

Title	Functional assessment of miR-1291 in colon cancer cells
Author(s)	Wang, Jiaqi
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87941
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (Wang Jiaqi)

Title

Functional assessment of miR-1291 in colon cancer cells

(大腸癌細胞におけるmiR-1291の機能評価)

Abstract of Thesis

[Background] MiR-1291 has an anti-tumor effect in a subset of human carcinomas including pancreas, kidney, esophagus, and prostate. However, its role in colorectal cancer (CRC) is unknown.

[Purpose] The purpose of this study is to assess the anti-tumor effects of miR-1291 in CRC.

[Materials and Methods] We explored the expression of miR-1291 in CRC cell lines, and CRC tissues and normal mucosa from 20 paired clinical tissues. *In vitro* experiments including cell viability, BrdU proliferation, invasion, cell mobility, colony formation capability and apoptosis experiments were used to assess the effects of transfection of miR-1291 on DLD-1, HT29, and HCT116 cells. TargetScan human, miRwalk, miRabel, and miRmap were used to indicate the binding target of miR-1291 *in silico*, and luciferase reporter assay was used to verify the direct binding. QRT-PCR, Western blot analysis and Flow cytometric analysis were used to explore the effects of miR-1291 on cancer stem cell (CSC) markers including doublecortin-like kinase 1 (DCLK1), BMI1 and CD133. Sphere formation assay was also used for analyzing the effects on cell stemness. The function of DCLK1 was verified with DCLK1 siRNAs and sh-DCLK1 HCT116 clones to knockdown DCLK1, and with overexpression of DCLK1. Western blot and Flow cytometric analysis were used to analyze the change of cell cycle. Finally, DLD-1 xenograft mouse model was used to explore the anti-tumor effect of miR-1291 *in vivo*.

[Results] We found that miR-1291 expression was significantly lower in CRC tissues than in normal mucosa. MiR-1291 significantly suppressed the viability, BrdU proliferation, invasion, cell mobility, colony formation capability and induced apoptosis in CRC cells. *In silico* analyses indicated that CSC marker DCLK1 is a potential target of miR-1291. A luciferase reporter assay showed that miR-1291 directly bound the 3'UTR sequence of DCLK1. Among 3 CRC cell lines, HCT116 is known to retain the most CSC-like properties and HCT116 cells express DCLK1. MiR-1291 suppressed DCLK1 expression at both the mRNA and protein levels in HCT116 cells and it suppressed CSC markers, BMI1 and CD133 as well as sphere formation ability. With DCLK1 siRNAs, we also explored and verified the inhibitory effects of miR-1291 on sphere formation, invasion, and mobility of HCT116 cells. And we verified that sh-DCLK1 clones displayed decreased sphere formation of HCT116 cells, compared to sh-negative control cells. Moreover miR-1291 induced CDK inhibitors p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} in DLD-1, HT29, and HCT116, and overexpression of DCLK1 in HCT116 cells conversely led to a decrease of p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1}. Furthermore, intravenous administration of miR-1291 loaded on the super carbonate apatite delivery system significantly inhibited a tumor growth in the DLD-1 xenograft mouse model. The resultant tumors showed significant up-regulation of the p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} protein with treatment of miR-1291.

[Conclusions] MiR-1291 has an anti-tumor effect by modulating multiple functions, including cancer stemness and cell cycle regulation. MiR-1291 could be a promising nucleic acid medicine against CRC.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Wang Jiaqi)			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	山本 浩文
	副 査	教授	尾路 祐介
	副 査	教授	辻川 元一

論文審査の結果の要旨

MicroRNA (miRNA) とは18~25塩基からなる短い一本鎖RNAで、標的遺伝子の3' UTR に結合し、標的となる messenger RNAの分解、あるいは翻訳抑制を行うことでタンパク生成を抑制する。MiRNAは細胞増殖および細胞分化、アポトーシス、代謝、発生といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担い、その増減が癌の進展にも関わることが明らかとなっている。

癌幹細胞は自己複製能と多分化能を持ち、治療抵抗性が高いと報告されている。腸の腫瘍において、DCLK1 (doublecortin-like kinase 1) 陽性の癌幹細胞を傷害することで、腫瘍が出来なくなることから、DCLK1 は癌幹細胞のドライバー遺伝子であると報告されている。

