

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670605

研究課題名(和文) 癌リプログラミングによる大腸発癌モデルにおけるエピジェネティクス修飾の役割解明

研究課題名(英文) Role of epigenetic modification by cancer reprogramming in colon tumorigenesis model

研究代表者

山本 浩文 (Yamamoto, Hirofumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30322184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：microRNAは癌研究の分野で近年注目されており、その制御異常が癌関連分子の発現異常を引き起こすことが知られている。当教室ではmiR-200c, 302, 369の3つのmiRが、iPS細胞に代表される細胞の若返りを誘導し、癌細胞では悪性度を低下させることを報告した。本研究では大腸腫瘍自然発生マウスを用いて、腫瘍が発生する途中の段階で上記miRを投与すると、腫瘍の発生数が抑制された。また、また大腸粘膜において細胞死に關与するp53遺伝子を誘導するMAF遺伝子の発現が増加していた。家族性大腸腺腫症の患者へのこのmiRの導入によって腫瘍発生が抑制される可能性があり今後の治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miR) is an attractive modulator in the field of cancer research, and it is known that its aberrant expression causes dysregulation of cancer-related genes. We previously reported that introduction of miRs (miR-200c, 302, 369) in colon cancer cells displayed an ability to change epigenetic profiles to the pluripotent state, and inhibited malignant features, including cell proliferation, chemoresistance, and tumorigenicity. In this study, we found that administration of the miRs suppressed the incidence of tumors in vivo in the course of tumorigenesis of CPC/Apc mouse, a mouse model of adenoma-carcinoma progression. In addition, these miRs increased expression of MAF gene, an inducer of apoptosis-related gene p53 in the normal mucosa. In vitro experiments supported the hypothesis that MAF behaved as a tumor suppressor in the p53-dependent mechanism.

研究分野：消化器癌

キーワード：microRNA miR-200c miR-369 miR-302 CPC/Apc mouse MAF P53

1. 研究開始当初の背景

2006年、Yamanakaらの研究グループにより、マウスの線維芽細胞に4種類の転写因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC:山中4因子)をレトロウイルスベクターで形質導入すると、多分化能を持った細胞が作成可能であることが報告され、iPS細胞(induced pluripotent stem cell)と名付けられた。2007年にはヒト線維芽細胞からも同様にiPS細胞の樹立に成功した。つまり、正常に分化した細胞を多分化細胞へ「リプログラミング(分化細胞の幹細胞化)」することでiPS細胞は樹立されるが、この本質はエピゲノムの変化にあると考えられている。

このリプログラミングを当科では2009年よりヒトの癌細胞に応用することで、癌細胞の所有する増殖能、浸潤能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能を低下させうることを報告し(Miyoshi et al. PNAS 2009)、癌リプログラミング療法として現在研究を進めている。リプログラミングされた癌細胞、iPC細胞(induced pluripotent cancer cells)はiPS細胞と同様にエピゲノムの変化を認め、悪性度の低下はエピゲノムの変化によるものであると考えられた。一方で、ウイルスベクターを用いるリプログラミングはgenome integrationによる二次的癌化のリスクを排除できない。そこで、我々は、エピゲノム調節因子であるmicroRNAを3種類(miR-200c, 302, 369)導入することで脂肪幹細胞や皮膚繊維芽細胞をリプログラミングすることに成功した(Miyoshi et al. Cell stem cell 2009)。このmicroRNAによるリプログラミングをヒト癌細胞に応用し、ヒト大腸癌細胞株(HT-29)へmiR-302sを導入することで、in vitroにおいてiPS-likeの形態を有するOCT3/4, SOX2高発現の細胞へと変化した。免疫不全マウスにおけるin vivo実験においては、尾静脈からmiR-302を全身投与することで腫瘍増殖能の低下を

認めた。またmiR-302, 369を投与した腫瘍は免疫染色によりOCT3/4, SOX2高発現を確認し、エピゲノムの変化をH3K4メチル化増加により確認した(Ogawa et al. PLoSOne 2015)。

