

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861416

研究課題名(和文)膀胱癌における塩酸ゲムシタピン耐性に関するmiRの同定と作用機構の解明

研究課題名(英文) Identifying miRNAs associate for Gemcitabine resistance of bladder cancer and elucidating functional roles of their target genes.

研究代表者

加藤 卓 (Kato, Taku)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50596202

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)：膀胱癌細胞株T24より塩酸ゲムシタピン耐性膀胱癌細胞株T24GRを樹立した。mRNA microarray解析にて両者を比較した結果、ARのmRNAはT24GRで有意に上昇しており、タンパクレベルでも同様にT24GRにおいてARの発現が上昇していた。T24GRに対するアンドロゲンの影響を調べるため、アンドロゲン除去血清もしくは抗アンドロゲン薬であるエンザルタミドを使用したところ、T24GRはT24と比べ有意に増殖が減弱した。

我々はARは塩酸ゲムシタピン耐性膀胱癌への新規治療標的になると考え、現在機能解析とARを標的としたmiRNAの同定を行っている。

研究成果の概要(英文)： We generated gemcitabine-resistant T24GR bladder cancer cells from parental T24 cells. mRNA microarray analyses showed Androgen receptor (AR) expression was higher among T24GR cells than parental T24 cells. Western blotting analysis also showed AR protein expression level was higher in T24GR. To assess the influences of androgen to AR positive T24GR cells, we cultured cells under androgen depletion or enzalutamide, one of the anti-androgen drug. Androgen depletion and enzalutamide attenuated bladder cancer cell proliferation among T24GR cells compared to parental T24 cells.

We hypothesized AR could be a novel therapeutic target to gemcitabine-resistant bladder cancer. Now we are studying functional role of AR among gemcitabine-resistant bladder cancer and miRNAs targeting AR.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：膀胱癌 塩酸ゲムシタピン Androgen receptor miRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦における膀胱癌の年齢調整罹患率は7.6で年々増加傾向にある。膀胱癌の初期治療は手術療法が選択されるが、切除不能膀胱癌に対する治療は塩酸ゲムシタピンを中心とした化学療法が第一選択となる。しかしながら化学療法による膀胱癌の根治は困難であり、やがて化学療法に対する耐性を獲得し膀胱癌死に至る。現在化学療法抵抗性膀胱癌に対する有効な治療は確立していない。したがって膀胱癌が化学療法耐性を獲得する機序や化学療法耐性膀胱癌に対する新規治療標的遺伝子を解明することは、切除不能膀胱癌の根治を目指す上でも臨床上非常に重要である。

Micro RNA (miRNA)は21から25ntの非常に短いRNAであり、標的となるmRNAの3'-非翻訳領域(3'-UTR)に結合し、翻訳を阻害またはmRNAを分解することにより、転写後のレベルで遺伝子発現を調節している。一つのmiRNAは複数のmRNAを標的とする一方で、一つのmRNAは複数のmiRNAの標的になっている。miRNAの標的mRNAの候補は、標的遺伝子予測データベースで検索することは可能であるが、真の標的mRNAを同定するためには、培養細胞における機能解析が必要となる。これまでに1000種類以上のmiRNAが同定されており、さまざまな悪性腫瘍でmiRNAの発現異常・機能的役割が報告されている。

現在切除不能膀胱癌に対する治療法の一つに塩酸ゲムシタピンを用いた化学療法が挙げられる。膀胱癌の塩酸ゲムシタピン耐性の獲得に関わる遺伝子機構やその制御に関わるmiRNAは研究開始当初あまり知られておらず、我々はそれらの機構を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

近年、miRNAの悪性腫瘍における発現異常・機能的役割、バイオマーカー・治療標的としての可能性が指摘されている。

塩酸ゲムシタピン感受性膀胱癌細胞株(T24, 5637)とそれより樹立した塩酸ゲムシタピン抵抗性膀胱癌細胞株(T24GR, 5637GR)間、塩酸ゲムシタピン投与症例と未使用症例の膀胱癌検体間、また同一症例における塩酸ゲムシタピン投与前後の膀胱癌検体を用いたmRNA・miRNAマイクロアレイ解析データに基づき詳細な機能解析を行い、塩酸ゲムシタピン抵抗性に関与するmiRNAを同定するとともに、その標的mRNAを同定し、miRNAの作用機構とそれらが癌細胞の表現型に及ぼす影響を明らかにしたい。現在化学療法耐性膀胱癌に対する有効な治療法は確立されておらず、本研究により、膀胱癌の新規バイオマーカー同定、新規治療法開発につながる知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1)膀胱癌細胞株であるT24と5637を低濃度の塩酸ゲムシタピン存在下に培養し、徐々に塩酸ゲムシタピン濃度を上げることにより50 nM塩酸ゲムシタピン存在下で増殖する膀胱癌細胞株T24GRと5637GRを樹立した。

(2)正常膀胱細胞株SV-HUC-1とT24、5637、T24GR、5637GRのtotal RNAを抽出し、mRNA・miRNAマイクロアレイ解析を行う。

(3)マイクロアレイ解析の結果を元にゲムシタピン耐性膀胱癌に対する新規治療標的遺伝子となりうるmRNAとその制御に関わるmiRNAの候補を選択する。

(4)網羅的遺伝子解析の結果候補となった遺伝子のmRNA、miRNAの発現をRT-PCR法で確認する。

(5)標的遺伝子のタンパクレベルの発現をWestern blotting法で確認する。

(6)遺伝子導入によるmiRNAの発現変化が癌細胞の表現型(増殖、遊走・浸潤、塩酸ゲムシタピン感受性)に及ぼす影響を評価する。

(7)miRNAの標的mRNAをmiRNA標的遺伝子予測データベースで検索し選抜した後、レポーターアッセイ等を行い、候補mRNAがそのmiRNAの真の標的であるかどうか検討する。

