



Title	MicroRNAs Induce Epigenetic Reprogramming and Suppress Malignant Phenotypes of Human Colon Cancer Cells
Author(s)	小川, 久貴
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53908
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	小川 久貴
論文題名 Title	MicroRNAs Induce Epigenetic Reprogramming and Suppress Malignant Phenotypes of Human Colon Cancer Cells (マイクロRNAはヒト大腸癌細胞株のエピゲノムを初期化し悪性形質を抑制する)
論文内容の要旨	
〔目的〕 2006, 2007年にYamanakaらにより人工多能性幹細胞(iPS細胞)が報告された(Takahashi and Yamanaka et al. Cell 2006, 2007)。iPS細胞作成過程: リプログラミングにより細胞のエピゲノムが変化しその結果、遺伝子発現パターンは大きく変化する。当科ではこの点に注目し1、癌細胞のリプログラミングにより、多能性を有する低悪性度な細胞群へと変化的すること(Miyoshi et al. PNAS 2009) 2、ウイルスベクターを用いない、miRNA(miR200c, 302s and 369s)によるリプログラミング手法の開発(Miyoshi et al. Cell stem cell 2009)を報告してきた。今研究ではin vitro, in vivoでの大腸癌細胞株におけるmiRNAによる“癌リプログラミング療法”の有用性を検討することを目的とした。 〔方法〕 miRNAトランスフェクションプロトコルを確立し、リプログラミングにより作成培養された細胞塊の悪性度の変化を細胞実験(増殖アッセイ、抗癌剤感受性アッセイ、アルカリフォスファターゼ 活性アッセイ、蛍光免疫染色、qRT-PCR、エピゲノム解析)で検討した。次にmiRNAのanti-oncomiRとしての作用を細胞実験(増殖アッセイ、細胞周期アッセイ、細胞蛍光免疫染色、qRT-PCR、Western Blotting、ルシフェラーゼアッセイ、浸潤アッセイ、アポトーシスアッセイ)で検討した。ついでxenograft皮下腫瘍モデルにおいて癌リプログラミング療法の有効性を検討した。皮下腫瘍増殖曲線、皮下腫瘍遺伝子発現解析、組織学的検討、エピゲノム解析を行った。副作用に関してはマウス体重、血液検査、RES系のHE染色で検討した。またmiRNA delivery systemとしては当科で開発している炭酸アパタイト(Xin wu et al, PLoS ONE 2015)をin vitro, in vivoで用いた。 〔成績〕 皮下腫瘍における腫瘍血管のanti-CD31抗体を用いた検討およびヒトES細胞、iPS細胞と類似した遺伝子発現パターンとなるNTERA2と比較したmiRNA発現量の検討の結果、HT29に対するmiR302s単独およびmiR302s369s併用のmiRNAトランスフェクションプロトコルを確立した。培養の結果、HT29はヒトES細胞に形態の類似した細胞塊へと形態変化を認め、多能性マーカーであるAP活性およびOCT3/4, SOX2, NANOGの発現増加を認めた。これらの細胞塊はqRT-PCR法でもmiR302s, OCT3/4, SOX2 mRNAの発現を確認し、分化アッセイにより腸型形質マーカーであるMUC2, VILLINの発現低下を認めた。細胞機能解析において、これらの細胞塊は親株と比較して、細胞増殖速度は低下し、5-FU抗癌剤感受性も改善していた。関連遺伝子であるC-MYC, CDK2発現の低下および間葉上皮転換を認めたため、癌リプログラミングによるエピゲノム変化を検索したところ、DNAメチル化関連遺伝子AOF1, MECPI/2の発現低下それに伴うDNAのグローバルな脱メチル化、特に癌抑制遺伝子の脱メチル化を認めた。またmiRNA導入により癌の性質が大きく変化的することで、細胞死の誘導、増殖抑制効果を認めた。これらは癌治療の観点から非常に重要な点であり、miR302s, miR369sのanti-oncomiRとしての作用を検討した結果、① miR302s, miR369sにより細胞形態がspindle-shapeからround shapeへと移行しこれらのmiRNAは単独でも間葉上皮転換を誘導することがわかった。② 細胞死に関して、miR302sのMCL-1翻訳抑制によるアポトーシス誘導能を示した。③ 細胞周期解析によりmiR302sはCDK2, CDK4, CyclinD1翻訳抑制によるG1-S arrestを引き起こすことがわかった。以上の細胞実験によりmiR302sは単独もしくはmiR369s併用により癌リプログラミング、間葉上皮転換、アポトーシス、G1-S arrestと抗癌細胞作用を有することがわかった。Xenograft皮下腫瘍モデルにおける検討では、miR302s単独、miR302s369s併用両者ともにmiR投与群はNC群、生食投与群と比較して有意差を持って腫瘍増殖の抑制を認め、HE染色で局所的な核の変性した領域を認め、同部位はTUNEL染色によりアポトーシスであることを確認した。免疫染色でKi-67index低下を認め、細胞実験と同様な癌細胞の性質の変化(OCT3/4, SOX2の発現上昇かつMUC2, VILLIN発現低下)を認めた。さらには腺癌組織を示す指標であるAlcian blue染色による粘液産生の低下、CK20発現の低下を認めた。エピゲノム解析においては腫瘍組織においてもAOF1, MECPI/2低下やこれらによるグローバルなH3K4メチル化の増加を認めた。またHE染色でみたRES系への副作用は特に認めず、血液検査上、マウスの体重推移でも特に副作用は認めなかった。 〔総括(Conclusion)〕 miRNAを用いた癌リプログラミングにより大腸癌細胞株のエピゲノムは変化し、in vitro, in vivoにおいて癌の悪性度の低下が認められた。miR302s, 369sの有する間葉上皮転換、アポトーシス、G1 S arrest誘導作用と相まって、miRNAによる癌リプログラミングは新規癌治療法になりうる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		小川 久貴	
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	森 正 樹
	副 査	大阪大学教授	奥 村 明之進
	副 査	大阪大学教授	木 村 正

論文審査の結果の要旨

今研究の目的はノーベル医学賞に輝いた京都大学山中伸弥教授らにより報告された人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作成過程を応用した癌細胞のリプログラミングが悪性度を与える変化を細胞レベル、個体レベルで検討したものである。遺伝子導入ではなくmiRNAを用いるリプログラミングを採用し、かつ貴研究室で開発している核酸デリバリーシステムである炭酸アパタイト（Xin Wu et al. PLOS ONE 2015）を用いており臨床応用を見据えた非常に優れた研究である。申請者は先行研究を参考に、リプログラミングを誘導可能なmiRNAを決定し、これらmiR302s単独及び369s併用投与により 1、大腸癌細胞株をリプログラミングし、作成された細胞塊は悪性度が低下すること 2、miRNA自体の有するanti-oncomiRとしての翻訳抑制効果があること 3、xenograft皮下腫瘍モデルにおいて癌リプログラミング療法の有効性があること 4、癌のリプログラミングでエピゲノムの変化が伴うこと をあきらかにした点で学位に値するものと認める。