

子宮体癌幹細胞における miRNA の網羅的解析

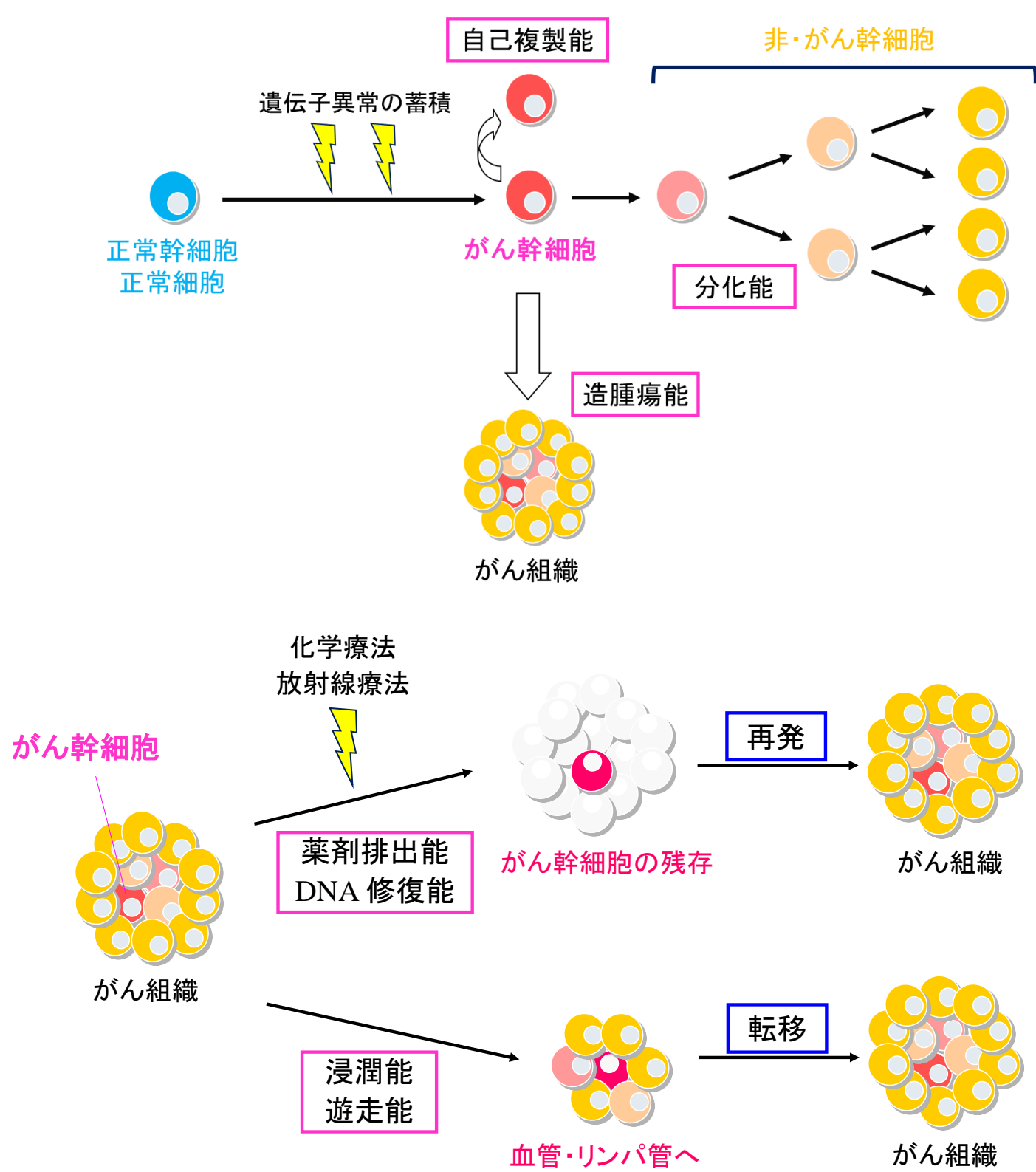
富安 聡

国際医療福祉大学 福岡保健医療学部 医学検査学科

はじめに

近年、自己複製能、分化能および造腫瘍能を有する癌幹細胞の存在が様々な腫瘍において報告されており、癌の発生・維持に関与することが示唆されている。

がん幹細胞の特性



癌幹細胞の特性維持には、標的の messenger RNA (mRNA) と結合することにより、mRNA の分解や蛋白質翻訳阻害に関わる microRNA (miRNA) が深く関与することが示唆されている。

