

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16463

研究課題名(和文) miRNAを利用したがん化学療法の効果増強・非侵襲的效果予測を目指した基礎的研究

研究課題名(英文) Study to the enhancement and non-invasive effect prediction of the cancer chemotherapy using miRNA

研究代表者

田中 章太 (Tanaka, Shota)

神戸薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：40783684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オキサリプラチン耐性大腸がん細胞で細胞内発現量が低下しているmiRNAを探索したところ、3種類のmiRNAの発現量が低下していた。さらに、その中の1種類のmiRNAの細胞内発現量を減少させると、オキサリプラチンの感受性が減弱した。次に、オキサリプラチン耐性細胞の培地からエクソソームを単離し、そのmiRNAの細胞外エクソソーム中発現量を解析した。その結果、オキサリプラチン耐性細胞由来のエクソソーム内においてもそのmiRNAは少ない傾向にあった。また、イリノテカンやフルオロウラシルの耐性細胞を作製したが、感受性に影響を及ぼしたり、エクソソーム内発現量が変化しているmiRNAは見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんの化学療法において、その治療効果は患者によって大きく異なる。そのため、抗がん剤の効果増強法や患者ごとに適した治療を選択する個別化医療を推進するための診断法の開発が期待されている。本研究ではその発現を低下させるとオキサリプラチンの感受性が減弱するmiRNAを見出した。また、オキサリプラチン耐性細胞由来のエクソソーム内においてもそのmiRNAは少ない傾向にあることを見出した。これらの研究成果は、大腸がんの第一選択薬であるオキサリプラチンの効果を増強し、尚且つL-OHPの治療効果の非侵襲的バイオマーカーの開発に重要な知見だと考える。

研究成果の概要(英文)：The intracellular expression levels of three miRNAs were decreased in oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells. Furthermore, sensitivity of oxaliplatin was decreased by reducing the intracellular expression level of one of them. In addition, exosomes were isolated from the medium of oxaliplatin-resistant cells, and the expression level of the miRNA in extracellular exosomes was analyzed. The amount of miRNA in exosome secreted from oxaliplatin-resistant cells tended to be small. On the other hand, irinotecan and fluorouracil-resistant cells were established. However, miRNAs that affect sensitivity or change the expression level in exosomes were not found.

研究分野：薬学

キーワード：microRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

オキサリプラチン (L-OHP) は大腸がんの化学療法に使用される抗がん剤であるものの、その効果は患者によって大きく異なることが知られている。その背後にある要因として、大腸がん細胞には特定の抗がん剤に対する感受性がもともと低いもの、あるいは長期の治療により抗がん剤に対する感受性が低下した耐性獲得がん細胞が存在することが挙げられている。また、大腸がん用いられるイリノテカン (CPT-11) やフルオロウラシル (5-FU) においても同様の要因により患者によって治療効果が大きく異なる。そのため、患者ごとに適した抗がん剤を選択する個別化医療の推進を可能とする治療前診断技術の開発が待ち望まれている。また、大腸がんを使用できる抗がん剤は限られており、効果を増強する新規ストラテジーの開発も必要とされている。

2. 研究の目的

L-OHP 低感受性大腸がん細胞株及び申請者が作製した L-OHP 耐性獲得大腸がん細胞を用い、細胞内で L-OHP の感受性低下の要因となっている microRNA を明らかにする。次に、microRNA の細胞外エクソソーム中の発現量を評価し、L-OHP 感受性との因果関係を検証する。さらに、L-OHP 以外の大腸がん治療に用いられる抗がん剤の耐性を獲得した細胞を樹立し、同様の検討を行うことで、抗がん剤の感受性を抑制する microRNA と、そのエクソソーム中発現量を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

L-OHP を長期間処置することで樹立した L-OHP 耐性獲得 SW620 細胞 (SW620-0xR 細胞) 及び L-OHP 耐性獲得 HCT116 細胞 (HCT116-0xR 細胞) を使用した。また、L-OHP に対する感受性が他のヒト大腸がん細胞株と比較して低い SW480 細胞を L-OHP 低感受性として用いた。

