

癌の正常細胞化を誘導する 活性分子の生体応用

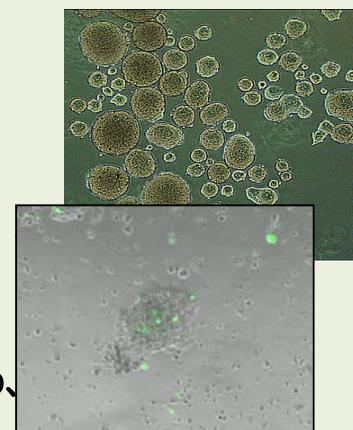
鳥取大学 医学部 病態解析医学講座
薬物治療学分野
三浦典正



技術概要

最終目標：細胞医療・医薬品としての開発（創薬）

- 1種類のマイクロRNA (miRNA) 単独使用で、悪性度の高い腫瘍及び正常細胞から転移性を喪失したiPS様の細胞を作成できる。
- 作成された細胞を動物に導入しても、奇形種以外の腫瘍を形成せず、肝がんなら正常肝細胞にも形質転換する。
- 従来のiPS細胞と異なり、癌抑制遺伝子p53が強く発現しているため、より発癌しにくい。



従来の問題点

- 腫瘍を形成する可能性がかなりある。
- 悪性細胞を良性化できない。
- 造腫瘍性能の限りなく低い新規のiPS細胞作成法があれば、breakthroughになり得る。

解決したポイント

- 1種のマイクロRNA (hsa-miR-520d) を未分化な癌細胞 (HLF) に導入すると、優れた機能が見出された。
- 7種のmiRNAをレンチウイルスにサブクローニングして293FT細胞や低分化癌細胞株に導入し、stem化または正常細胞化を確認した。
- hsa-miR-520dの標的遺伝子を1つ同定し、メカニズムの一部を解明。



我々がクローニングしたRNA遺伝子 (RGM249) は3つのmiRNAを生理的に生成し、多くの遺伝子発現を調節している。これらのmiRNAに対するsiRNAや関連miRNAであるhsa-mir-520dは単独でヒト正常細胞株からiPS細胞を作成しうる生体分子です。これは新規のiPS細胞作成法であり、癌細胞に導入することで、iPS化させ、悪性腫瘍の転移性を顕著に抑制します。再生医療や抗癌医薬に資する可能性を持っています。

背景

1. マイクロRNA前駆遺伝 (RGM249) 及び関連マイクロRNA群の中には、分化度の低い癌に対してhTERT発現を制御し、癌転移抑制効果があることを確認した。

2. そのshRNAをがん細胞に導入すると、12種類のmiRNAが発現変動した。

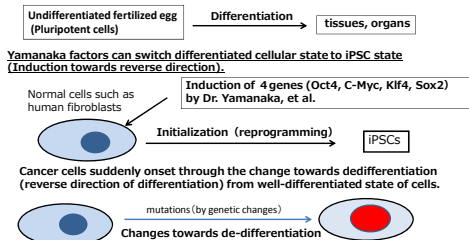
3. その12個のうち1種のマイクロRNA (hsa-miR-520d) に注目し、未分化な癌細胞 (HLF) に導入すると、とんでもないことが生じた。

4. Hsa-miR-520dの標的遺伝子を1つ同定した。

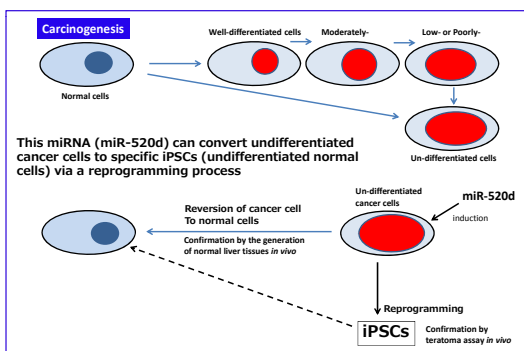
These nucleic acids molecules have a epoch-making characteristics that can give undifferentiated malignant cells into normal or benignant properties.

Schematic overview of assumed mechanism

It is development of Homo sapiens and the creature that the differentiation to each organ is occurred in a mother, and they grow towards the differentiation degree.



Progression of carcinogenesis and generation of iPSCs are similar in terms of a change towards lower differentiation. That is one of reasons why iPSCs can not be applied to regenerative medicine unless onset of cancer cells from iPSCs are regulated suppressively.



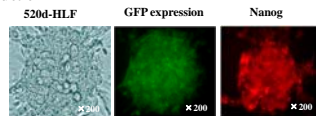
Conclusion

- Single administration of hsa-miR-520d can induce development of undifferentiated hepatoma cells into cells positive for pluripotency markers via stemness-mediated process. They can also upregulate P53, suggesting the ability to inhibit the malignant growth of cancer cells.
- Novel cancer therapy using this molecule may make it possible to convert malignant cells into normal cells by reverting them to their original state. This molecule have the potential to be used in the treatment of conventional therapy-resistant undifferentiated malignant cells.
- Hsa-miR-520d might also be suitable for cell therapy applications in regenerative medicine.
- Although it has been accepted that cancerous cells cannot revert to their original healthy state and cancer cannot return to normal cells, such a notion may no longer be valid.