さらに、miRNA については、血中の miRNA を解析することで胃癌や大腸癌など 13 種類の癌を早期発見できることが報告されており、現在、臨床研究へと進んでいる。

しかし、子宮体癌の早期発見因子としての miRNA の報告はなされておらず、癌の発生・維持に関与するとされている癌幹細胞の解析もほとんど進んでいないのが現状であり、他の腫瘍の解析と比較して大きく出遅れている。

目的

子宮体癌幹細胞特異的に発現する miRNA を同定することは、発癌機構の解明および miRNA を標的として新たな癌治療の創薬、さらには子宮体癌の早期発見に繋がると考えられる。

本研究では、Chip 解析により miRNA を網羅的に解析する前段階として、解析する miRNA の種類を絞り込むために癌幹細胞に高発現する mRNA を同定することを目的とした。

対象

ヒト子宮体部類内膜腺癌細胞株
HEC-50B (低分化型, Grade 3, Japan Health Sciences Foundation, Japan, JCRB1145)

方法

SP 細胞および MP 細胞の分取

Hoechst 排出能を指標に FACSria (BD FACSria™ セルソーター, BD Biosciences, USA) を用いて分取した。

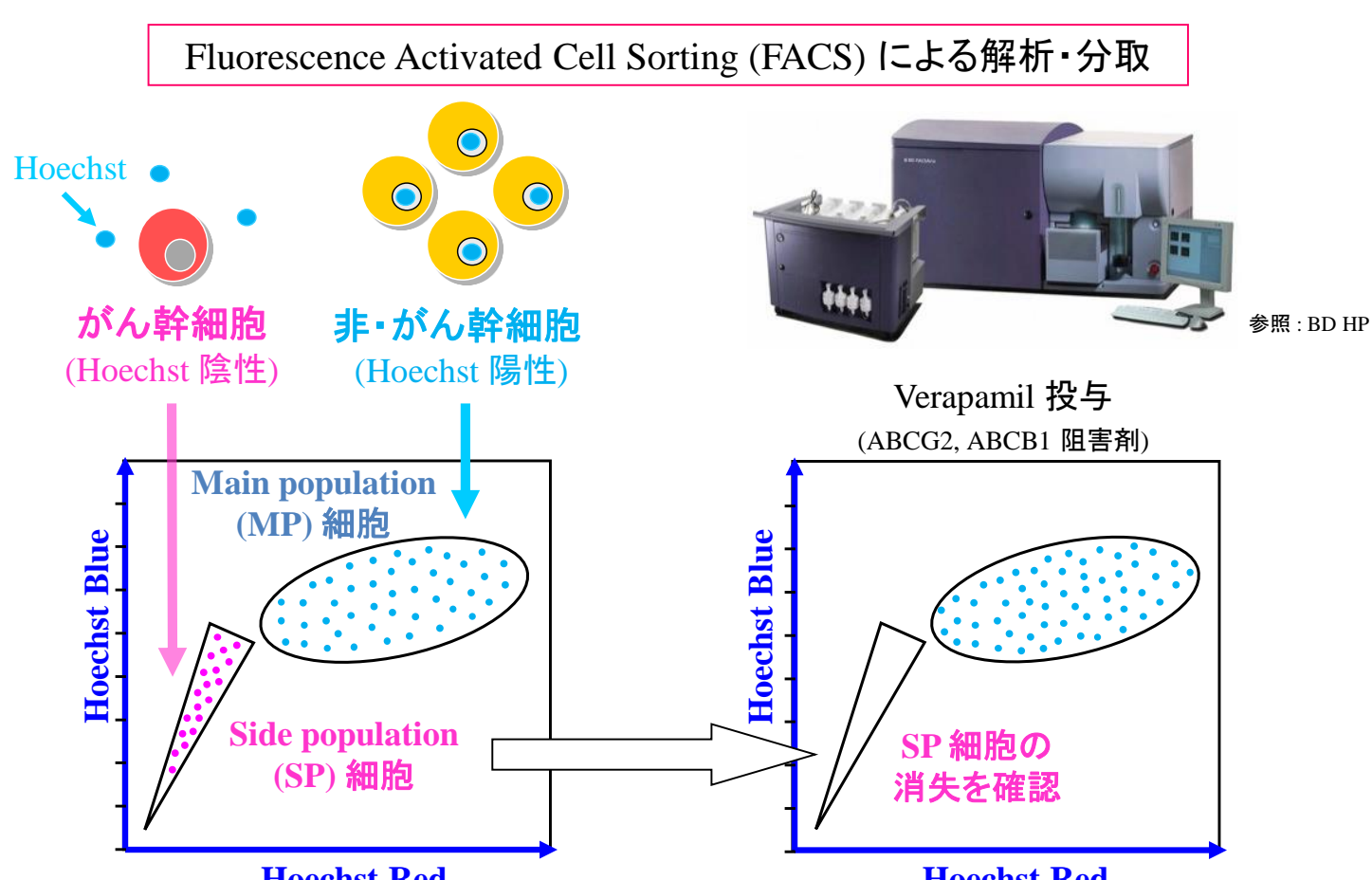
Real time-PCR 法

LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche, Switzerland) を用いて mRNA の発現定量解析を行った。