2. 研究の目的

大腸癌自然発生マウスであるCPC-Apcマウス(CDX2P-NLS Cre;Apc^{+loxP}マウス:Hinoi et al. Cancer Res 2007, Hinoi et al. Nature Methods 2008)を用いて、大腸癌発癌の過程におけるmicroRNAによる癌リプログラミングが分子レベルでどのような影響を与えるのかを調べることにした。すなわち、CPC-Apcマウスを用いて腺腫の発症、癌化への抑制が可能か、その際のメカニズム解析を行うことを研究の目的とする。

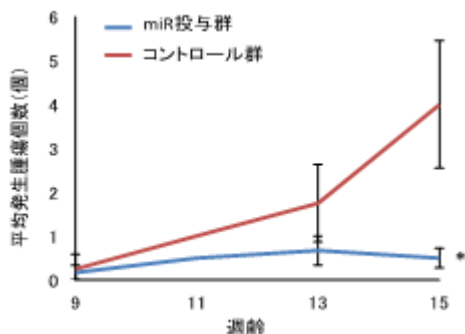
3. 研究の方法

- (1)マウス大腸癌細胞株において癌リプログラミング療法を施行する。
- (2)大腸癌自然発生マウスでの癌化の過程で癌リプログラミング療法を施行し、癌化に対する影響、治療効果を検討する。
- (3)遺伝子発現マイクロアレイ、microRNAマイクロアレイにより、治療前後で遺伝子レベル、microRNAを中心としたエピゲノムにどのような変化が生じているかを網羅的に解析する。
- (4)網羅的解析から得られた遺伝子発現、エピゲノムの変化をin vitroにおいて確認する。癌の悪性度に寄与する機構を明らかにすることで、新規癌治療法としての癌リプログラミング療法の開発へとつなげる。

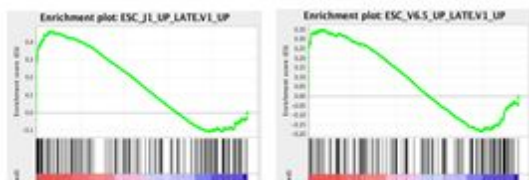
4. 研究成果

リプログラミングを誘導するmicroRNAとしては、miR-200c, 302, 369の3種類、詳細に分類するとmiR-302a, miR-302b, miR-302c, miR-302d, miR-369-3p,

miR-369-5p, miR-200c の計 7 種類を使用した。マウスは 2007 年に Hinoi らが報告した CDX2P-NLS Cre;Apc^{+loxP} マウス (CPC-Apc マウス) を用いた (Hinoi T, et al. Cancer Res. 2007)。CPC-Apc マウスに、8 週齢から 15 週齢まで週 3 回のペースで合計 24 回、上記 7 種類の microRNA を 25ug ずつ尾静脈より投与した。Drug delivery system としては、2015 年に我々が報告した Super carbonate apatite を使用した (Wu et al. PLoSOne 2014)。癌化の過程の観察として、小動物用大腸内視鏡検査を 9 週齢、13 週齢の時点で施行し、15 週齢で解剖して大腸の正常粘膜、腫瘍を摘出した。造腫瘍能の評価として腫瘍個数を比較したところ、microRNA 投与群は microRNA 非投与群と比較して有意に少なく、7 種類の microRNA を投与することによる腫瘍抑制効果が明らかになった (図)。

