

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861177

研究課題名(和文) GIST培養細胞のマイクロRNA解析による新規バイオマーカー探索と薬剤感受性予測

研究課題名(英文) New biomarker search and drug sensitivity prediction by the microRNA analysis of the GIST cultured cell

研究代表者

松井 恒志 (Matsui, Koshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：20422636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：1)GIST症例手術切除標本からのマイクロRNAを解析しImatinib投与前後にmiR146b-5pとmiR335の2つのマイクロRNAが亢進していることが解析できた。2)GIST培養細胞の樹立が可能となった。3)GIST細胞株をnude mouse皮下へ移植し、作成したマウス皮下移植モデルから血液サンプルを採取しマイクロRNAの発現変化を確認することができた。4)GIST患者の血液サンプルを採取し、マイクロRNAの検出を行った。しかしながら、切除標本から得られたマイクロRNAの結果と、血液サンプルから検出されたマイクロRNAの発現に一致がみられなかった。

研究成果の概要(英文)：1)We were able to analyze the microRNA from a GIST operation cases, and two microRNA of miR146b-5p and miR335 aggravated in before and after Imatinib dosage. 2)The establishment of the GIST cultured cell was enabled. 3)GIST cell strain was transfused into the nude mouse and we collected a blood sample from the mouse subcutaneous transplant model and confirm an expression of microRNA change. 4)We collected the blood sample of the GIST patient and detected the microRNA. However, agreement was not seen in expression of microRNA detected by a result and a blood sample of the microRNA obtained from the excision specimen.

研究分野：消化器外科

キーワード：GIST マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor; GIST) は主に消化管壁に原発する、紡錘型ないし類上皮型細胞からなる腫瘍で、免疫組織学的に KIT を発現する。GIST の約 90% に c-KIT 遺伝子の、また約 5% に血小板由来成長因子受容体 (platelet derived growth factor receptor; PDGFR) 遺伝子の突然変異を伴う。変異型 KIT および PDGFR はリガンド非依存性に恒常的活性化を来し、下流のシグナル伝達系分子 (MAPK、STAT3、5、PI3K) を活性化するため、腫瘍細胞の増殖が起こると考えられている。GIST における KIT および PDGFR を標的としたメシル酸イマチニブによる分子標的治療は、消化器腫瘍の中で最も成功したモデルケースと言っても過言ではない。しかしながら、メシル酸イマチニブに対する耐性、特に二次耐性の問題は、患者の長期予後を決定する重要な因子となりつつある。したがって、今後の課題として耐性メカニズムのさらなる解明および耐性症例に対する治療方法の検討 (集学的治療や新規分子標的治療薬の開発) が必要である。さらには、治療開始前に GIST の性格 (薬剤感受性・予後予測など) を評価できれば個々に合ったオーダーメイドな治療が可能である。そこで最近注目されているのがバイオマーカーとしてのマイクロ RNA である。マイクロ RNA は短鎖の RNA であり、蛋白を合成する際に mRNA を翻訳レベルで調節することにより遺伝子発現を制御している。このマイクロ RNA は生命現象で重要な役割を果たしており、正常の発生段階に重要なみならず腫瘍形成などの疾患の原因であると報告されている。GIST においてはマイクロ RNA の解析がほとんど行われていない状態であるが、現在我々は、GIST におけるマイクロ RNA の発現異常を解析し、いくつかのターゲットに限定することに成功し、さらなる解析を進めている。また、組織中や血中に存在するマイクロ RNA を測定

することで、GIST の診断や予後予測が可能である。血液サンプルからのマイクロ RNA の検出はアーチファクトや定量の問題より困難とされているが、最近膵癌や前立腺癌で検出が可能となったという報告がみられるようになっており、GIST においてもその検出が期待できる。GIST におけるマイクロ RNA の解明にはまず、ターゲットとするマイクロ RNA の決定が重要である。我々はパラフィン切片から mRNA を抽出する方法を確立しており (2009, 2010 癌学会ランチョンセミナーにて発表)、過去の手術症例から得られた病理標本から 3D gene チップにて網羅的にマイクロ RNA を検出する方法を確立した。また、手術で切除した標本から得られた GIST 細胞の細胞株樹立に成功しており、さらにはヒト GIST をマウスに皮下移植することに成功している (投稿中)。これは世界的に報告がほとんどなく、研究をすすめるにあたり、非常に有利な状態となった。このマウスモデルを用いることで、より臨床に近い状況での薬剤感受性試験やヒト由来のマイクロ RNA を検出することで容易に新たなバイオマーカーの検索が可能であると期待できる。さらには新規分子標的治療薬などの開発にもマウスモデルを用いることで、より安全に治療薬の開発が出来ることと期待できる。

2. 研究の目的

GIST の治療において用いられる薬剤は限られている上に、高価で薬剤耐性も非常に問題となっている。これは医学的のみならず、医療経済的にも早急に薬剤耐性のメカニズムの解明と新規薬剤の開発が求められている。我々はこれまでの研究成果により、世界でも希少な GIST の培養細胞株とマウス皮下移植腫瘍モデルの樹立に成功し、飛躍的にそのメカニズムが解明できる状態となった。今回の研究では GIST 症例の手術材料からマイクロ RNA 解析を行い、GIST の薬剤感受性に関する新たなバイオマーカーを探索し、培養細胞に

てその機能を検証する。さらに、マウス皮下移植腫瘍モデルにて血液からヒト由来マイクロ RNA を検出するシステムを確立し、ヒトでの薬剤感受性試験、予後因子の予測に応用する。