統計学的解析

Mann-Whitney *U*-test を用い、 $p < 0.05$ の群間に統計学的に有意差があるものとした。

Hoechst 排出能を指標としたがん幹細胞の選択的分取法



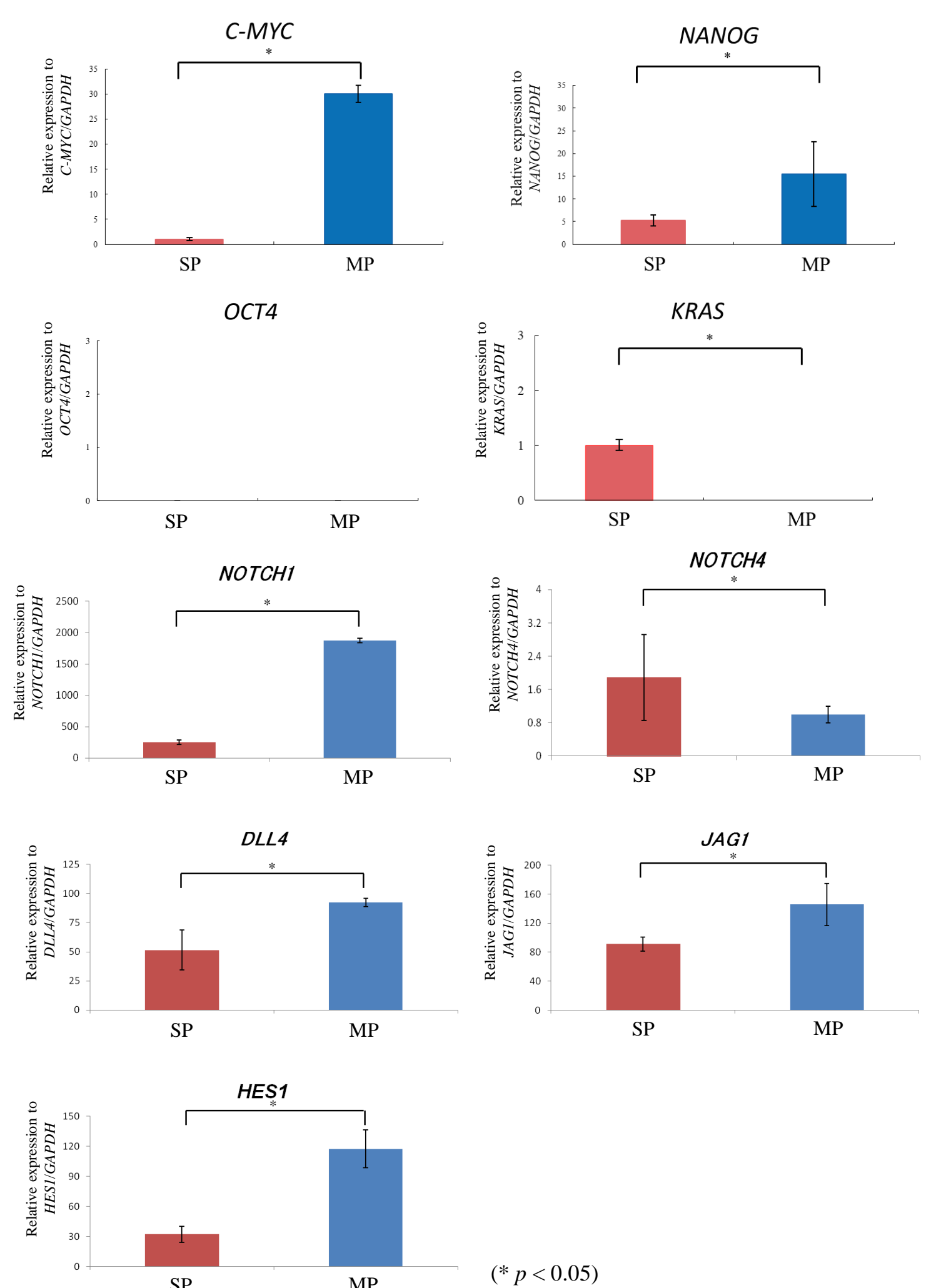
mRNA 発現解析

Real time-PCR 法に用いた Primer の配列①

Identification	Sequence	Amplification Length (bp)
<i>C-MYC</i>	Fw 5'-TCC AGC TTG TAC CTG CAG GAT CTG A-3'	338
	Rv 5'-CCT CCA GCA GAA GGT GAT CCA GAC-3'	
<i>NANOG</i>	Fw 5'-GCA AAC AAC CCA CTT CTG-3'	289
	Rv 5'-AGG CCT TCT GCG TCA CAC-3'	
<i>OCT-4</i>	Fw 5'-CGT GAA GCT GGA GAA GGA GAA GTG-3'	246
	Rv 5'-AAG GGC CGC AGC TTA CAC ATG TTC-3'	
<i>KRAS</i>	Fw 5'-GAT TCC TAC AGG AAG CAA GT-3'	176
	Rv 5'-TAA TGG TGA ATA TCT TC-3'	
<i>NOTCH1</i>	Fw 5'-ACGAGGACCTGGAGACCAAGAAGTTC-3'	500
	Rv 5'-GATCAGGATCTGGAAAGACACCTTGTG-3'	
<i>NOTCH4</i>	Fw 5'-CTGAGCCAAGGCATAGACGTCTCTTC-3'	200
	Rv 5'-CACACTGGCAGAGATACCCAATG-3'	
<i>DLL4</i>	Fw 5'-CTGGGGAATATTGCCAACAGCCTATCTG-3'	416
	Rv 5'-GAGGACACAGGCAGTGGTAGCCATCC-3'	
