



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of antisense oligonucleotides for suppressing breast cancer cell proliferation and the system for evaluating drug response of cardiomyocytes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	奥村, 翔; Okumura, Sho
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14662号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83594
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sho_Okumura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学)

氏名 奥村 翔

学位論文題名

Development of antisense oligonucleotides for suppressing breast cancer cell proliferation and the system for evaluating drug response of cardiomyocytes

(乳がん細胞の増殖抑制を目指したアンチセンスと、心筋細胞に対する薬剤応答評価システムの開発)

がんおよび心疾患は日本における死亡原因の約40%を占めている。がんの中でも女性の罹患率の最多を占めるのは乳がんであることから、本博士研究において筆者は、まず1) 乳がん細胞の増殖抑制を目指したアンチセンス核酸の開発を進めた。続いて心筋細胞の拍動解析技術として、2) 心筋細胞に対する薬剤応答評価システムの開発を実施した。以下にこれらの概要について記述する。

1) 乳がん細胞の増殖抑制を目指したアンチセンス核酸の開発

マイクロRNA (miRNA) は18~23塩基の内在性ノンコーディングRNAの一種で、メッセンジャーRNA (mRNA) の非翻訳領域に結合して遺伝子発現の制御を担う。多くのがん関連遺伝子もmiRNAによる制御を受けるため、miRNAは細胞のがん化とも密接に関わっている。Anti-miRNA oligonucleotide (AMO) は標的miRNAと相補的な配列を有し、miRNAに結合してその機能を抑制する人工核酸である。細胞内の核酸分解酵素に対する耐性を獲得させるために、AMOには様々な化学修飾や二次構造が導入されてきた。筆者の所属する研究室ではこれまでに、クロスリンク (CL) して安定化させた2本鎖をアンチセンス配列の両末端に接続したCL-AMOを開発してきた。CL-AMOは他の市販のAMOに比べて遥かに高いmiRNA阻害効果を有することが確認されていた。しかしながら、これまでの活性評価は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を利用した結果であり、細胞内の内在性miRNAに対する効果は未確認であった。そこで筆者は、乳がん細胞におけるmiRNAの機能とその阻害効果を調べる研究を行った。

まず初めに、乳がんにおける細胞増殖促進機能が知られているmiRNA-21 (miR-21)を標的としたCL-AMO (CL-miR21)を合成し、幾つかの市販AMOと効果を比較した。その結果、CL-miR21のみが9日間にわたって安定的に乳がん細胞の増殖を阻害することを確認した。またmiR-21の標的遺伝子の一つであるphosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN)のmRNA発現量がCL-miR21によって増加することを確認したことから、CL-AMOは、内在性mRNAにも持続的に作用し、乳がん細胞の増殖阻害にも有効であることを確認した。

次に筆者は、乳がん細胞の増殖阻害においてmiR-21よりも有効な標的miRNAを探索することを目的とした研究を実施した。miR-148aは乳がん細胞における発現量は低く、AMOの標的にすることは困難と考えられ、阻害結果を示したデータは報告されていなかった。CL-AMOは高いハイブリダイゼーション能力を有することから、miR-148aに対するCL-AMO (CL-miR148a)を合成し、乳がん細胞の増殖効果を調べた。市販AMOの場合は高濃度を添加しても乳がん細胞の増殖は変化しなかったが、CL-miR148aでは低濃度の添加でも顕著に細胞増殖を抑制した。一方、miR-148aと類似した配列を有するmiR-148bに対するCL-AMOを添加した場合では抑制効果が見られなかった。また免疫沈降法の実験より、CL-miR148aはmiR-148aに結合していることも確認した。また興味深いことに、miR-148aを標的にした場合に得られた乳がん細胞の増殖抑制効果は、

miR-21 を阻害した場合よりも高いことが明らかになった。

続いて筆者は、mRNA アレイの結果と miRNA-mRNA 結合予測データベースより、miR-148a によって発現調節を受ける遺伝子を選抜した。さらに定量 PCR (qPCR) の結果より、3 つの遺伝子が miR-148a によって制御され、かつ乳がん細胞の増殖阻害に関わっていることが示唆された。それらの中でも thioredoxin-interacting protein (TXNIP) はがん抑制遺伝子として報告されていることから、miR-148a の結合を受けて発現制御される最有力候補として考えている。以上の結果より、筆者は乳がんにおいて miR-148a が新たな標的分子になり得ることを証明しただけでなく、低発現 miRNA であっても重要な機能を有することを明らかにした。

2) 心筋細胞に対する薬剤応答評価システムの開発

miRNA は心筋梗塞、不整脈、心肥大など様々な心疾患に関与していることが報告されている。心筋細胞において最も重要な機能は拍動であるが、従来の活性評価は主に活動電位測定によって行われており、拍動を直接的に評価する方法はなかった。そこで心筋細胞における miRNA 機能研究への応用を見据えて、心筋細胞の薬剤応答を評価するシステムを開発した。

走査型電気化学顕微鏡 (Scanning Electrochemical Microscopy; SECM) は、プローブであるマイクロ電極を走査して測定対象近傍の電気化学活性種の分布を可視化する測定法であり、細胞の形状や酸素消費などを非侵襲的に評価できる。筆者の所属する研究室ではこれまでに、SECM を用いて心筋細胞の拍動測定が可能なることを報告しているが、長時間安定した測定を行うことはできなかった。そこで、マイクロ電極の精密な位置制御と細胞培養環境を両立する器具を SECM へ導入した。ラット由来心筋細胞の拍動をこの培養環境維持システム内で測定したところ、2 時間以上、安定した拍動を維持することを確認した。続いて、測定中の心筋細胞の薬剤応答を評価するために、細胞近傍に微量の薬剤を添加可能なキャピラリーマイクロピペット (MP) を SECM に導入した (SECM-MP)。直径 500 μm の島状に培養した心筋細胞群を選択して拍動を観察しながら、心毒性を有する薬剤であるアステミゾールを添加したところ、弛緩時間が大きく延長することが明らかとなった。この拍動変化はアステミゾールが引き起こす心筋細胞の活動電位変化と一致していると考えられる。よって SECM-MP は、従来法では評価できなかった拍動を指標に、様々な薬剤に対する心筋細胞の機能を安定して解析が可能なシステムであることが明らかとなった。

本学位論文では、乳がん細胞と心筋細胞において、従来の方法では見出せなかった細胞機能を明らかにする手法を開発した。CL-AMO は強力な miRNA 阻害活性により従来の AMO では検出不可能であった新たな miRNA 機能を明らかにし、広く miRNA 研究に応用可能である。一方 SECM-MP システムは拍動を指標にすることで、従来法では検出出来ない心筋細胞の機能を解析する強力なツールとなることが期待される。