

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430109

研究課題名(和文) 乳癌の治療標的となる幹細胞性維持に関わるmiRNAの探索

研究課題名(英文) Search for miRNAs that regulate stemness of breast cancer stem cell to find therapeutic targets of triple-negative breast cancer.

研究代表者

原口 健 (Haraguchi, Takeshi)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号：10549455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプルネガティブ乳癌細胞株SUM149PTは上皮様のEpCAM+細胞と間充織様のEpCAM-細胞が混在している。本研究においてEpCAM+細胞が高い造腫瘍活性を有すること、miR-200 familyがEpCAM+細胞でのみ高発現していること、miR-200 familyを阻害することによりEpCAM+細胞をEpCAM-細胞へと転換し腫瘍形成能を低下させることを見出した。ドキシサイクリン応答型miRNA阻害ベクターを用いて、腫瘍形成後に腫瘍内においてmiR-200 familyを阻害したところ、腫瘍の縮退が見られた。miR-200 familyが乳癌の有望な治療標的であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Triple negative breast cancer cell line SUM149PT is composed of 2 subpopulations; epithelial-like EpCAM positive (EpCAM+) cells and mesenchymal-like EpCAM negative (EpCAM-) cells. In this study, we found that EpCAM+ cells had strong tumorigenicity and the expression levels of miR-200 family were high in only EpCAM+ cells. When we suppressed the miR-200 family in EpCAM+ cells, conversion of EpCAM+ cells to EpCAM- cells occurred and the tumorigenicity of the EpCAM+ cells was reduced. Furthermore, we developed and used doxycycline-inducible miRNA inhibitory vector to construct EpCAM+ cell in which the activities of miR-200 family can be regulated by doxycycline. After tumor formation in xenograft mice transplanted with these cells, we inhibited miR-200 family and observed tumor regression. These results showed that miR-200 family was promising therapeutic targets of triple negative breast cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：microRNA microRNA inhibitor 癌幹細胞 EMT 乳癌 トリプルネガティブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌組織は癌幹細胞とそこから派生してできる非癌幹細胞からなる不均一な集団であり、癌幹細胞は、癌組織の中でも自己複製能と分化能を併せ持つ細胞であり、癌組織を構成する癌細胞を供給する他に抗癌剤や放射線治療などに対して耐性を示すため、癌の転移や再発の原因となると考えられていた。そのため癌幹細胞を標的とした治療法の開発が癌根絶につながるものと期待されていた。トリプルネガティブ乳癌には有効な治療法が存在しないため、新しい機序による新規治療標的が必要とされていた。

(2) miRNA (microRNA)とは 20-25nt 程度の短い内在性のノンコーディング RNA で、相補な配列を持つ mRNA を認識し、分解や翻訳抑制を行う。miRNA は多くの生物種に存在し、様々な生命現象や癌などの疾患において機能していることが知られていた。癌の増殖や転移能、抗癌剤耐性に関わる miRNA や、癌マーカーとしての miRNA などが報告されていた。

(3) 我々はこれまでに独自の二次構造を持ち、特定の miRNA を効果的にかつ特異的に阻害するデコイ RNA である TuD RNA (Tough Decoy RNA)および、これを PolIII プロモーターから高発現するカセットを設計し、これを搭載したウイルスベクターを開発してきた。さらに我々はこの TuD RNA 発現ベクターが従来の miRNA 阻害ベクターと比べ、はるかに高い miRNA 抑制能を有していることを示してきた。

2. 研究の目的

癌幹細胞において特異的な発現パターンを示す miRNA の中には幹細胞性維持において重要な役割を果たしている miRNA が含まれる可能性がある。本研究の目的は乳癌幹細胞において発現が高い miRNA を選定し、これらに対して miRNA 阻害ベクターを用いてスクリーニングを行い、乳癌幹細胞の幹細胞性を喪失させる miRNA を探索し、治療標的としての有効性を評価することである。

3. 研究の方法

(1) 上皮様の EpCAM+細胞と間充織様の EpCAM-細胞が混在しているトリプルネガティブ乳癌細胞株 SUM149PT を用いた。EpCAM+細胞と EpCAM-細胞を分離し、造腫瘍活性、miRNA 発現パターンなど細胞の性質の解析を行った。

(2) テトラサイクリン応答型 miRNA 阻害ベクターの開発を行った。miRNA 阻害ベクターに最適なプロモーターを選定するために、PolIII 系プロモーターを比較検討した。最適なプロモーターを基盤としてテトラサイクリン応答配列の数や位置について検討を行

った。

(3) テトラサイクリン応答型 miRNA 阻害ベクターを導入した SUM149PT- EpCAM+細胞をマウスに移植し、腫瘍形成後にテトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリンをマウスに投与し、腫瘍体積の経時変化を観察した。

4. 研究成果

(1) EpCAM+細胞が高い造腫瘍活性を有すること、miR-200 family が EpCAM+細胞でのみ高発現していること、miR-200 family を阻害することにより EpCAM +細胞を EpCAM -細胞へと転換し腫瘍形成能を低下させることを見出した。

(2) miRNA 阻害ベクターに最適なプロモーターとして h7SK プロモーターのエンハンサー配列を改変したプロモーター (e7SK と名付けた) を開発した (図 1)。これを基盤としてテトラサイクリン応答配列の数、位置の異なる 10 種類のプロモーター (Tet-e7SK1-10) について検討を行った (図 2)。テトラサイクリンの誘導体であるドキシサイクリンの非存在下では漏れがなく、ドキシサイクリン存在下では高い miRNA 阻害能を発揮した Tet-e7SK6 が Tete7SK プロモーターと名付けた (図 3)。Tete7SK プロモーター駆動 TuD RNA 発現ベクターの miRNA 阻害活性は極めて高いドキシサイクリン濃度依存性を示した (図 4)。

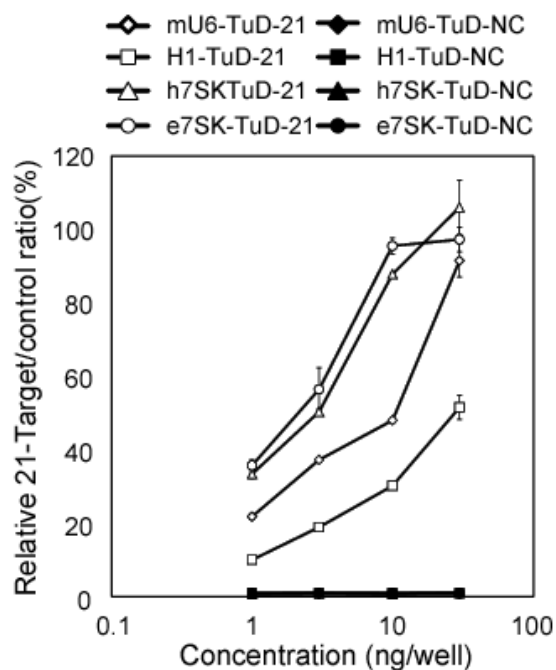


図 1 miRNA 阻害ベクターに適した PolIII 系プロモーターの比較検討

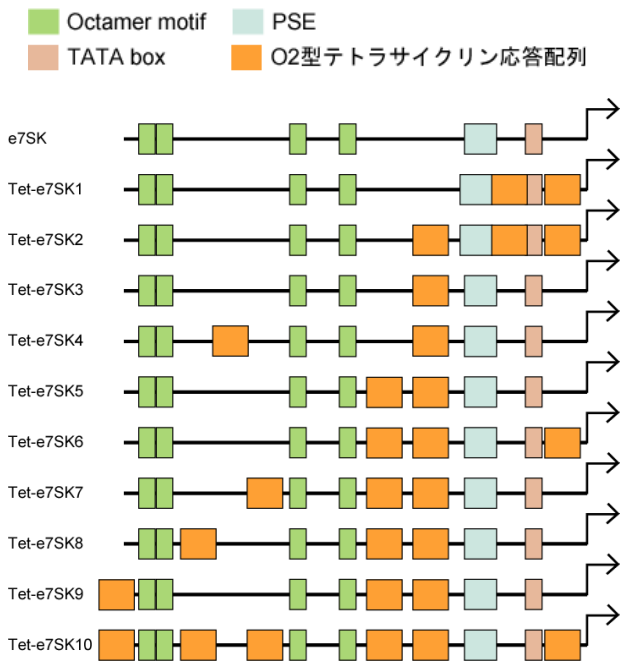


図2 e7SK プロモーターにおけるテトラサイクリン応答配列の数、位置の検討

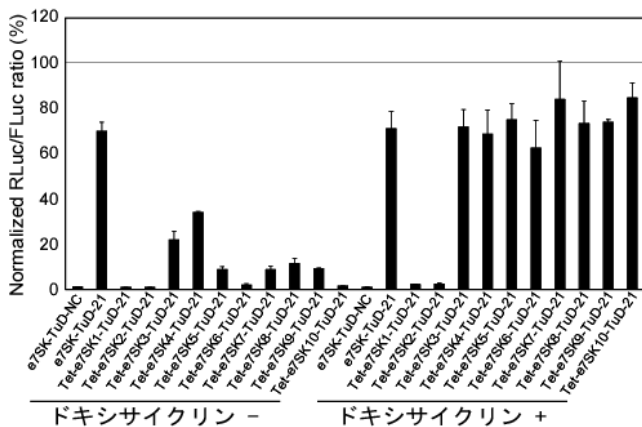


図3 テトラサイクリン応答型 PoIIII 系プロモーターの比較検討

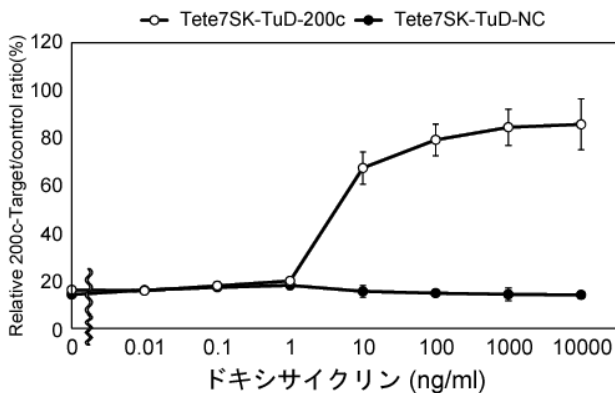


図4 テトラサイクリン応答型 PoIIII 系プロモーター駆動 TuD RNA 発現ベクターの miRNA 阻害活性のドキシサイクリン濃度依存性

(3) テトラサイクリン応答型 miRNA 阻害ベクターを用いて、腫瘍形成後に腫瘍内において miR-200 family を阻害したところ、腫瘍の縮退が見られた。miR-200 family が乳癌の有望な治療標的であることが示された。

(4) Weinberg 博士らのグループらによって、乳癌において間充織様の細胞集団が癌幹細胞性を示すことが報告されていた。本研究によって、それまでの報告とは異なる結果が得られ、トリプルネガティブ乳癌の新規標的を示した点において重要である。

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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hiramatsu, H, Kobayashi, K, Kobayashi, K, Haraguchi, T, Ino, Y, Todo, T, Iba, H. The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells Sci Rep. 2017 Apr 18;7(1):889. doi: 10.1038/s41598-017-00982-3, 査読有り

Haraguchi, T, Kondo, M, Uchikawa, R, Kobayashi, K, Hiramatsu, H, Kobayashi, K, Chit, UW, Shimizu, T, Iba, H. Dynamics and plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by miR-200 family inhibition Sci Rep. 2016 Feb 18;6:21117. doi: 10.1038/srep21117. 査読有り

Kobayashi K, Sakurai K, Hiramatsu H, Inada K, Shiogama K, Nakamura S, Suemasa F, Kobayashi K, Imoto S, Haraguchi T, Ito H, Ishizaka A, Tsutsumi Y, Iba H. The miR-199a/Brm/EGR1 axis is a determinant of anchorage-independent growth in epithelial tumor cell lines. Sci Rep. 2015 Feb 12;5:8428. doi: 10.1038/srep08428. 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

小林 和善、平松 寛明、小林 郷介、原口 健、伊庭 英夫、Brm 型 SWI/SNF 複合体は転写因子 SRF の MKL1 依存的な活性を抑制することにより細胞の上皮性を維持している、第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

平松 寛明、小林 和善、小林 郷介、原口 健、稲生 靖、藤堂 具紀、伊庭 英夫、グリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持における SWI/SNF クロマチン構造変換複合体の役割、第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

内川 亮、原口 健、近藤 正幸、小林 和善、伊庭 英夫、トリプルネガティブ乳癌の腫瘍形成能に関わる microRNA の同定、第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

伊庭 英夫、小林 和善、平松 寛明、櫻井 浩平、稲田 健一、堤 寛、原口 健、SWI/SNF クロマチン構造変換因子と miRNA の視点に立った上皮癌の遺伝子制御ネットワークの理解、第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8 日(木)~10 日(土)、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

原口 健、近藤 正幸、伊庭 英夫、2 種の miRNA 阻害による乳癌幹細胞の造腫瘍能の抑制、第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8 日(木)~10 日(土)、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

近藤正幸、原口健、伊庭英夫、新規 TuD RNA 発現レンチウイルスベクターを用いた miR-200c の発現制御による EMT の分子機構の解析、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日(火)~27 日(木)、パシフィコ横浜

(神奈川県横浜市)

原口健、近藤正幸、伊庭英夫、Analysis on EMT using Tetracycline-inducible microRNA inhibitory vectors against miR-200c、第 73 回日本癌学会学術、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等
千葉大学真菌医学研究センター
RNA 制御プロジェクト
<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/iba.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 健 (HARAGUCHI, Takeshi)
千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教
研究者番号: 10549455

(2) 研究分担者

伊庭 英夫 (IBA, Hideo)
千葉大学・真菌医学研究センター・特任教授
研究者番号: 60111449