

令和元年6月3日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09329

研究課題名(和文)大腸癌薬剤耐性とmicroRNAの関連

研究課題名(英文) Identification of anti-cancer drug resistance related microRNAs and its role in colorectal tumors

研究代表者

中川 義仁 (Nakagawa, Yoshihito)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：60372108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低濃度の抗癌剤5-FUを徐々に高濃度にして大腸癌培養細胞株DLD-1とSW480の5-FU耐性株と、DLD-1細胞をヌードマウスに移植してから5-FUを腹腔内投与することで5-FU耐性株を作成した。microRNA(miRNA)は小さな機能性RNAで発癌と深く関連する。miRNAアレイ解析にて耐性株で過剰発現するmiR-31を見いだした。5FU耐性株でmiR-31発現を抑制すると5-FU耐性が抑制された。親株にmiR-31を過剰発現させると5-FU耐性となった。またmiR-31は癌のエネルギー代謝に関与していた。miR-31は腺腫や粘膜癌と比べて粘膜下層以深の浸潤癌で過剰発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床では投与開始直後は抗癌剤が良く効いていても耐性が出来て効き目が悪くなり副作用ばかりが目立つことはしばしば観察される。

本研究は薬剤耐性にmicroRNAがどのように関与するかを調べた。この研究成果は抗癌剤の効果が期待できるかどうかの予測や、効きが悪くなったときにもう一度効果が出るようにするための臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established four types of 5-FU resistant colon cancer cell line in vitro and in vivo. We then analyzed miRNA expression profile by miRNA array in these 4 cell lines, and identified the drug resistance-related miRNAs. We identified possible miRNAs to be involved in 5-FU resistance by miRNA arrays. We then examined the relationship between miR-31, which was most promising among them, and drug resistance. When we exposed high dose of 5-FU to parent or 5-FU resistant cells, the expression levels of miR-31 were raised higher than those of controls. Notably, the expression levels of miR-31 were positively correlated with the grade of clinical stages of colorectal tumors. The protein expression levels of factor inhibiting hypoxia-inducible factor 1 (FHI-1) were downregulated by transfection of mimic miR-31 into DLD-1 cells. This study provides evidence supporting the association of miR-31 with 5-FU drug resistance and clinical stages of colorectal tumors.

研究分野：消化器内科、分子生物学

キーワード：大腸癌 microRNA 抗癌剤 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は22-25ヌクレオチドの機能性RNAで、発癌と深く関連する。我々は大腸腫瘍のmiRNA発現profileを解析し、大腸腫瘍でmiR-143,-145が発現低下、大腸癌でmiR-34aが発現低下およびmiR-7が発現増加することを見いだした。

一方、本邦において罹患者数、死亡者数が増加している大腸癌治療の最大の障害の一つは抗癌剤に対する薬剤耐性にある。我々はmicroRNAが薬剤耐性にも関与する可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

今研究では大腸癌培養細胞株を用いて薬剤耐性のメカニズムをmiRNAの発現profileや細胞導入実験、標的遺伝子の解明等から明らかにし、同定したmiRNAを大腸癌症例において薬剤耐性に対応するための方法確立を目標とする。