本研究では、バイオインフォマティクス解析により、DCLK1 を標的として、幹細胞性に関与する Notch 及び Wnt signal に関連したmiRNA を30個選出した。プロテアソーム活性が低い細胞は癌幹細胞様の働きをすることが分かっており、低プロテアソーム活性を視覚化する手法の一つに、ODC (ornithine decarboxylase) degron-ZsGreen システムがある。これら30種類のmiRNA を幹細胞性が高いODC degron-ZsGreen (+)の癌細胞に投与した結果、 tumor suppressor miRとして知られる miR-34a よりも強い増殖抑制効果を示す miR-1291に着目した。MiR-1291 は、膵癌、食道扁平上皮癌、腎癌細胞において、その抗腫瘍効果が報告されているが、大腸癌における miR-1291 の発現状況や機能的役割は不明である。本研究では、大腸癌に対して miR-1291 の抗腫瘍効果を検討した。以下に結果を示す。

① 大腸癌細胞株と臨床ヒト大腸組織 (20ペア) において miR-1291 の発現を調べ、*in vitro* の実験を行ってmiR-1291 の抗腫瘍効果を評価した。

その結果、正常なヒト大腸粘膜と比べ、ヒト大腸癌組織において miR-1291 の発現が減少し、ヒト正常大腸細胞の CCD-18Co と比較し、9種類の大腸癌細胞における miR-1291 の発現は低下していた。そのうち、癌幹細胞性の高い細胞として知られている HCT116、比較的分化した腺癌細胞 HT29、分化度が低く悪性度が高い腺癌細胞 DLD-1の三つの細胞株を選択し、miR-1291 の抗腫瘍効果を検討した。まず Lipofectamine RNAiMAX を用いて、miR-1291 を DLD-1、HT29 と HCT116 大腸癌細胞に導入できることを確認した。また、*in vitro* の実験を行い、miR-NC (Negative Control)と比べ、miR-1291 が DLD-1、HT29 と HCT116 大腸癌細胞の viability、増殖、浸潤、運動、コロニー形成能力を有意に抑制し、アポトーシスを誘導することを明らかにした。一方、antagomir-1291 の導入では大腸癌細胞の機能への抑制効果は認められなかった。

② miR-1291によるDCLK1発現調節と 癌幹細胞性への影響に関する検討を行った。

その結果、*in silico* 結合解析と luciferase reporter assay によりmiR-1291 が DCLK1 の mRNA の3' UTR領域と結合することが分かった。大腸癌細胞において DCLK1 発現は先行研究で報告されたように HCT116 細胞に発現し、DLD-1 や HT29 細胞に発現しないことを確認した。HCT116 細胞において、miR-1291 導入による DCLK1

の発現低下をRNAと蛋白レベルで確認できた。HCT116 細胞にmiR-1291 を導入することにより、癌幹細胞マーカーの BMI1 と CD133 の mRNA 発現が減少し、スフェロイド形成能力を抑制できた。更に、Short hairpin の DCLK1 (shDCLK1) を導入した HCT116 クローン細胞では Negative Control (NC) 細胞と比較し、スフェロイド形成が有意に抑制された。以上のことよりHCT116細胞において、miR-1291 がDCLK1 を直接阻害することで、癌幹細胞性を抑制することが示唆された。

- ③ DLD-1 と HT29 細胞においては、DCLK1 を発現していないため、別のメカニズムの存在が示唆され、細胞周期解析と細胞周期関連タンパクの発現を調べた。

その結果、miR-1291 が DLD-1 と HT29 細胞の細胞周期を遅延させ、細胞周期を抑制するブレーキ蛋白の p21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1} を増加させることが分かった。更に、マウス xenograft モデルを用いて、miR-1291 が腫瘍増殖を抑制し、マウス腫瘍組織でもp21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1}を増加させた。

以上のように、本研究は miR-1291 の大腸癌における発現と抗腫瘍効果を明らかにしたとともに、miR-1291 が p21^{WAF1/CIP1} と p27^{KIP1} を増加させることで細胞周期を遅延させ、DCLK1 をターゲットすることにより癌幹細胞性を抑制する、などメカニズムの解明にも貢献した。これらの知見はmiR-1291 が次世代の核酸医療の候補となる可能性を示唆し、癌幹細胞を標的とした新しい治療法の開発に寄与するものであることから、博士（保健学）の学位に値すると考えられる。