

氏名(本籍) おおた たけはる
太田 岳晴 (大分県)

学位の種類 博士(医学)

報告番号 甲第1480号

学位授与の日付 平成26年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当(課程博士)

学位論文題目

KRAS Up-regulates the Expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a Three-dimensional-specific Manner in DLD-1 Colorectal Cancer Cells

(KRASは大腸癌細胞株DLD-1において3次元培養特異的にmiR-181a, miR-200c及びmiR-210の発現を抑制する)

論文審査委員(主査)	福岡大学	教授	白澤 専二
(副査)	福岡大学	教授	鍋島 一樹
	福岡大学	教授	山下 裕一
	福岡大学	教授	遠藤 日富美

学位論文内容の要旨

【目的】

細胞と細胞、または細胞と細胞外マトリックスとの相互作用は、発生過程や個体における3次元構造の形成に重要である。また、これらの相互作用の破綻が癌の進展に密接に関与していることもよく知られている。これらの相互作用の重要性や意義を明らかにするためには、3次元環境下で細胞培養を行う必要がある。当研究室では以前、KRAS 遺伝子に変異を持つ大腸癌細胞株 HCT116 から変異 KRAS のみを特異的に欠損させ、腫瘍造成能を持たない HKe3 細胞を樹立し、変異 KRAS に対する分子標的療法の可能性を世界に先駆け報告した (Shirasawa et al. 1993)。また、HKe3 細胞のみが3次元培養において大腸クリプト様構造を形成したことから、HKe3 細胞は正常大腸上皮細胞のモデルであり、HCT116 細胞では管腔構造におけるアポトーシスや細胞極性の形成が、変異 KRAS により阻害されていることを明らかにした (Tsunoda et al. 2010)。さらに、両細胞を用いて3次元環境において癌に関連する microRNA (miRNA) の発現について検討した結果、miR-200c, miR-221/222 の発現が HCT116 細胞において上昇しており、miR-221/222 のターゲットである PTEN の発現が HCT116 細胞において減少していた。PTEN は正常大腸上皮の維持に重要であることが知られており、変異 KRAS が miR-221/222 を介して、PTEN の発現を制御することにより、HCT116 細胞の癌形質の獲得に関与することが示唆された (Tsunoda et al. 2011)。

本研究では、HCT116/HKe3 細胞系における変異 KRAS による発現変動 miRNA の知見に加え、KRAS 遺伝子に変異を持つ大腸癌細胞株 DLD-1 とその変異 KRAS のみをノックアウトした DKO-4 細胞を用いた。この細胞系を用いて、生体内類似3次元培養下における変異 KRAS が制御する miRNA を同定し、それらの大腸癌臨床検体での発現変動を比較検証することにより、大腸癌進展の分子機序の解明と新規治療の標的分子候補としての新たな知見を得ることを目的とした。

【方法と対象】

2次元および3次元培養下の DLD-1 および DKO-4 細胞を用いて、94 個の癌関連 miRNA について定量的リアルタイム PCR を行い、3次元培養下においてのみ、変異 KRAS の有無により発現変動する miRNA を同定した。さらに、これらの miRNA の発現について HCT116 細胞と HKe3 細胞で得られたデータと比較解析した。また、実際に大腸癌の臨床検体において臨床病期に伴う、その発現変動についても公共の発現アレイデータベース (Gene Expression Omnibus) を用いて解析した。

【結果】

1. 2次元または3次元培養下の DLD-1 細胞および DKO-4 細胞における癌関連 miRNA 発現量の比較

94 個の癌関連 miRNA の発現を DLD-1 細胞と DKO-4 細胞について、2 次元または 3 次元培養下で定量的 PCR 法を用いて比較した。2 次元培養では miR-92, miR-93 の、3 次元培養では miR-181a, miR-200c, miR-210 の発現量が、DKO-4 細胞と比べて DLD-1 細胞において有意に上昇していた。また、2 次元及び 3 次元培養下に共通して、miR-15b, miR-16, miR-23a, miR-24, miR-103, miR-222 の発現量が DLD-1 細胞において有意に上昇していた。