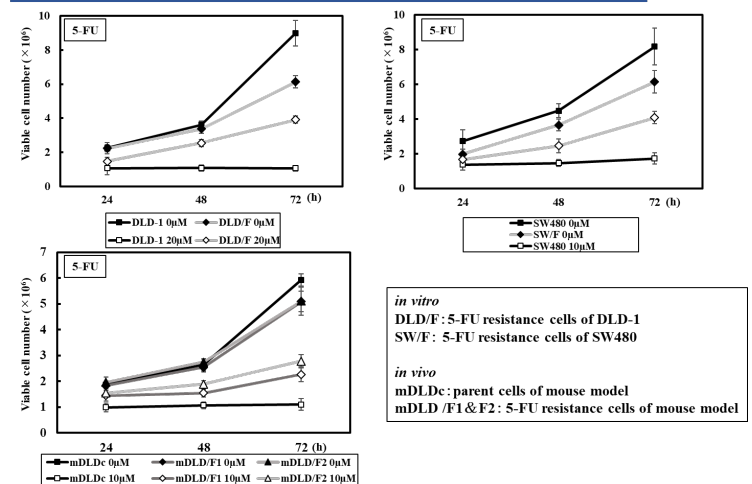
3. 研究の方法

低濃度から徐々に5-FUに暴露し、大腸癌培養細胞株DLD-1とSW480の5-FU耐性株DLD/FとSW/Fを、DLD-1担癌ヌードマウスに5-FUを腹腔内投与することで親株のmDLDCと5-FU耐性株mDLD/F1とmDLD/F2を樹立した。これらの細胞株を用いてmiRNAアレイ解析を行い、5-FU耐性に関与するmicroRNAを同定し、miRNA導入実験により機能解析を行った。また大腸腫瘍症例を用いてmiRNAの発現を検討した。

4. 研究成果

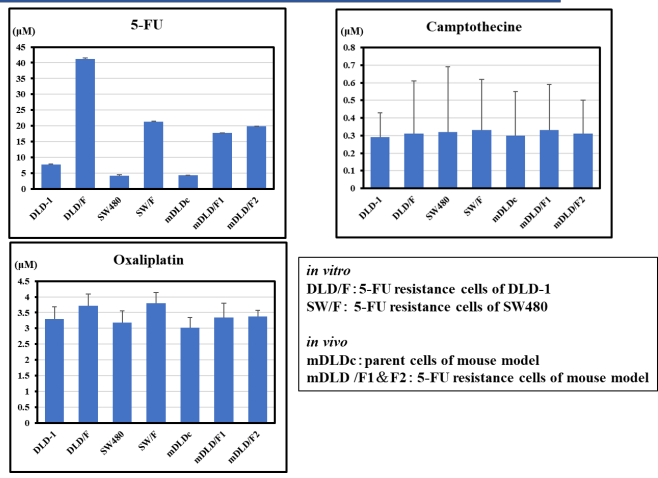
(1) 低濃度から徐々に5-FUに暴露し、大腸癌培養細胞株DLD-1とSW480の5-FU耐性株DLD/FとSW/Fを、DLD-1担癌ヌードマウスに5-FUを腹腔内投与することで親株のmDLDCと5-FU耐性株mDLD/F1とmDLD/F2を樹立した。これらの耐性株は親株と比較して細胞増殖能は劣るもののIC50換算で6倍程度の耐性を獲得した。

Cell growth of 5-FU resistant colorectal cancer cell lines



(2) これらの耐性株はオキサリプラチンやイリノテカンに対する耐性は有しなかった。

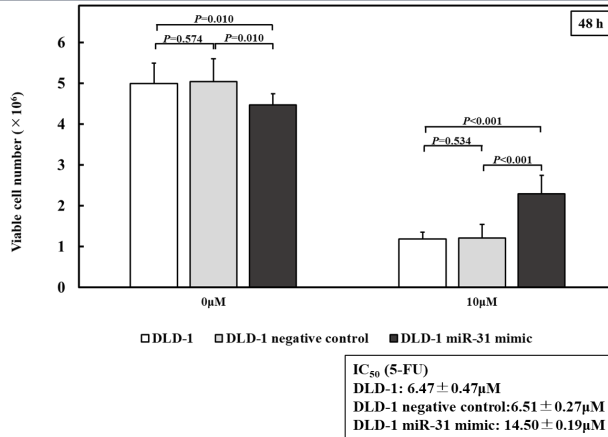
IC₅₀ of 5-FU resistant colorectal cancer cell lines (48 h)



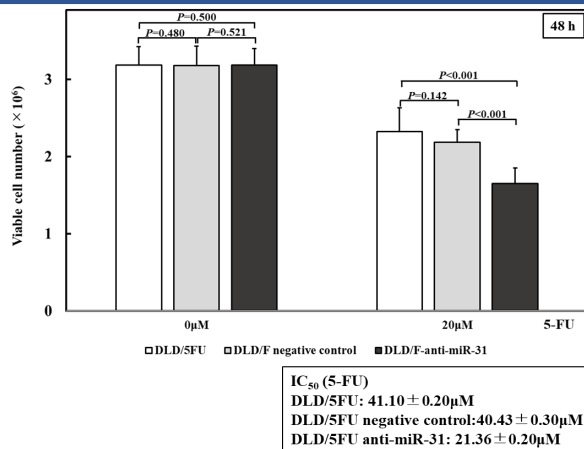
(3) miRNA アレイ解析により 12 種類の 5-FU 耐性に関与する miRNA を同定した。その内、最も関与が疑われた、耐性株で過剰発現する miR-31 について検討した。