3. 研究の方法

(1) 手術切除標本からのマイクロ RNA の発現解析

切除標本から得られたサンプルから mRNA の調整を行い、3D gene チップを用いて遺伝子発現プロファイル解析を行う。術前イマチニブあるいはスニチニブ投与症例において術後病理検査における効果判定に基づく感受性群と非感受性群とで miRNA の発現をマイクロアレイを用いて比較し、薬剤耐性に関与すると思われる候補マイクロ RNA を探索する。候補マイクロ RNA の組織標本での発現を RT-PCR および in situ hybridization で確認する。

(2) 培養細胞を用いたマイクロ RNA の機能解析

候補薬剤耐性マイクロ RNA について GIST 培養細胞での発現を確認し、siRNA 発現ベクターを作製する。同ベクターを遺伝子導入し安定発現株を作製したのち Mock 株を対照としてイマチニブおよびスニチニブに対する感受性の変化を in vitro で検討する。候補マイクロ RNA の標的タンパクを target prediction などを用いて探索し、その発現変動を確認し候補マイクロ RNA の機能解析を行う。

(3) マウス皮下移植モデルを用いた血液サンプルからのマイクロ RNA の解析

上記細胞株を nude mouse 皮下へ移植し in vivo での薬剤耐性の変化を検討する。

確立しているマウス皮下移植モデルから血液サンプルを採取する。候補となるマイクロ RNA の発現変化を確認する。

(4) GIST 患者の血液サンプルからのマイクロ RNA 解析の確立

GIST 培養細胞を皮下に注入したマウス皮下移植腫瘍モデルから、血液サンプルを抽出し、一定の期間におけるヒト由来マイクロ RNA の発現レベルの変化をリアルタイム PCR を用いてモニターする。その際に RNA 検出の至適条件を決定し、ヒトでの条件に照らし合わせる。現在 GIST 患者の術前術後、術後フォローアップ期間の血液サンプルをストックしており、これらの血液サンプルを用いてマイクロ RNA の解析を行う。

4. 研究成果

(1) GIST 症例手術切除標本からのマイクロ RNA の発現解析

Name	global normalization	
	GIST pre	GIST post
hsa-miR-142-5p	8.3	49.1
hsa-miR-1	10.8	53.3
hsa-miR-377*	4.9	23.5
hsa-miR-133b	23.8	107.8
hsa-miR-146b-3p	5.8	21.5
hsa-miR-148a*	4.7	16.7
hsa-miR-193a-5p	7.8	27.8
hsa-miR-3122	8.1	26.5
hsa-miR-563	4.6	14.8
hsa-miR-146b-5p	963.8	3107.6
hsa-miR-3065-5p	18.0	57.1
hsa-miR-154	51.7	163.7
hsa-miR-223	58.8	184.8
hsa-miR-105	7.7	24.2
hsa-miR-335	591.3	1829.4
hsa-miR-4514	8.0	24.2
hsa-miR-409-5p	39.2	116.5
hsa-miR-3150a-3p	16.0	47.4
hsa-miR-1298	10.4	30.6
hsa-miR-150	11.0	32.1

Imatinib 投与前後にて miR146b-5p と miR335

の2つのマイクロRNAが亢進していることが解析できた。

(2) 培養細胞株を用いたマイクロRNAの機能解析

培養細胞の樹立が可能となった。しかし、長期での継代が困難であることがわかり、培養条件の調整により安定株の確立を行っている。

(3) マウス皮下移植モデルを用いた血液サンプルからのマイクロRNAの解析

GIST細胞株をnude mouse皮下へ移植しin vivoでの薬剤耐性の変化を検討した。作成したマウス皮下移植モデルから血液サンプルを採取しマイクロRNAの発現変化を確認することができた。

Name	global normalization	
	GIST pre	GIST post
hsa-miR-3907	46.9	8.0
hsa-miR-93	823.7	168.8
hsa-miR-1248	105.8	25.0
hsa-miR-3135b	1791.6	431.8
hsa-miR-3714	21.6	5.7
hsa-miR-4435	247.4	88.8
hsa-miR-106b	1890.7	698.5
hsa-miR-135b	59.3	22.3
hsa-miR-222	188.4	74.2
hsa-miR-210	828.1	330.3
hsa-miR-33a	21.7	8.9
hsa-miR-4758-3p	467.1	192.7
hsa-miR-135a*	11.0	4.6
hsa-miR-3649	16.4	7.0
hsa-miR-412	10.7	4.7
hsa-miR-218	149.3	68.1
hsa-miR-4485	169.5	77.6
hsa-miR-3667-5p	16.2	7.6
hsa-miR-106a	811.1	385.1
hsa-miR-4756-5p	46.8	22.4

(4) GIST患者の血液サンプルからのマイクロRNAの解析

GIST患者の血液サンプルを採取し、マイクロRNAの検出を行った。しかしながら、切除標

本から得られたマイクロRNAの結果と、血液サンプルから検出されたマイクロRNAの発現に一致がみられなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 森山亮仁, 渡辺徹, 平野勝久, 山口哲司, 大澤宗士, 神山公希, 橋本伊佐也, 渋谷和人, 北條莊三, 吉岡伊作, 松井恒志, 澤田成朗, 奥村知之, 吉田徹, 長田拓哉, 嶋田裕, 塚田一博. ヒト由来 GIST 皮下移植マウスモデルの樹立に関する臨床病理学的因子の検討. 第114回日本外科学会総会. 2014.4.3 京都.

2. 森山亮仁, 嶋田裕, 北條莊三, 吉岡伊作, 松井恒志, 澤田成朗, 奥村知之, 吉田徹, 長田拓哉, 塚田一博. 第69回日本消化器外科学会総会. 2014.7.16 福島.

〔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:
出願年月日:
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

松井 恒志 (Matsui Koshi)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)助

教

研究者番号：20422636

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：