Result-1: *in vitro* study in HLF (poorly differentiated hepatoma)

miR-520d導入肝癌が悪性形質を失った

Phenotype, conversion to pluripotent marker-positive cells after the induction

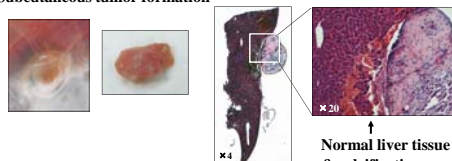


Like 293FT, undifferentiated hepatoma cells were induced to both pluripotency and P53 positivity.

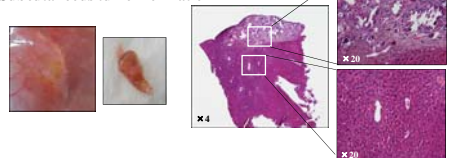
Result-2: *in vivo* 520d-HLF cells

1.0×10^5 copies induced 520d-HLF to the formation of 10mm undifferentiated tumor, 3.0×10^5 copies induced the size reduction to 1mm tumor, and more than 6.0×10^5 copies converted 520d-HLF to benign tumors or teratomas.

Subcutaneous tumor formation



Subcutaneous tumor formation



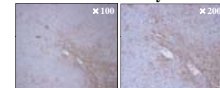
Immunohistochemical analysis of liver tissue generated from 520d-HLF cells in xenograft model

Anti-hAlb antibody



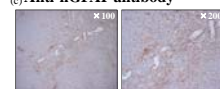
albumin expressed strongly

Anti-hAFP antibody



Embryonic marker of hepatocyte

(c) Anti-hGFAP antibody



Early marker of stellate cell

Human AFP or GFAP weakly expressed in cytoplasm of hepatocyte and stellate cells.

Application & prospects:

1. Collaborative

- 1) pharmaceutical company regarding nucleic acids-based therapy (**anti-cancer drug**)
- 2) enterprise developing drug delivery system
- 3) enterprise **searching for inhibitors** of genes targeted by miR-520d.

2. These may also contribute to safe **regenerative medicine or anti-aging therapy.**

当該生体分子群と関連分子の実用化までの課題

miR-520d

- 1) 安全性を高める条件を最適化する。
- 2) 生体応用に向けてDDSの種類の選別と工夫、投与方法について実験データを取得し、適用条件の最適化を行う。(核酸医薬としての開発)
- 3) iPSへの導入による腫瘍化抑制効果の検討(再生医療への応用)
- 4) 正常細胞への効果の詳細を分子生物学的に検討し、他分野などにおける有用性の有無を検討する。UV照射線維芽細胞への導入効果(美容への応用)。

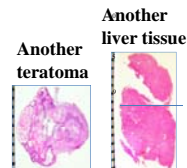
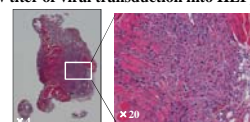
ELAVL2

- 1) ELAVL2の構造探索と阻害薬の発見(共同研究を希望)
- 2) 本メカニズムに最も関与する標的遺伝子群の同定を行う。
- 3) iPSへの導入による腫瘍化抑制効果の検討(再生医療への応用)
- 4) 正常細胞への効果の詳細を分子生物学的に検討し、他分野などにおける有用性の有無を検討する。

COI: I (we) certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in this research

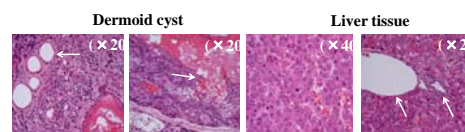
mock-HLF generated undifferentiated-hepatoma tissues

Sarcomatous undifferentiated tumor (low titer of viral transduction into HLF)



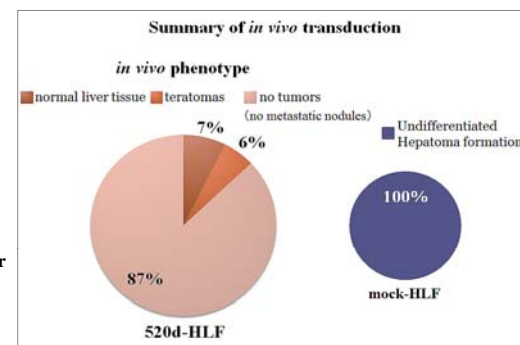
We made benign dermoid cyst (a kind of mature teratoma) consisting of epidermis, sudoriferous glands, and sebaceous glands from hepatoma cells

We made normal liver tissues from hepatoma cells



It is possible that the miRNAs convert hepatoma cells to benign cell with stemness traits and induce normal liver tissue with bile duct, vein, and hepatic cords (right: white arrow), in an optimized condition (preliminarily not only immature condition but also in vivo condition).

Using markers of Immature liver tissues, we confirmed the presence of hepatocytes, bile ducts, vein, and stellate cells consisting of liver tissues.



- 1) *in vivo*で奇形腫を形成
- 2) *in vivo*で肝組織を形成
- 3) *in vitro*で骨分化誘導を確認
- 4) 標的遺伝子の同定

肝癌細胞は、iPS、MSCになり得る。

がんの正常化治療は夢ではない。

悪性度の高い未分化癌ほど正常化しやすい。

核酸医薬だけでなく標的遺伝子の阻害薬もそれらを可能にする。

patents

1. "hTERT Gene Expression Regulatory Gene" US 2009/0124794 A1 (#7,985,852) EP2098593B1 (date: 2009/6/19)
2. PCT/JP2011/64846 (date: 2011/06/28)
3. PCT/JP2011/64847 (date: 2011/06/28)
4. 特願2012-278330 (date: 2012/12/20)