(4) DLD-1 の 5FU 耐性株に inhibitor-miR-31 を導入すると細胞増殖数は変化しなかったが、5-FU を投与すると細胞増殖能が約 25%抑制された。一方、DLD-1 細胞に mimic miR-31 を導入すると細胞増殖能は約 10%抑制されたが、5-FU 耐性となった。

Increased cell growth by the transfection with mimic miR-31 in DLD-1 cells

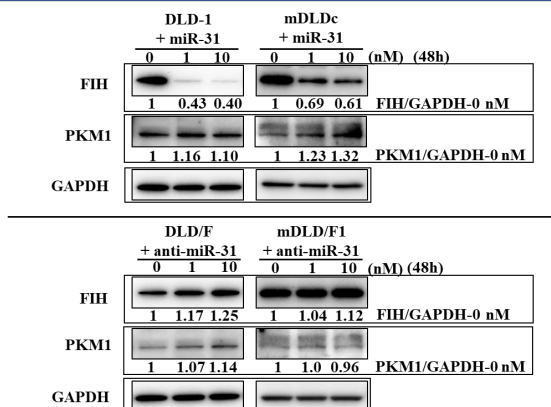


Growth inhibition by the transfection with anti-miR-31 in DLD/F cells



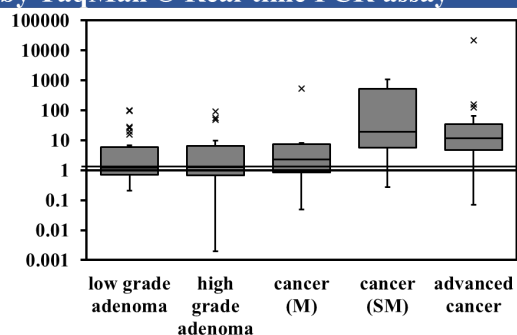
(5) miR-31 の標的遺伝子について検討した。データベース解析で癌のエネルギー代謝 (Warburg 効果) を制御する FIH-1 が疑われた。よって miR-31 を培養細胞株に導入すると、FIH-1 の発現が抑制された。

The expression levels of FIH-1 and PKM-1 protein in mimic or inhibitor of miR-31 transfected cells evaluated by Western blot



(6) 臨床検体では管状もしくは絨毛管状腺腫や粘膜癌と比べて粘膜下層以深に浸潤する癌で有意に miR-31 が過剰発現している頻度が高かった。一方、鋸歯状腺腫では腺腫であるのも関わらず進行癌並みに miR-31 が過剰発現する頻度が高かった。

Expression of miR-31 in human colorectal tumor tissues evaluated by TaqMan® Real-time PCR assay



colorectal tumor	n	over expression of miR-31	P value
low grade adenoma	28	6 (21.4%)	p=0.008
high grade adenoma	18	3 (16.6%)	
cancer (M)	10	1 (10.0%)	
cancer (SM)	12	7 (58.3%)	
advanced cancer	44	25 (56.8%)	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakagawa Y, et al. Mir-31 contributes to 5-FU resistance in colorectal tumors. Cancer Science, in press.

〔学会発表〕(計5件)

- 2018年米国消化器病学会(国際学会)
「Identification of 5-FU resistant-related microRNAs in colorectal tumors」
- 2018年日本消化器病学会大会
「大腸腫瘍における microRNA の治療への応用」
- 2018年日本癌学会学術総会
「Identification of 5-FU resistance-related microRNAs in colorectal tumors」
- 2019年日本消化器病学会総会
「大腸癌 5-FU 耐性に関する microRNA の探索と機能解析」
- 2019年米国消化器病学会(国際学会)
「Identification of 5-FU resistance-related microRNAs and its role in colorectal tumors」

すべて筆頭で発表者です

2019年度の日本消化器病学会大会と日本癌学会学術総会にも演題登録中です

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 中川義仁

ローマ字氏名: Nakagawa Yoshihito

所属研究機関名：藤田医科大学
部局名：医学部・消化管内科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60372108

(2)研究協力者

研究協力者氏名：赤尾幸博
ローマ字氏名：Akao Yukihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。