

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20148

研究課題名(和文)膀胱癌におけるGC療法抵抗性に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文)The Mechanism of Gemcitabine and Cisplatin resistance in bladder cancer cells.

研究代表者

進藤 哲哉(Shindo, Tetsuya)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80749292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膀胱癌におけるシスプラチン(CDDP)耐性化機構を検証する目的で、CDDP耐性膀胱癌細胞株を樹立し、耐性化獲得にマイクロRNA200bが関与していることに着目し、マイクロRNA200bをCDDP耐性株であるT24RCに過剰発現させることにより感受性が回復することを確認した。耐性株T24RCにおいてはマイクロRNA200b遺伝子のCpGメチル化が亢進しており、脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidineによりマイクロRNA200b発現が回復すること、また、同薬とCDDPの併用によりT24RCにおいて相乗的な増殖抑制効果が得られることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In present study, we aimed to unveil the mechanism of CDDP resistance in bladder cancer cells and focused on microRNA-200b. We established CDDP resistant T24 bladder cancer cells (T24RC) and compared to parental cells (T24). Among these two cell lines many microRNAs were changed dramatically. Over expression of microRNA200b, re-sensitize T24RC cells to CDDP. Moreover we confirmed that microRNA-200b is epigenetically regulated. When treated by 5-aza-2'-deoxycytidine, expression of microRNA-200b recovered and also sensitivity to CDDP recovered. Combination of CDDP and 5-aza-2'-deoxycytidine synergistically suppressed cell proliferation in T24RC cells.

研究分野：尿路上皮癌

キーワード：膀胱癌 マイクロRNA 抗がん剤抵抗性

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は癌のうち全世界における男性の死因の第7位である(文献)。消化器癌や乳癌、呼吸器癌と比較して分子機構の解明は不十分と言わざるを得なく、抗癌化学療法の効果予測マーカーが存在せず、耐性化機構に関する更なる研究が必要である。

現在膀胱癌に対する抗がん剤による全身化学療法としてはシスプラチン(CDDP)ベースのレジメンが標準的治療とされる(文献)。現在最も広く普及している化学療法レジメンとしては Gemcitabine, Cisplatin (GC)療法が存在する。転移性膀胱癌の標準治療および筋層浸潤性膀胱癌の術前補助化学療法としてのGC療法が施行される。

術前補助化学療法としてのGC療法はメタアナリシスにて根治手術単独と比較して全生存率に5%の改善をもたらすとされる。一方95%の症例では生存に関するメリットが得られず、過剰医療の可能性が示唆されている(文献)。しかしながら真に術前補助化学療法のメリットを享受できる症例とそうではない症例の選択は臨床的因子から決定することは困難である。

2. 研究の目的

膀胱癌におけるCDDP耐性化機構を解明することにより、効果予測マーカーを確立し全身化学療法の恩恵を得る症例を選択すること、また、CDDP抵抗性を克服することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膀胱癌細胞株 T24 を用い、長期間 CDDP 暴露することにより T24CDDP 耐性株 (T24RC) を樹立する。耐性細胞株と親株の miRNA 発現プロファイルを網羅的に解析して比較する (TaqMan MicroRNA Array v3.0)。

(2) 候補遺伝子・miRNA を抽出し、親株および耐性株への強制発現あるいはノックダウン実験を行うことで抗癌剤耐性への関与を検証する。

(3) TCGA(The Cancer Genome Atlas)データベースを用い、候補 miRNA 遺伝子発現と膀胱癌症例における予後の関連を検証する。

(4) 候補 miRNA 遺伝子の制御機構としてのエピジェネティックな変化をパイロセクエンス法にて検証する。

(5) 候補 miRNA を導入することで T24RC においてどのような遺伝子群が変化するか、マイクロアレイ解析を行う。

4. 研究成果

T24 細胞株に CDDP 暴露を継続することで CDDP 抵抗性 T24 株 (T24RC) を樹立した(図1)。

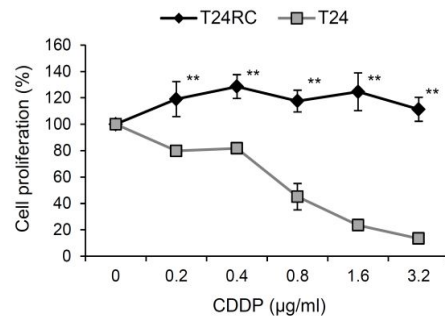


図1 CDDP耐性 T24 細胞株の樹立

親株および耐性株を用い、total RNA 抽出を行い、miRNA 発現アレイを行い両者の発現プロファイルを網羅的に解析すると T24RC において down regulate された上位 10miRNA 中 3 個が miRNA-200 family であり、T24RC において最も抑制されていた miRNA は miRNA-200b であった。T24RC に miRNA-200b を導入することにより CDDP 感受性が回復傾向を示した(図2)。

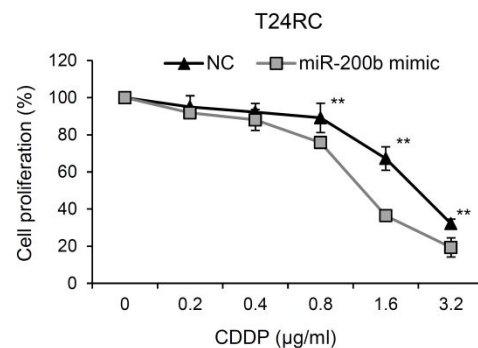


図2 miR-200b 導入による CDDP 感受性の変化

一方、T24 において miRNA-200b を抑制することにより CDDP 抵抗性が増強することを見出した(図3)。

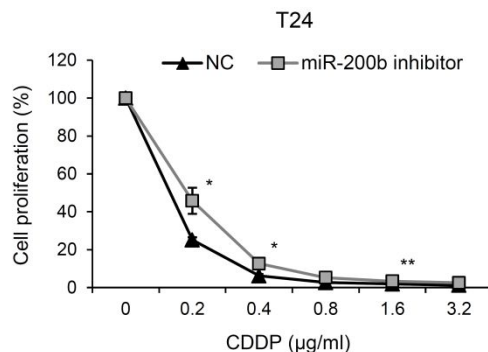


図3 miR-200b 抑制による CDDP 感受性の変化

miRNA-200b 上流の CpG island における DNA メチル化をバイサルファイト・パイロシークエンス法により検討すると耐性株において有意にメチル化が亢進していることを確認した。(図4)

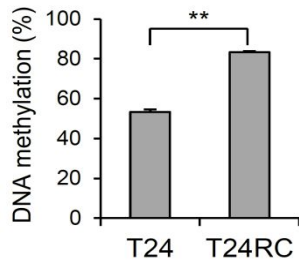


図4 miR-200b 遺伝子におけるメチル化の比較

DNA 脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza) による miRNA-200b 発現回復を定量的 PCR 法により検証したところ、有意に発現回復が見られ(図5) さらに 5-aza および CDDP を併用することで T24RC における細胞増殖能を相乗的に抑制することを検証した(図6)。

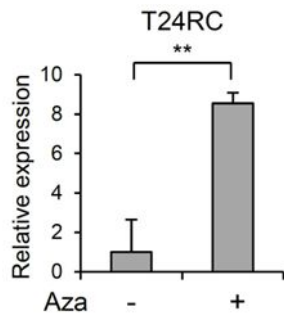


図5 5-aza 処理による miR-200b 発現回復

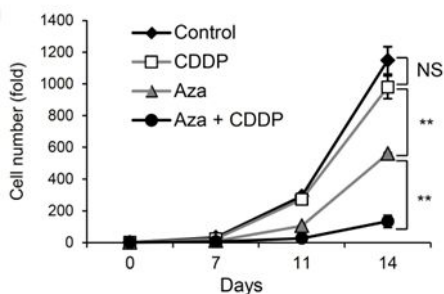


図6 T24RC における 5-aza および CDDP の相乗効果

miRNA-200b が CDDP 感受性に関与する分子機構を更に明らかにする目的で T24RC に miRNA-200b 導入および CDDP 暴露有無の 4 群に分けマイクロアレイ解析を行った(図7)。miRNA-200b 導入および CDDP 暴露を行った群ではアポトーシス関連遺伝子である TNFSF10

(TRAIL) などの遺伝子が発現上昇していた(図8)。更に、IGFBP3 や ICAM1 など CDDP 感受性と関連が報告されている遺伝子が上昇していることも見出した(図9,10)。

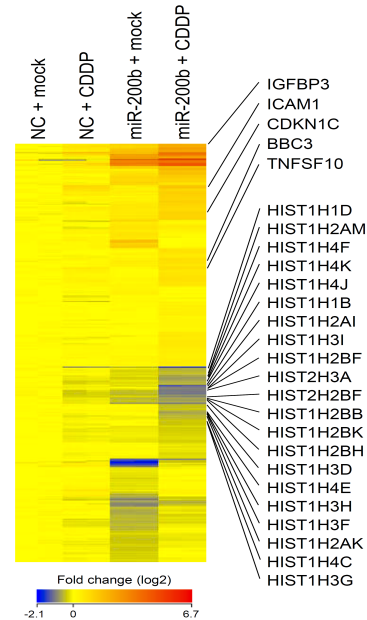


図7 T24RC における miR-200b 導入および CDDP 暴露による発現遺伝子の比較

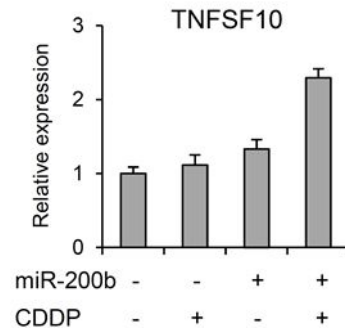


図8 T24RC における miR-200b 導入および CDDP 暴露による TNFSF10 発現

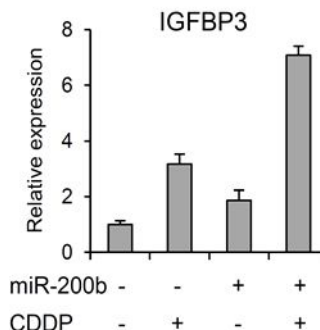


図9 T24RC における miR-200b 導入および CDDP 暴露による IGFBP3 発現

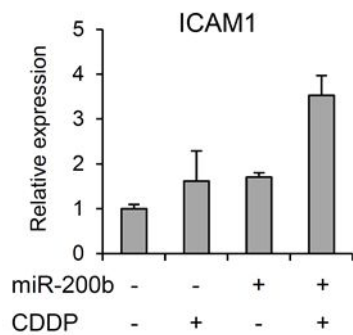


図10 T24RC における miR-200b 導入 および CDDP 暴露による ICAM1 発現

TCGA データベースを用い、stage2 以上の膀胱癌症例における miRNA-200b の意義および miRNA-200b 上流の CpG メチル化の意義を検討した。miRNA-200b 高発現群では予後は良好であり (図 11)、CpG メチル化が高値群では予後は不良であった (図 12)。

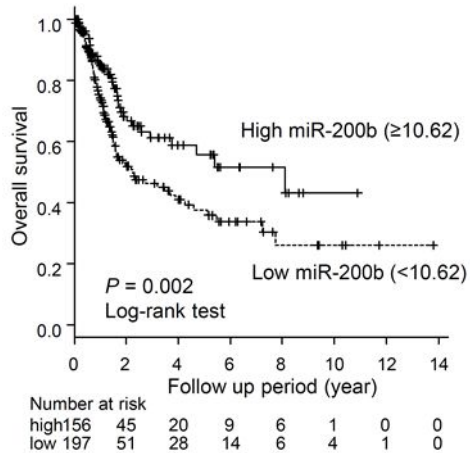


図11 膀胱癌症例におけるmiR-200b発現と予後の関連

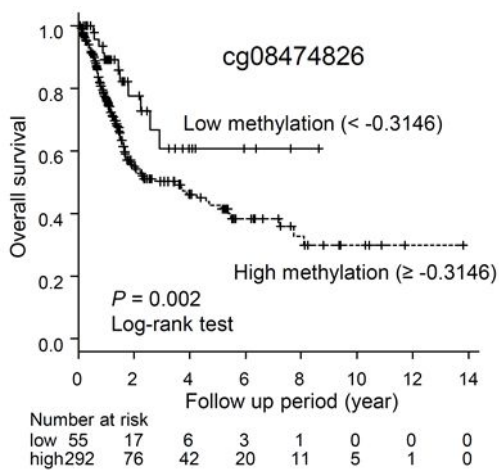


図12 膀胱癌症例におけるmiR-200b上流 CpGメチル化と予後の関連

以上より miRNA-200b が膀胱癌細胞においてエピジェネティックな制御を受け CDDP 感受性に関与する可能性を新たに見出した。

<引用文献>

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015; 65:87-108.

von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. J Clin Oncol. 2000; 18:3068-3077.

Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. Eur Urol. 2005; 48:202-205; discussion 205-206.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Tetsuya Shindo, Takeshi Niinuma, Naotaka Nishiyama, Nobuo Shinkai, Hiroshi Kitajima, Masahiro Kai, Reo Maruyama, Takashi Tokino, Naoya Masumori, Hiromu Suzuki, Epigenetic silencing of miR-200b is associated with cisplatin resistance in bladder cancer. Oncotarget. 2018; 9: 24457-24469. (査読あり)
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.25326>

[学会発表](計 4件)

Tetsuya Shindo, Naotaka Nishiyama, Takeshi Niinuma, Hiroshi Kitajima, Masahiro Kai, Takashi Tokino, Nobuo Shinkai, Hiromu Suzuki, Naoya Masumori. Downregulation of miR-200b is associated with cisplatin-resistance in bladder cancer cells AUA(米国泌尿器科学会)2017 (2017/5/11, 米国, ボストン)

Tetsuya Shindo, Takashi Shimizu, Naotaka Nishiyama, Takeshi Niinuma, Hiroshi Kitajima, Masahiro Kai, Nobuo Shinkai, Naoki Itoh, Toshiaki Tanaka, Hiromu Suzuki, Naoya Masumori. Diagnosis and prediction of recurrent bladder cancer by urinary DNA methylation analysis : multicenter prospective study EAU (欧州泌尿器科学会) 2017 (2017/3/24, イギリス, ロンドン)

進藤哲哉, 西山直隆, 丸山玲緒, 新沼猛, 甲斐正広, 北嶋洋志, 時野隆至, 鈴木拓, 舩森直哉. マイクロ RNA200b による膀胱癌シスプラチン耐性化機構 第26回泌尿器分子細胞研究会 (2017/3/11, 大分)

Tetsuya Shindo, Naotaka Nishiyama, Reo Maruyama, Takeshi Niinuma, Masahiro Kai, Hiroshi Kitajima, Takeshi Tokino, Hiromu Suzuki, Naoya Masumori. Identification of microRNAs associated with cisplatin resistance in bladder cancer cells 第75回日本癌学会 (2016/10/7, 横浜)
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

進藤 哲哉 (SHINDO, Tetsuya)
札幌医科大学・医学部・泌尿器科学講座・
助教
研究者番号：80749292

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

鈴木 拓 (SUZUKI, Hiromu)
札幌医科大学・医学部・分子生物学講座・教授 研究者番号：20381254

舩森 直哉 (MASUMORI, Naoya)
札幌医科大学・医学部・泌尿器科学講座・教授 研究者番号：20295356

(4) 研究協力者

()