2. 癌関連 miRNA 発現プロファイルの DLD-1/DKO-4 細胞と HCT116/HKe3 細胞の比較

HCT116 細胞と DLD-1 細胞の両細胞株において、3 次元培養下でそれぞれの変異 KRAS 欠損細胞株と比べて発現が上昇している癌関連 miRNA として、miR-23a と miR-200c を同定した。miR-23a は 2 次元と 3 次元培養下の両方で発現が上昇していたのに対して、miR-200c は 3 次元培養下でのみ発現上昇が認められた。

3. DLD-1 細胞において発現上昇する miRNA の大腸癌検体における発現解析

DLD-1 細胞で発現が亢進していた癌関連 miRNA の大腸癌の臨床検体における発現について、公共のマイクロアレイデータを用いて解析した。3 次元培養下特異的に DLD-1 細胞で発現上昇が認められた miR-103, miR-181a, miR-210 の発現が大腸癌臨床検体においても上昇していた。

【考察】

HCT116 細胞で認められた細胞の極性やアポトーシスを伴う管腔形成などの 3 次元構造の異常は、変異 KRAS による 3 次元特異的なシグナルによって引き起こされている可能性がある。この研究では、DKO-4 細胞と比べて DLD-1 細胞において 3 次元特異的に miR-181a, miR-200c, miR-210 の発現が上昇しており、これらの miRNA の発現が変異 KRAS により制御されていると考えられた。また、これらの miRNA は大腸癌の臨床検体でも高発現しており、これらの miRNA が大腸癌の進展にも関与している可能性が示された。特に miR-200c は 3 次元特異的に HCT116 細胞と DLD-1 細胞で共通に上昇し、3 次元微小環境における癌細胞の増殖や維持において鍵となる役割を有すると示唆される。実際、最近では miR-200c は大腸癌臨床検体において高発現を示すことや、食道癌においては化学療法抵抗性にも関与するとも報告されている。また DLD-1 細胞において特異的に発現上昇が認められた miR-181 は癌幹細胞や転移に、miR-210 は 3 次元構造の内腔に特異的な低酸素状態と関連していると報告されており、このような miRNA は変異 KRAS を有する大腸癌細胞が生体内で増殖していく上で、重要な役割を担っていることが示唆された。

【結論】

今後の3次元培養下で変異KRASが制御するmiRNAとその関連分子の詳細解析は、大腸癌進展の機序の解明に通じ、新たな治療法へのアプローチとなると期待される。

審査の結果の要旨

本論文は、KRAS 遺伝子に変異を持つ大腸癌細胞株 DLD-1 とその変異 KRAS のみを欠損させた DKO-4 細胞を 3 次元培養することにより、変異 KRAS が制御する miRNA を初めて同定したものである。さらにその生体類似モデルとしての妥当性を検証するために、公共の臨床検体を用いた網羅的 miRNA 発現データの解析を合わせて施行した。この中で、DLD-1 細胞において 3 次元特異的に強い発現を示す miR-200c 及び miR-23a は、KRAS 遺伝子に変異を持つ他の大腸癌細胞株 HCT116 細胞においても、その変異 KRAS が欠失した HKe3 細胞よりも高い発現を示し、特に miR-200c は大腸癌の臨床検体でも強く発現していることが明らかとなった。このような miRNA は生体内微小環境において変異 KRAS の下流のシグナルにおいて鍵となる役割を有することが示唆され、これらの miRNA が標的とする分子の阻害剤の効果など、今後の臨床応用が期待できる。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ及び、結論は以下のとおりである。

1. 斬新さ

KRAS 遺伝子に変異を持つ大腸癌細胞株 DLD-1 とその変異 KRAS を欠損させた DKO-4 細胞を使用し、生体内類似 3 次元培養下において変異 KRAS が制御する miRNA を初めて同定した。

2. 重要性

今回、DLD-1 および DKO-4 細胞を用いることにより、変異 KRAS が 3 次元特異的に発現制御する miRNA として miR-23a および miR-200c を同定した。さらに大腸癌の臨床検体においても miR-200c は高発現しており、変異 KRAS を介した大腸癌進展のメカニズムの理解においてこれらの miRNA の重要性が示され、バイオマーカー及び治療標的としても重要になることが示唆された。