(2) L-OHP 低感受性細胞株及び L-OHP 耐性獲得細胞における細胞内 miRNA 発現量の解析

L-OHP 低感受性大腸がん細胞及び L-OHP 耐性獲得大腸がん細胞において発現量が低下している miRNA をマイクロアレイ解析により網羅的に探索した。次に、低下していた miRNA について real-time RT-PCR 法により確認実験を行った。

(3) miRNA mimic または miRNA inhibitor を導入した細胞の L-OHP 感受性の検討

miRNA inhibitor を Lipofectamine によりヒト大腸がん細胞に処置し、WST-8 法を用い、L-OHP 感受性に及ぼす miRNA mimic または miRNA inhibitor の影響を評価した。

(4) 細胞外エクソソーム中における miRNA 発現の解析

各細胞の培養培地から超遠心法によりエクソソームを単離し、エクソソームマーカーの発現を Western blot 法により確認した。単離物がエクソソームであることを確認後、単離物から RNA を抽出し、L-OHP の殺細胞効果を増強することを明らかにした miRNA の発現量について real-time RT-PCR 法で定量した。

(5) 新規抗がん剤耐性細胞の樹立

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞を用い、申請者が過去に L-OHP 耐性獲得細胞を樹立した方法と同様の方法を用い、CPT-11 の耐性獲得細胞の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) L-OHP 耐性大腸がん細胞内の miRNA の比較

L-OHP 耐性大腸がん細胞で細胞内発現量が変化している miRNA をマイクロアレイで探索したところ、SW620-0xR 細胞、HCT116-0xR 及び SW480 細胞において miR-146b-5p 及び miR-6780a-5p の細胞内発現が多く、miR-33a-5p、miR-210-3p 及び miR-224-5p の細胞内発現が少なかった。さらに、real-time RT-PCR で確認実験を行った結果、マイクロアレイの結果と同様に miR-33a-5p、miR-210-3p 及び miR-224-5p の細胞内発現が有意に少なかった (Fig. 1)。