<i>JAG1</i>	Fw 5'-GCCAGGAAGTTTCAGGAGACCTTGC-3'	501
	Rv 5'-CGTATATCTTACAGAGAAATGGCCACATG-3'	
<i>HES1</i>	Fw 5'-GAAGAAAGATAGCTCGCGCATTCAG-3'	170
	Rv 5'-GTCACCTCGTTCATGCACCTCGTGA-3'	
<i>GAPDH</i>	Fw 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3'	307
	Rv 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	

GAPDH は内部標準として細胞数の補正に用い、mRNA 発現量を相対的に定量化した。

結果



C-MYC、*NANOG*、*DLL4*、*JAG1*、*HES1* の mRNA 発現はいずれも SP 細胞と比較して MP 細胞に高い発現が認められた。
KRAS および *NOTCH4* の mRNA 発現において MP 細胞と比較して SP 細胞に高い発現が認められた。

考察

子宮体癌幹細胞の維持には *KRAS* や *NOTCH* シグナル経路、特に *NOTCH4* が大きく関与していることが示唆された。

したがって、*KRAS* や *NOTCH* シグナル経路の発現に関わる miRNA を検索することで、子宮体癌幹細胞の発生・維持に関与する miRNA を同定することが可能であると考えられる。

結語

本研究より、子宮体癌幹細胞の維持に関与する mRNA を同定することができた。

今後は、*KRAS* や *KRAS* や *NOTCH* シグナル経路の mRNA の発現に関与する miRNA を Chip 解析により網羅的解析することで、子宮体癌幹細胞に特異的に発現する miRNA を同定していきたい。

第 7 回 国際医療福祉大学学会学術大会

COI 開示

筆頭演題者名：富安 聡

今回の演題に関して開示すべき COI はありません。