OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer
Author(s)	宮﨑, 進
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53914
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	宮﨑　進
論文題名 Title	A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer （マイクロRNAを用いた大腸癌のリプログラミング治療）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

2006年に体細胞に4つの転写因子（*Oct3/4, Sox2, c-Myc,* and *Klf4*）を導入することによりinduced pluripotent stem cell（iPS細胞)が誘導できることが初めて報告された。2010年には当教室から4つの転写因子を癌細胞に遺伝子導入することによって癌細胞からinduced pluripotent cancer cell（iPC細胞)が誘導できることを報告した。iPC細胞は3胚葉に分化し多能性をもつこと、更にiPC化した大腸癌細胞株（DlD-1）では5-fluorouracil （5-FU）への薬剤感受性が高まり、腫瘍形成能が低下することが明らかとなった。しかし、遺伝子導入による癌細胞のiPC化は，臨床的には安全性や発癌性の面で問題も多い。2011年当教室では数種類のマイクロRNAを細胞にトランスフェクトすることでヒト脂肪幹細胞をリプログラミングし、分化多能性を持つ細胞を誘導することに成功した。同様の手法で癌細胞をリプログラミングし、癌細胞の悪性度が減弱するかどうかを検討する。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

mir-302a-d, 369-3p, -5p, mir-200cのうち細胞株によって低発現のマイクロRNAをリポフェクタミンを用いて3回大腸癌細胞株（DLD-1、RKO、HCT116）にトランスフェクトし、30日間培養した。

各細胞株は時間経過とともに細胞集塊を形成し、ES(Embryonic stem)細胞によく似た細胞形態に変化した。またそれらの細胞では*Nanog, Oct3/4, SOX2, Klf4*などの未分化マーカーが上昇し、ES細胞の表面マーカーであるOCT4やTra-1-60が陽性となった。これらの細胞を分化誘導すると神経分化マーカーや脂肪分化マーカーの上昇が確認でき、胚葉を越えた分化が認められた。マイクロRNAを用いてリプログラミングを行い、miRNA-induced pluripotent cancer cells(miPC細胞)が誘導できていることが確認出来た。大腸癌細胞株（DLD-1）から誘導したmiPC細胞の悪性度を評価すると親株やコントロール株と比較して細胞増殖能の低下や、抗癌剤である 5-FUの感受性の増強も確認された。

悪性度の低下が認められるメカニズムとしては①癌抑制遺伝子である$p16^{INK4A}$と$p21^{WAF1}$の発現が親株やコントロール株に比べて発現上昇していること、②薬剤感受性を増悪させるmultidrug resistance associated protein(MRP)の発現が低下していること、③癌遺伝子である*c-myc*の発現が低下していることなどが考えられた。癌遺伝子である*c-myc*の発現はiPS細胞では上昇しており、iPS細胞を分化誘導する過程で、腫瘍形成の原因と考えられている。2010年に我々が報告した4つの転写因子を導入し、誘導するiPC細胞においても親株と比較して*c-myc* の発現は上昇しており、腫瘍形成の誘因となる可能性があるが、マイクロRNAを用いてリプログラミングする方法では*c-myc*の発現は逆に低下していた。さらに*c-myc*の発現低下のメカニズムを検討するために*c-myc*を標的としているマイクロRNA（mir-34a、mir-145）の発現を検証したところ、大腸癌細胞株（DLD-1）から誘導されたmiPC細胞では親株、コントロール株と比較して有意にmir-34a、mir-145の発現上昇を認めた。

〔総　括(Conclusion)〕

マイクロRNAによる癌細胞のリプログラミングによって大腸癌細胞の悪性度が低下することが明らかになった。4つの転写因子をホストゲノムに導入する方法はリプログラミング後に発癌するリスクが指摘されているが、マイクロRNAを用いて癌細胞をリプログラミングする方法はゲノムへの挿入がなく安全な新しい癌治療となる可能性が示唆された。

1686文字

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　宮崎　進

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 俊介
副　査	大阪大学教授	小川 和秀

論文審査の結果の要旨

癌細胞に山中4因子（Oct3/4、Sox2、c-myc、Klf4）の遺伝子導入による癌細胞の初期化（リプログラミング）については過去に報告されている。しかし、この方法は発癌の問題を含み臨床応用には問題がある。今回、遺伝子の核内への組み込みを避ける為に、 マイクロRNAを用いて癌細胞をリプログラミングすることで安全性を確保し、癌細胞の悪性度が減弱するかを検討した。

3種類のマイクロRNA（mir-302a-d, 369-3p, -5p, mir-200c）を導入した癌細胞は未分化性・多能性を獲得した。また、細胞増殖能の低下や、抗癌剤である 5-FUの感受性の増強も確認できた。山中４因子を用いた場合、癌遺伝子*c-myc*の発現上昇は避けられないが、マイクロRNAを用いることで *c-myc*遺伝子発現が低下した。

マイクロRNAによる癌細胞のリプログラミングは安全な新しい癌治療となる可能性があり、本研究は学位に値すると考えられる。