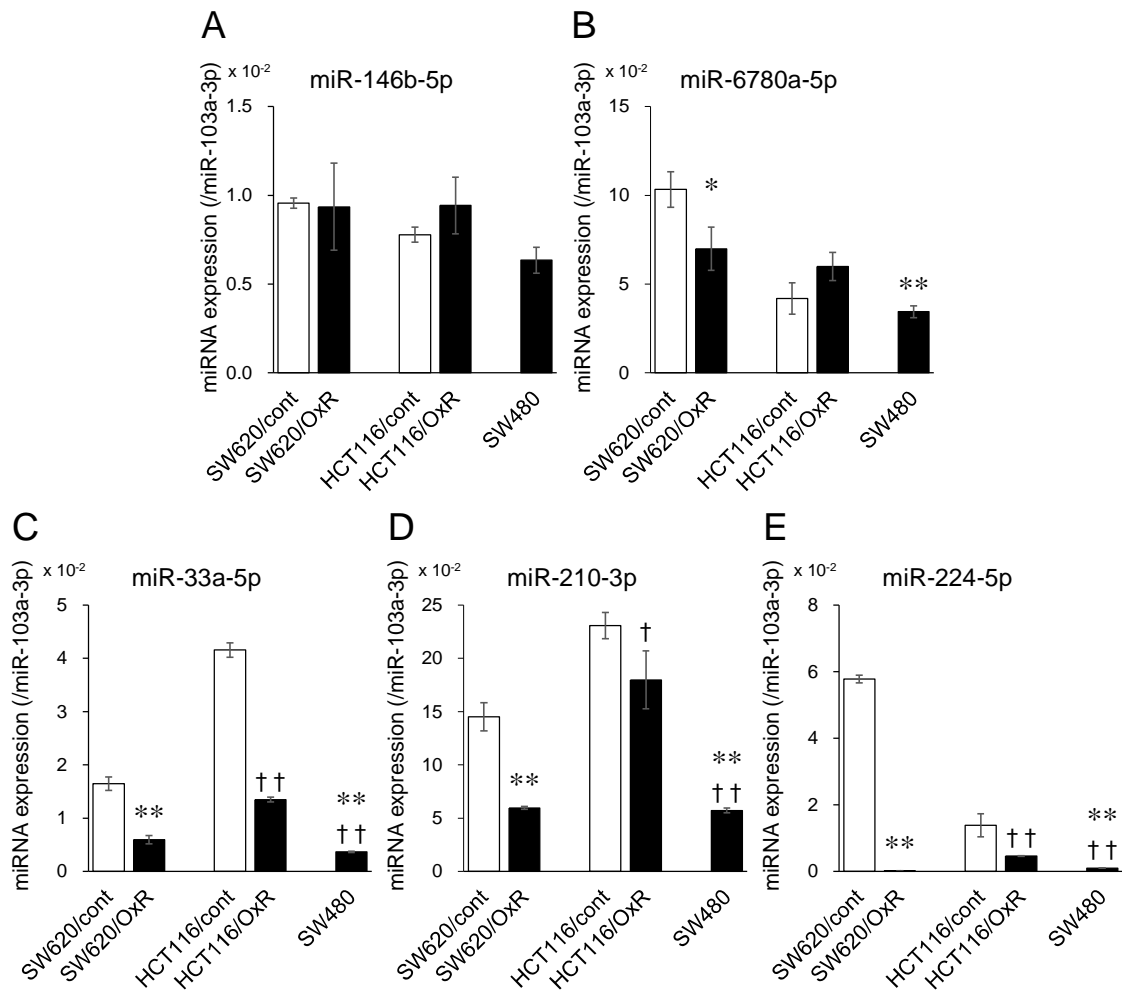


Fig. 1. L-OHP 耐性大腸がん細胞における細胞内 miRNA 発現量
Student-Newman-Keuls test, *p <0.05, **p <0.01 (vs SW620 cells), † p <0.05, †† p <0.01 (vs HCT116 cells)

(2) L-OHP 感受性に及ぼす miRNA の影響

次に、L-OHP 感受性に及ぼすこれらの miRNA の影響を明らかにするため、miRNA inhibitor を SW620 細胞に導入した。その結果、miR-33a の阻害剤を SW620 細胞に導入したところ、L-OHP の IC₅₀ 値が上昇した。一方、miR-210 及び miR-224 の阻害剤を処置しても L-OHP の IC₅₀ 値は有意に変化しなかった (Table 1)。

Table 1. miRNA 阻害剤を導入した SW620 細胞における L-OHP の IC₅₀ 値

	IC ₅₀ (μM)
control	9.90 ± 0.10
miR-33a-5p inhibitor	18.70 ± 3.13*
miR-210-3p inhibitor	10.72 ± 1.94
miR-224-5p inhibitor	7.15 ± 0.90

(3) エクソソーム内 miRNA の比較

SW620 細胞培養培地から単離したエクソソームからエクソソームマーカーである CD9 及び HSP70 が検出され、非エクソソームである APOA1 及び Calnexin は検出されなかった (Fig. 2A)。さらに、単離したエクソソームの粒子径は 78.38 ± 1.20 nm であったため、確かにエクソソームが単離されていると考えられた。

次に、real-time RT-PCR を用いてエクソソーム内の miR-33a-5p、miR-210-3p 及び miR-224-5p の発現量を比較した。その結果、miR-33a-5p 及び miR-210-3p のエクソソーム内発現量は L-OHP

