



MicroRNA-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer

渋谷, 尚樹

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8503号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482251>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

MicroRNA-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer

MicroRNA-93 は WASF3 を標的とし、乳癌の転移抑制因子として機能する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

食道胃腸外科学

(指導教員：掛地 吉弘 教授)

渋谷 尚樹

はじめに

進行乳がんは治癒が難しく、特に転移の克服は重要な課題である。がん幹細胞は腫瘍組織中に含まれる特に腫瘍原性の高い細胞集団であり、がん転移にもその初期段階から重要な働きをすることが示してきた。私たちは乳がんにおいて $CD44^+/CD24^{low/-}$ の乳がん幹細胞のがん幹細胞性の維持にはエピジェティックな制御因子であるマイクロ RNA の働きが重要であることを明らかにしてきた。マイクロ RNA は、標的のメッセンジャーRNA の翻訳を阻害する働きをもち、上皮間葉転換、エキソソーム分泌やがん幹細胞性の維持などを介して、がん細胞の転移を含むがん進展の過程を調節している。本研究では、転移に関わるがん幹細胞のエピジェティック制御機構を明らかにするため、ヒト乳がん異種移植マウスモデルを用いて原発巣と肝転移巣における CD44 陽性がん細胞のマイクロ RNA 発現を比較した。つぎに、転移がん幹細胞で発現低下していた miR-93 に着目し、がん幹細胞の転移進展に関わる分子機構を検討した。

方法

同意の得られた乳がん患者組織 (ER (+)/PR (+)/HER2(-)) を異種移植して肝臓で微小多発転移巣を形成する乳がん異種移植マウスモデル (Patient derived-tumor xenograft; PDX) を樹立した。この PDX の乳がん原発巣と肝転移巣より CD44 陽性がん細胞をセルソーターにて分離し、定量的 PCR 法にて 754 種のマイクロ RNA の発現量を比較検討した。リポフェクションあるいはレンチウイルスを用いてマイクロ RNA の発現を増強あるいは抑制した乳がん細胞 (MDA-MB-231、MCF7、T-47D) を作製した。トランスウェル法およびコンフルエントな状態の培養細胞の間に 500 μ m の一定なギャップを作成しそこへ遊走する細胞を評価する創傷治癒アッセイ法によりがん細胞の移動能や浸潤能を解析した。また、マトリゲルを用いた三次元培養により乳がん細胞のがん幹細胞性を解析した。マイクロ RNA の標的遺伝子は TargetScan データベースを用いて予測し、レポーターアッセイやウエスタンブロッティングを用いて検証した。乳がん細胞を免疫不全マウス (NSG) の脾臓に移植し、肝臓への転移能を解析した。また、マイクロ RNA 発現細胞とコントロール乳がん細胞を等量混合し脾臓に移植する競合移植法によりマイクロ RNA が肝臓転移能に及ぼす影響を解析した。

結果

乳がん PDX マウスにおける肝転移巣の CD44 陽性がん細胞の miR-93 の低下

ヒト乳がん PDX マウスの肝転移巣より分離した CD44 陽性がん細胞では 3 種類のマイクロ

RNA クラスター(miR-106b-25, miR-17-92, miR-106a-363)に属するマイクロ RNA の発現量が原発巣の CD44 陽性がん細胞に比べ顕著に低下あるいは発現が検出感度以下であった。本研究では、原発巣の CD44 陽性がん細胞で発現がみられるが CD44 陽性転移がん細胞では顕著に発現低下しており、かつ miR-106a / b, miR-20a / b、および miR-17-5p とマイクロ RNA の標的配列を共有すると考えられる miR-93 に着目して検討を進めた。

miR-93 による浸潤能の抑制

細胞外基質を含むマトリグルをコートしたトランスウェルを用いて、miR-93 の発現を亢進または抑制した乳がん細胞株 MDA-MB-231 と T-47D の浸潤能を評価した。miR-93 の発現亢進により浸潤能はそれぞれ 36%、65% 抑制され、miR-93 の発現抑制では浸潤能がそれぞれ 64%、76% 増加した。一方、トランスウェルを用いた遊走アッセイや創傷治癒アッセイでは、miR-93 の発現の亢進または抑制による MDA-MB-231 細胞の遊走能の変化を認めなかった。

