The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells
Author(s)	古賀, 睦人
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/50503
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	古賀　睦人
論文題名 Title	Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells （miR-302を用いたリプログラミング手法による肝細胞癌の治療応用への検討）

〔目　的 (Purpose)〕

肝細胞癌は根治肝切除を施行しても高率に残肝再発をきたす．このような再発巣に対しては肝動脈化学塞栓術などの局所療法を反復施行することになるが、その過程の中で治療抵抗性を示すようになり，癌死に至る症例も少なくない．そこでわれわれは，この治療抵抗性を解決する手段の一つとして癌細胞へのリプログラミングの応用に着目した．教室では、これまで大腸癌細胞株がinduced pluripotent stem cells (以下iPS細胞）の作成に用いられた4つの転写因子（Oct4, Sox2, KLf4, c-Myc）の導入による細胞形態の変化，腫瘍形成能の低下や化学療法感受性の改善について報告してきた．しかしこの手法では導入にウイルスベクター使用によるゲノム配列への影響や，癌原遺伝子であるc-Mycによる腫瘍化のリスクがあるため，さらにノンコーディングRNAの1種であるmicroRNA（以下miRNA）を使用するリプログラミング手法を開発した．本研究では，肝癌細胞株においてこの方法を応用し，肝細胞癌に対する影響について検討した．

〔方法 (Methods)〕

肝癌細胞株6種（PLC/PRF/5（以下PLC）, HuH7, HLE, HLF, HepG2, Hep3B）を用いた．まずEmbryonic stem cells（以下ES細胞）とiPS細胞の両者に共通して高発現していた3つのmiRNA（miR-200c, miR-302, miR-369）の発現を調べることで導入候補のmiRNAを検討した。リプログラミングのプロトコールについては，Lipofection法にてmiRNAを導入し，ES細胞用培地で約3週間培養を行い、その評価についてはアルカリフォスファターゼ（AP）活性染色と定量的PCRおよび細胞免疫染色を用いて，未分化マーカーとしてNanog, Oct3/4, Sox2, REX1の発現と分化誘導後のマーカーとしてGfap・Tubb3（外胚葉），Fabp4・αSMA（中胚葉），Alb（内胚葉）の発現を確認した．リプログラミングによる肝癌細胞株への影響については，細胞増殖やアポトーシス，抗腫瘍薬である5-FUとインターフェロン(IFN)-αに対する感受性について検討した．最後にこれらの変化を及ぼした因子の探索として、導入したmiRNAの標的遺伝子に関するメカニズムの解析を行った．

〔成績 (Results)〕

肝癌細胞株においては，導入候補となるmiRNAの中で，miR-200cとmiR-369が高発現であり，miR-302のみが低発現であった．この結果に基づき肝癌細胞株にmiR-302を導入し培養すると，PLC, HLE, およびHepG2においてiPS細胞類似の細胞塊の出現を認めた．いずれの細胞塊も，AP活性と未分化マーカーの発現に加えて，分化誘導後には，三胚葉すべてにおける分化マーカーの発現を認めた．そこで本研究ではこのような細胞塊をiPS細胞類似細胞塊と定義した。

これらのiPS細胞類似細胞塊は，緩徐な増殖を示し，細胞周期関連タンパク質であるCDK2の発現低下とアポトーシスの誘導，さらにはmiR-29bの発現上昇とその標的遺伝子である抗アポトーシス蛋白Mcl-1の発現低下をともなっていた．また5-FU，IFN-αに対する感受性は改善し，教室で樹立したIFN-α耐性株（PLC）においても，同様の結果を確認した．

さらに，miR-302の標的遺伝子の一つであるヒストン脱メチル化酵素AOF2の発現低下と，その標的であるヒストンH3のリジン残基（H3K4）のメチル化を認めた．親株におけるAOF2の抑制実験ではH3K4のメチル化に加えて，薬剤感受性の改善およびc-Mycの発現低下を認めた．これらの現象はmiR-302を導入して得られた細胞塊と同様であった．

〔総　括 (Conclusion)〕

肝癌細胞株に対して，miR-302を導入因子としてリプログラミングを行うことで，H3K4のメチル化とAOF2の発現低下を介して薬剤感受性が改善した．以上より，この手法は肝細胞癌に対する新規治療開発の一つとなる可能性が示された．

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）	古賀睦人		
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	森正樹
	副　査	大阪大学教授	竹原徹郎
	副　査	大阪大学教授	野口夏三郎

論文審査の結果の要旨

肝細胞癌に対する新規治療法の開発を目的として，microRNAを用いた体細胞のリプログラミング手法応用の可能性について検討した．ES細胞とiPS細胞の両者に共通して高発現するmiR-302を，肝細胞癌株に導入しES細胞用培地で培養すると，iPS細胞類似の細胞塊の出現と未分化マーカーの発現，さらに分化誘導による3胚葉への分化を示した．また，これらの細胞塊は薬剤感受性の改善を認め，この改善は同一手法を用いた薬剤耐性株においても認められた．さらにリプログラミング後にはmiR-302のターゲットの一つであり，ヒストンH3における4番目のリジン残基（H3K4）の脱メチル化酵素であるAOF2の発現が低下し，H3K4のメチル化と癌原遺伝子であるc-Mycの発現抑制がもたらされていた．以上より，miR-302を用いたリプログラミング手法は，H3K4のメチル化とc-Mycの発現抑制を伴ったAOF2の発現低下を介して薬剤感受性を改善し，肝細胞癌の新規治療開発の一つとなる可能性が示されており、学位に値すると考える。