感受性細胞と比較して少ない傾向にあった (Fig. 2B, 2C)。しかし、HCT116 細胞由来のエクソソーム内には miR-33a-5p の発現は認められず、さらに SW620 細胞及び SW620-OxR 細胞由来のエクソソームにおける miR-210-3p の発現量は、他の細胞由来エクソソームと比較して、著しく少なかった。また、miR-224-5p はいずれの細胞由来エクソソームにおいても発現を認めなかった。以上の結果より、miR-33a-5p は L-OHP 感受性を抑制し、なおかつ非侵襲的なバイオマーカーとなりうることを示された。

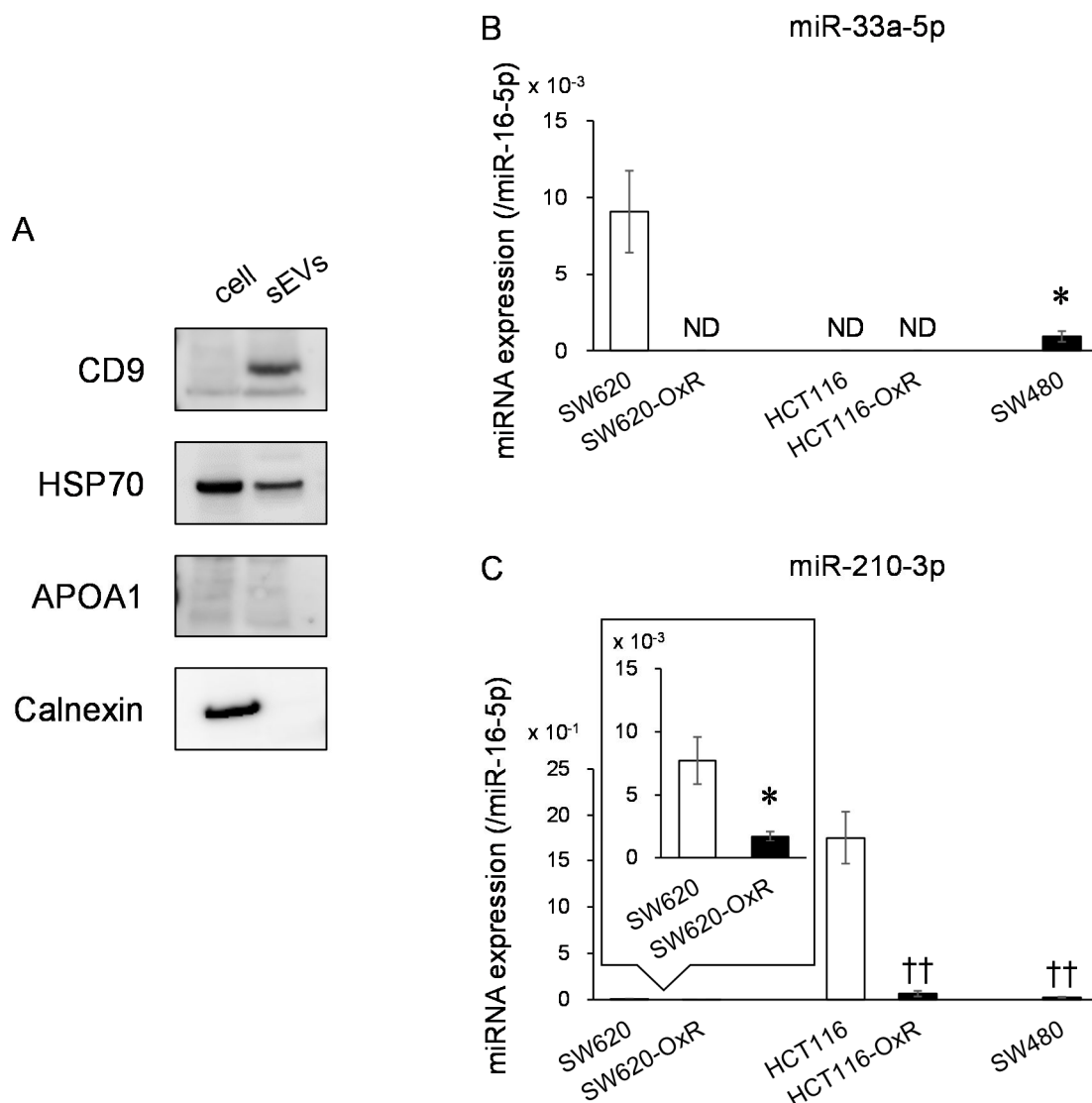


Fig. 2. L-OHP 耐性大腸がん細胞由来のエクソソーム内の細胞外 miRNA 発現量 (A) CD9、HSP70: エクソソームマーカータンパク質、APOA1、Calnexin: 非エクソソームマーカータンパク質 (B, C) Student's t-test, *p < 0.05 (vs SW620 cells), Student-Newman-Keuls test, †† p < 0.01 (vs HCT116 cells). ND: Not detected

(4) CPT-11 及び 5-FU 耐性細胞の樹立

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞に対し、濃度を段階的に上昇させて CPT-11 を 147 日間処置した。その結果得られた細胞 (HCT116/CPT-11 細胞) では、HCT116 細胞と比較して CPT-11 の IC₅₀ 値が著しく大きく、CPT-11 耐性を獲得したことを示した。一方、L-OHP 及び 5-FU の IC₅₀ 値は変化しなかった。そのため、HCT116/CPT-11 細胞は交叉耐性を示さないことが明らかとなった (Table 2)。

Table 2. IC₅₀ values of CPT-11, 5-FU, and L-OHP in HCT116/CPT-11 cells

Cell	HCT116	HCT116/CPT-11
CPT-11	1.13 ± 0.29	21.09 ± 1.84