miR-93 によるオルガノイド形成能の抑制

miR-93 によるがん幹細胞性への影響を検証するために、マトリグルを用いた三次元培養法によるオルガノイドの形成能の評価を行った。miR-93 の発現を亢進した MDA-MB-231 細胞はオルガノイドへと成長する能力が低下し、CD44、BMI1、SNAI2 などの幹細胞関連遺伝子および上皮間葉転換関連遺伝子の発現レベルが低下した。一方、miR-93 の発現を抑制した MCF7 細胞では、オルガノイドへと成長する能力が亢進した。

miR-93 の標的遺伝子 WASF3

TargetScan を用いた miR-93 の標的候補遺伝子の検索により、がん幹細胞性の維持やがん細胞の浸潤に関わる WASF3 が候補として特定された。ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いたレポーターアッセイにより、WASF3 の 3' 非翻訳領域内の一か所に miR-93 の標的配列が含まれることを確認した。さらに、ウエスタンブロッティングを用いて、MDA-MB-231 細胞で miR-93 は WASF3 の蛋白質の発現を抑制することを確認した。MDA-MB-231 細胞ならびに T-47D 細胞の浸潤アッセイにおいて、WASF3 の共発現は miR-93 によって認めた浸潤能の低下を抑えたことから、miR-93 は WASF3 を標的遺伝子の一つとして乳がん細胞の浸潤能を抑制すると考えられた。また、前述の乳がん PDX マウスでは、原発巣と比べ miR-93 の発現が低下している肝転移巣で WASF3 の発現が亢進していた。

マウスにおいて miR-93 は乳がんの肝転移能を抑制する

乳がん細胞株 MDA-MB-231 への miR-93 の強制発現により、免疫不全マウスの肝転移数が有意に低下した。さらに、miR-93 の強制発現 MDA-MB-231 細胞とコントロールの MDA-MB-231 細胞を 1 対 1 の細胞数で混合し脾臓へ注射させた競合移植実験は、肝臓への転移がん細胞に占める miR-93 の強制発現 MDA-MB-231 細胞の割合が有意に減少した。

まとめ

ヒト乳がん異種移植モデルを用いた解析から、乳がん幹細胞の遠隔転移に関するマイクロ RNA として 3 種類のマイクロ RNA クラスター (miR-106b-25, miR-17-92, miR-106a-363) に属するマイクロ RNA が同定された。特に miR-106b-25 マイクロ RNA クラスターのメンバーである miR-93 は、細胞骨格とがん幹細胞性の制御因子である WASF3 を標的とすることで、乳がん幹細胞の浸潤能およびがん幹細胞性を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3247 号	氏名	渋谷 尚樹
論文題目 Title of Dissertation	<p>MicroRNA-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer</p> <p>MicroRNA-93 は WASF3 を標的とし、乳癌の転移抑制因子として機能する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 福本 広之</p> <p>副査 Vice-examiner 古屋 敏之</p> <p>副査 Vice-examiner 青井 真之</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

(はじめに)

進行乳がんは治癒が難しく、特に転移の克服は重要な課題である。がん幹細胞は腫瘍組織中に含まれる特に腫瘍原性の高い細胞集団であり、がん転移にもその初期段階から重要な働きをすることが示されてきた。乳がんにおいて CD44+/CD24low-/ の乳がん幹細胞のがん幹細胞性の維持にはエピジェティックな制御因子であるマイクロ RNA の働きが重要であることが明らかになっている。マイクロ RNA は、標的のメッセンジャー RNA の翻訳を阻害する働きをもち、上皮間葉転換、エキソソーム分泌やがん幹細胞性の維持などを介して、がん細胞の転移を含むがん進展の過程を調節している。本研究では、転移に関わるがん幹細胞のエピジェネティック制御機構を明らかにするため、ヒト乳がん異種移植マウスモデルを用いて原発巣と肝転移巣における CD44 陽性がん細胞のマイクロ RNA 発現を比較した。つぎに、転移がん幹細胞で発現低下していた miR-93 に着目し、がん幹細胞の転移進展に関わる分子機構を検討した。

(方法と結果)