(8)遺伝子導入による標的mRNAの発現変化が癌の表現型に及ぼす影響を評価する。以上の研究により、塩酸ゲムシタピン耐性の獲得に関与するmiRNAを同定するとともに、標的mRNAを同定しそのmiRNAの作用メカニズムを明らかにする。

(9)これらの結果から得られた遺伝子のin vivoでの影響を検討するためmiRNAやsiRNAにて標的遺伝子の発現を変化させた塩酸ゲムシタピン耐性膀胱癌細胞をヌードマウスに皮下に移植し、増殖能や転移能を検討する。

(10)標的遺伝子のヒトでの発現を検討するために、膀胱癌手術標本や患者血清、尿等の検体を用い標的遺伝子の発現を検討する。

4. 研究成果

(1)網羅的遺伝子解析の結果T24GRにおいてT24と比較しAndrogen receptor (AR)の発現が増強していることに着目した。

(2)実際にARのmRNAがT24で高発現しているかを確認するため、RT-PCRを行った。その結果ARのmRNAはT24GRでT24と比較し有意に発現が上昇していた(図1)。

(3)蛋白レベルでの発現を比較するため、Western blotting法にて解析を行い、ARが

蛋白レベルでも T24GR において高発現していることを確認した(図2)

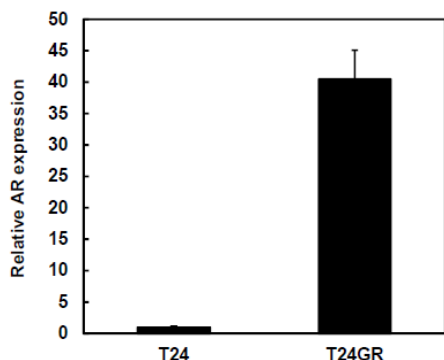


図 1

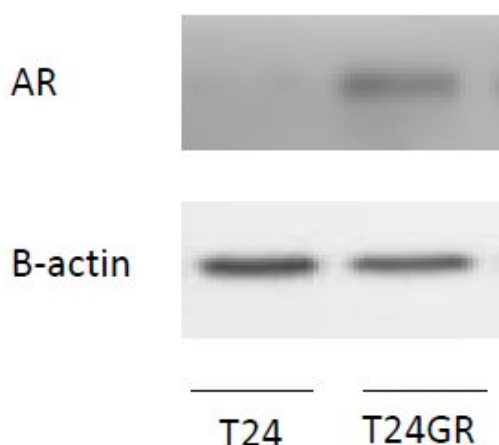


図 2

(4)AR の発現とアンドロゲンの関係の評価するため、チャコールフィルターにてアンドロゲンを除去した培地を用いて培養した細胞と AR の阻害薬である enzalutamide を添加した培地を用いて培養した細胞の増殖を比較したところ、T24GR では T24GR と比較しアンドロゲン除去、AR 阻害により有意に増殖は減弱した(図3)

(5)現在、塩酸ゲムシタピン耐性膀胱癌細胞における AR の機能解析と AR を標的とする miRNA について検討を行っている。miRNA マイクロアレイの結果から、AR を標的とすることが予想される miRNA の候補を選抜し、AR の発現への影響や、癌の増殖、遊走・浸潤能、塩酸ゲムシタピン耐性への影響を検討中である。

(6)in vivo での AR の影響を調べるため、去勢したヌードマウスと去勢していないヌードマウスの皮下に T24GR を移植し、腫瘍の増殖について検討中である。

(7)その他に実際に塩酸ゲムシタピン投与症例と非投与症例での膀胱癌摘出標本を用い免疫染色を行い AR の発現を検討する予定である。

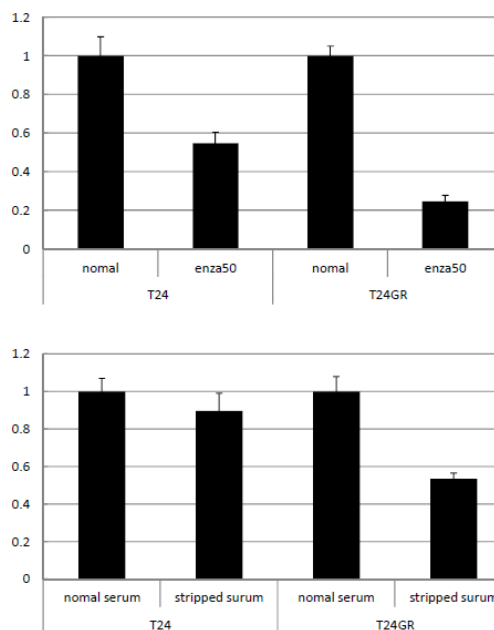


図 3 enza 50: enzalutamide 50nM

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)

Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Kawakami K, Fujita Y, Nakane K, Kanimoto Y, Ehara H, Ito H, Seishima M, Deguchi T, Ito M.

Serum exosomal P-glycoprotein is a potential marker to diagnose docetaxel-resistance and select taxoid for prostate cancer patients.

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. In press. 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

加藤 卓（KATO, Taku）

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50596202

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし