一(SOH, Junichi)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号:90559890

(2)研究分担者

三好 新一郎(MIYOSHI, Shinichiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号:00190827

佃 和憲(TSUKUDA, Kazunori)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号:20346430

豊岡 伸一(TOYOOKA, Shinichi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号:30397880

山本 寛斉 (YAMAMOTO, Hiromasa)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号: 40467733

浅野 博昭 (ASANO, Hiroaki)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号: 70534775