5-FU	3.25 ± 0.30	4.38 ± 0.19
L-OHP	0.92 ± 0.09	0.44 ± 0.11

(5) CPT-11 耐性細胞における miRNA 発現量の比較

HCT116/CPT-11 細胞で細胞内発現量が変化している miRNA をマイクロアレイで網羅的に探索したところ、HCT116 細胞と比較して、miR-224-5p の発現量が増加していた。また、real-time RT-PCR により確認試験を行ったところ、miR-224-5p の有意な増加を認めた (Fig. 3)。

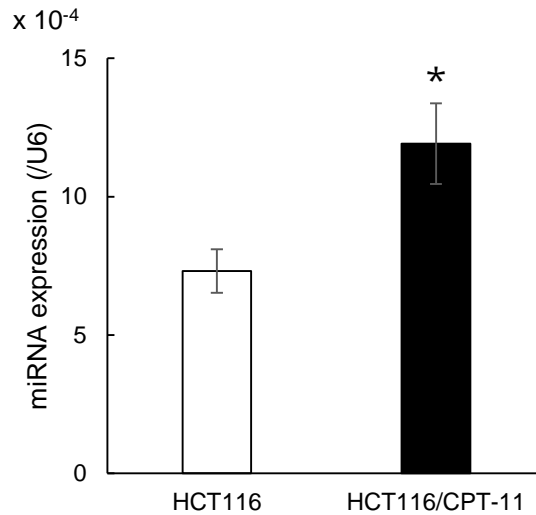


Fig. 3. CPT-11 耐性大腸がん細胞における細胞内 miRNA 発現量
Student's t-test, *p < 0.05 (vs HCT116 cells).

しかし、miR-224-5p の細胞内発現量を増加させても CPT-11 の感受性に影響はなく、HCT116 及び HCT116/CPT-11 細胞由来のエクソソーム内において miR-224-5p の発現は認めなかった。以上の結果より、miR-224-5p は CPT-11 の効果増強や非侵襲的な効果予測には不適であることを示した。そのため、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Shota, Hosokawa Mika, Miyamoto Takumi, Nakagawa Aiko, Haruna Mika, Ueda Kumiko, Iwakawa Seigo, Ogawara Ken-ichi	4. 巻 26
2. 論文標題 miR-33a-5p in small extracellular vesicles as non-invasive biomarker for oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100996 ~ 100996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.100996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------