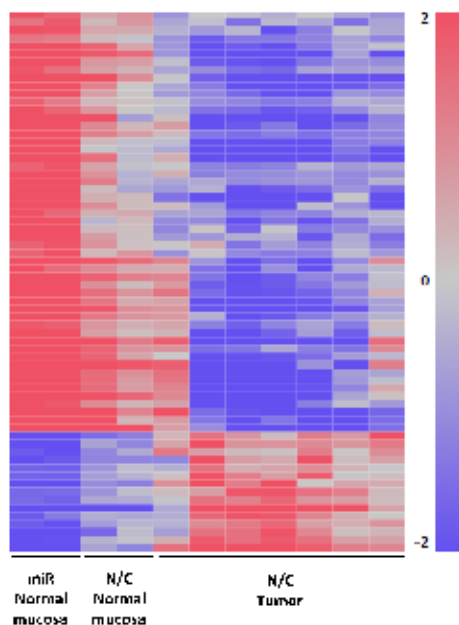


そこで、miR 投与群と control 群の背景粘膜、および腫瘍部について、遺伝子発現マイクロアレイで網羅的に解析を行った。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行ったところ、control 群の腫瘍部では、背景粘膜と比べると腫瘍発生や増殖に関連する遺伝子群が変動していた。また、miR 投与群の背景粘膜では、control 群と比べると ES 細胞に関連する遺伝子群が変動していた。

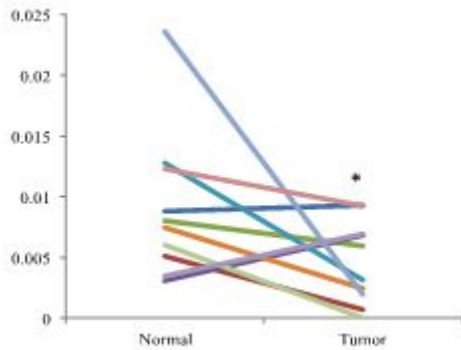


なお、両群間の腫瘍部の比較では、遺伝子プロファイルは類似しており、miR によって背景粘膜の遺伝子プロファイルが変動することで、APC ノックアウト誘導性の腫瘍発生が抑制されたと考察された。

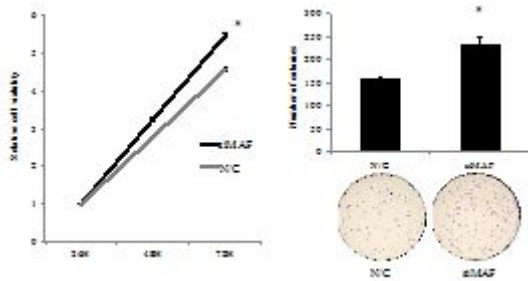
具体的に変動する遺伝子として、miR 投与群の背景粘膜と control 群の背景粘膜、control 群の腫瘍部で、段階的に発現が増加、あるいは減少する遺伝子として 68 個を同定した。



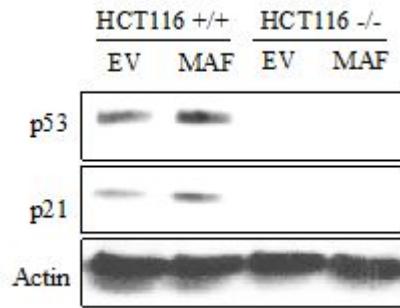
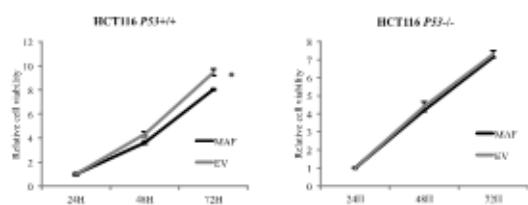
そのうち、miR マイクロアレイで変動する miR と seed 配列で一致する遺伝子を 7 個認め、既存の報告で転写因子として知られる MAF 遺伝子について研究を進めることとした。当教室で切除した大腸癌患者の臨床検体において、MAF の発現は正常部と比較して癌部で発現が低下していることが示され、癌抑制遺伝子としての機能を有している可能性が示唆された。