3. 実験方法の正確性

本研究に使用した細胞株は既に確立されたものであり、miRNA に関する実験方法もその分野において確立されている。実験も複数回行い再現性が得られている。また、情報解析に関しては、多くの論文で用いられている臨床検体より得られたマイクロアレイデータをグループ間で解析する方法を採用した。

4. 表現の明瞭性

本論文は、peer review を受けた英文原著であり、すでに Anticancer Research 誌に掲載されている。審査公聴会におけるプレゼンテーションでも正確に用語などの説明がなされた。尚、変異 KRAS が制御する miRNA の一つである miR-23a を中心として立てた仮説及び最終的な結論も妥当と判断した。

5. 主な質疑応答

学位申請論文の内容の発表の後、以下の質疑応答が審査員から申請者に対し行われた。

Q1: 2次元培養で認められる変化、3次元培養のみで認められる変化の違いは何か？

A1: 3次元培養における形態・構造変化に関与する遺伝子は3次元培養でしか発現に差が出ません。そのような3次元特異的な遺伝子こそが重要であると考えております。

Q2: 同一の細胞でも2次元培養と3次元培養と培養方法によって発現分子、形態が大きく異なるのはエピジェネティックな変化と考えてよいか？

A2: そのような可能性も考えております。

Q3: 二つの細胞株で共通して発現変動する遺伝子が重要であると考えてよいか？またそれぞれの細胞株でのみ発現変動する miRNA の意義は何か？

A3: やはり両方で共通して発現変動する miRNA のほうがより重要なものでないかと考えております。それぞれの細胞株で、miRNA の発現変化が認められる理由は、例えば DLD-1 では p53 の変異が認められ、変異 KRAS と協調してより悪性度が高い性質を持っている可能性があります。その結果 HCT116 と DLD-1 では異なった miRNA の発現制御が認められる可能性があります。

Q4: 臨床検体で解析を行っているが、その目的は何か？

A4: 3次元培養で認められる miRNA の変化が実際に臨床検体でも同様に認められるかという事を検証するために行いました。

Q5: 検証した miRNA の中でどのようなことが抗癌剤耐性につながると予測されるのか？

A5: 抗癌剤耐性を示す癌において強発現を示す miRNA はいくつか報告されていますが、どのようなメカニズムによって抗癌剤耐性を獲得するのかという詳細までは分かっていない状況です。癌幹細胞のような性質を獲得した細胞というものは抗癌剤抵抗性を示すといわれており、そのような細胞で発現が高い miRNA は抗癌剤耐性に関与する可能性はあります。

Q6: 将来的に悪性度のマーカーとして miRNA が関連する可能性はあるか？

A6: 臨床病期間での発現に大きな差は認められませんでした。再発などにこのような miRNA が関与する可能性はあり、今後検討していきたいと思っております。

Q7: miRNA は血液からも検査できるのか？

A7: 血液中にも miRNA は含まれており、定量可能です。

Q8: miRNA は発現が高いものだけか？

A8: 今回の DLD-1 細胞を用いた検証では、発現が高いものだけでしたが、以前の HCT116 細胞を用いた解析では KRAS の発現を制御する let-7 等の発現が低下していました。

Q9: 実験の中でゲノム等が混入している場合はどのように対処するか？

A9: miRNA の特異的な配列を使用して qPCR をしておりますが、DNAase などでの処理はしております。

Q10: 今後の miRNA に関する研究計画は？

A10: 今後は、実際の臨床検体を用いて miRNA の発現を解析し、予後との関連または早期の段階での発現パターンを調べたいと思っております。また miRNA の発現を抑制する LNA を用いて、腫瘍形成したマウスなどを用いて抑制効果などを検証することが可能だと思います。

以上のように、審査員との間で様々な質疑応答がなされたが、申請者は適切に応答していた。

本論文の内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、申請者は学位授与に値すると評価された。