I. 乳がん PDX マウスにおける肝転移巣の CD44 陽性がん細胞の miR-93 の低下

同意の得られた乳がん患者組織 (ER (+)/PR (+)/HER2(-)) を異種移植して肝臓で微小多発転移巣を形成する乳がん異種移植マウスモデル (Patient derived-tumor xenograft; PDX) を樹立した。この PDX の乳がん原発巣と肝転移巣より CD44 陽性がん細胞をセルソーターにて分離し、定量的 PCR 法にて 754 種のマイクロ RNA の発現量を比較検討した。ヒト乳がん PDX マウスの肝転移巣より分離した CD44 陽性がん細胞では 3 種類のマイクロ RNA クラスター (miR-106b-25, miR-17-92, miR-106a-363) に属するマイクロ RNA の発現量が原発巣の CD44 陽性がん細胞に比べ顕著に低下あるいは発現が検出感度以下であった。本研究では、原発巣の CD44 陽性がん細胞で発現がみられるが CD44 陽性転移がん細胞では顕著に発現低下しており、かつ miR-106a / b, miR-20a / b, および miR-17-5p とマイクロ RNA の標的配列を共有すると考えられる miR-93 に着目して検討を進めた。

II. miR-93 による浸潤能の抑制

細胞外基質を含むマトリゲルをコートしたトランスウェルを用いて、miR-93 の発現を亢進または抑制した乳がん細胞株 MDA-MB-231 と T-47D の浸潤能を評価した。miR-93 の発現亢進により浸潤能はそれぞれ 36%、65% 抑制され、miR-93 の発現抑制では浸潤能がそれぞれ 64%、76% 増加した。

III. miR-93 によるオルガノイド形成能の抑制

miR-93 によるがん幹細胞性への影響を検証するために、マトリゲルを用いた三次元培養法によるオルガノイドの形成能の評価を行った。miR-93 の発現を亢進した MDA-MB-231 細胞はオルガノイドへと成長する能力が低下し、CD44、BMI1、SNAI2 などの幹細胞関連遺伝子および上皮間葉転換関連遺伝子の発現レベルが低下した。一方、miR-93 の発現を抑制した MCF7 細胞では、オルガノイドへと成長する能力が亢進した。

IV. miR-93 の標的遺伝子 WASF3

TargetScan を用いた miR-93 の標的候補遺伝子の検索により、がん幹細胞性の維持やがん細胞の浸潤に関わる WASF3 が候補として特定された。ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いたレポーターアッセイにより、WASF3 の 3'非翻訳領域内の一か所に miR-93 の標的配列が含まれることを確認した。さらに、ウエスタンブロッティングを用いて、MDA-MB-231 細胞で miR-93 は WASF3 の蛋白質の発現を抑制することを確認した。MDA-MB-231 細胞ならびに T-47D 細胞の浸潤アッセイにおいて、WASF3 の共発現は miR-93 によって認めた浸潤能の低下を抑えたことから、miR-93 は WASF3 を標的遺伝子の一つとして乳がん細胞の浸潤能を抑制すると考えられた。また、前述の乳がん PDX マウスでは、原発巣と比べ miR-93 の発現が低下している肝転移巣で WASF3 の発現が亢進していた。

V. マウスにおいて miR-93 は乳がんの肝転移能を抑制する

乳がん細胞株 MDA-MB-231 への miR-93 の強制発現により、免疫不全マウスの肝転移数が有意に低下した。さらに、miR-93 の強制発現 MDA-MB-231 細胞とコントロールの MDA-MB-231 細胞を 1 対 1 の細胞数で混合し脾臓へ注射させた競合移植実験は、肝臓への転移がん細胞に占める miR-93 の強制発現 MDA-MB-231 細胞の割合が有意に減少した。

(まとめ)

ヒト乳がん異種移植モデルを用いた解析から、乳がん幹細胞の遠隔転移に関わるマイクロ RNA として 3 種類のマイクロ RNA クラスター(miR-106b-25, miR-17-92, miR-106a-363)に属するマイクロ RNA が同定された。特に miR-106b-25 マイクロ RNA クラスターのメンバーである miR-93 は、細胞骨格とがん幹細胞性の制御因子である WASF3 を標的とすることで、乳がん幹細胞の浸潤能およびがん幹細胞性を抑制する可能性が示唆された。

本研究は、乳がんにおける miR-93 について、その機能および標的遺伝子を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた原発巣と肝転移における miR-93 の発現量の違いに着目し、肝転移におけるその機能を詳細に検討し、また新規標的遺伝子として WASF3 を同定した報告である。乳がんの肝転移について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。