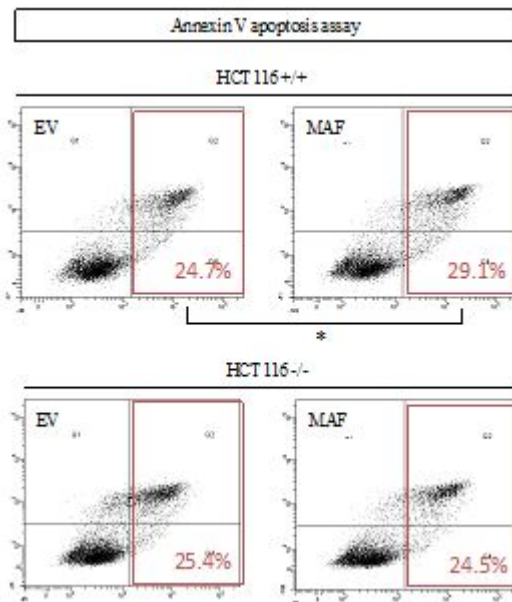
In vitro の実験として、まずラットの小腸上皮細胞株 IEC18 において MAF のノックダウンを行った。MAF をノックダウンすると細胞増殖能、コロニー形成能が増加することが示され、臨床検体から示唆された MAF の癌抑制遺伝子としての特性を確認することができた。



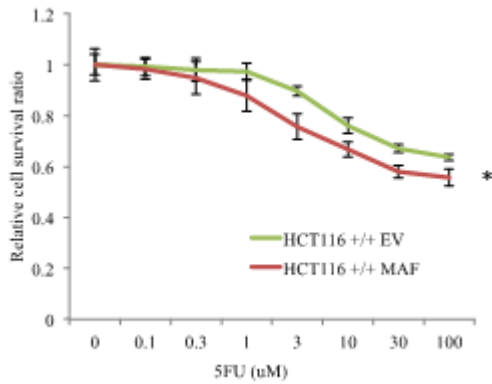
ここで過去の論文検索を行った。MAFがP53の転写を促進するという報告 (Tracy K. Hale, et al. JBC. 2000) に基づき、大腸癌細胞株 HCT116(P53 wild type)とHCT116(P53 null type)を用いてMAFの強制発現を行った。MAFを強制発現すると、HCT116 (P53 null type) では細胞増殖能は変わらない一方、HCT116 (P53 wild type) ではp53, p21の発現が増加し、細胞増殖能が低下した。つまり、P53の発現ステータスにより、MAFの強制発現の影響に差異があり、MAFがP53を制御している可能性を大腸癌で初めて示した。



MAF によって P53 が誘導されることから、MAF のアポトーシスへの影響を調べることとした。Annexin V を用いた apoptosis アッセイでは、HCT116 (P53 null type) ではアポトーシス細胞の割合は変わらないが、HCT116 (P53 wild type) では有意に増加した。



ウェスタンブロッティングにより、cleaved PARP の発現増加も示され、MAF が p53 を介してアポトーシスを誘導することが示された。この結果に基づいて、化学療法の感受性に変化を生じる可能性を考え、5-FU への感受性試験を行ったところ、MAF 強制発現株 (HCT116 P53 wild type) において、感受性の増強を認めた。



以上の結果から、大腸癌自然発生マウスにリプログラミングを引き起こすことで知られる microRNA (miR-200c, 302, 369) を投与すると、腫瘍発生が抑制され、そのメカニズムとしては、MAF 発現増加による P53 を介したアポトーシスの誘導が関与している可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

発表者：T Hata, H Yamamoto, D Okuzaki, H Ogawa, M Konno, H Takahashi, N Haraguchi, J Nishimura, T Hata, I Takemasa, T Sato, T Mizushima, H Ishii, Y Doki, M Mori

題名：Epigenetic alterations by microRNAs in carcinogenesis of colorectal cancer

学会名：69th Annual Cancer Symposium of the Society of Surgical Oncology (SSO 2016)

発表年月日：2015/3/3-2015/3/4

発表場所：Boston, Massachusetts, USA

[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

山本 浩文 (YAMAMOTO, Hirofumi)

大阪大学医学系研究科・教授

研究者番号：30322184

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：