

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 11 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860978

研究課題名(和文) 膵癌細胞での重粒子線治療抵抗性に対するmicroRNAの関与の解析

研究課題名(英文) The role of the microRNA in the radiation resistance using pancreatic cancer cell

研究代表者

岡本 雅彦 (Okamoto, Masahiko)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451725

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)：放射線抵抗性株Panc-1XRをGemcitabineの繰り返し暴露によって作成した。hsa-miR-34a-5pを発現されるプラスミドを含むベクターをtransfectionさせ、Panc-1-mir34aOEという細胞株を作成した。この細胞は放射線に対して感受性を示し、より少ない量の放射線により死滅する結果が得られ、膵癌の放射線抵抗性改善の糸口になる可能性が示された。mir-34aはcancer stemnessに關与するSnailやMsi1をターゲットにすることが知られており、今後はより詳細な細胞シグナルの解析や、重粒子線照射のデータを追加し、論文化する予定である。

研究成果の概要(英文)：First of all, we made a cell line that show radiation resistance by repeating low dose Gemcitabine exposure. We use a pancreatic cancer cell line with name of Panc-1. We name the radiation resistance cell line as Panc-1 XR. We compare the microRNA status of Panc-1 XR and wild type. Then try temporary insertion of some kind of microRNA. Finally we made a cell line that stably overexpress the mir-34a by transecting vector. The stable OE cell line (panc-1-34aOE) show radiation sensibility against X-ray irradiation. Therefore, approaching to the microRNA mir-34a could improve the resistance against treatment in the pancreatic cancer.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線抵抗性 膵癌 microRNA

1. 研究開始当初の背景

膵癌に対する放射線治療の局所制御率は低い。その抵抗性としてがん幹細胞の存在や低酸素細胞の存在などが想定される。炭素イオンによる重粒子線治療は高 LET であり、低酸素細胞や通常の放射線治療に抵抗性である細胞に対しても有効であることが知られているが、一部の腫瘍は重粒子線にも抵抗性を示すことが知られておりそのメカニズムは未知である。

我々の施設では炭素イオンを用いた重粒子線治療と Gemcitabine を用いた化学療法の併用による第 2 相臨床試験を 2013 年 7 月より開始している。重粒子線治療は、放射線感受性が高く有害事象を来しやすい消化管や肝臓等の臓器を避けつつ腫瘍に線量を集中させることが可能である。加えて重粒子線は殺細胞効果が X 線よりも高いため、従来の治療と比してより高い局所制御率が得られる可能性がある。先行施設である放射線医学総合研究所からは治療後 2 年での局所制御率が 63% と良好な成績が得られている。

しかしながら 4 割の患者においては治療部位での腫瘍制御が得られないという現状がある。局所再発を来す原因としては周囲の放射線感受性の高い消化管などに接する部分で重粒子線の線量を減らす必要がある場合、あるいは体内の腫瘍や周囲臓器の移動により十分な線量が投与されない可能性があった場合といった、物理的に線量不足となっていることが示唆されるケースも多い。その一方で、腫瘍の中心部など重粒子線が十分に照射されていることが考えられる部位において、治療後に再発をすることもあり、これは腫瘍内に重粒子線に抵抗性を示す細胞が存在することを示唆する。この克服のための一方として、単純に照射される重粒子線の量を増加させるというのもあり得る。しかしながら、腫瘍が消化管に包囲されているという解剖学的な位置関係から、現在使用されている炭素イオン線の量より更に多くの量を照射することは有害事象の増加が効率で予測されることから、現在の治療技術では困難である。従って、さらなる局所制御率の向上のためには 1) 腫瘍側の炭素イオン線に対する感受性の増加 2) 抗腫瘍効果のある治療 (分子標的薬、免疫治療など) の追加 といった手段を講じる必要がある。

今回申請する研究ではこの腫瘍側の炭素イオン線に対する抵抗性の改善を主たる目的とする。

microRNA は細胞内シグナル伝達の調整因子として近年注目を集めており、膵癌においても各種の microRNA と浸潤能や増殖能に関する影響が報告されている。しかしながら X 線や重粒子線治療と関連した microRNA の報告は未だ少なく、特に重粒子線治療と関連した報告は現在のところ見られず、その関係は未知である。

2. 研究の目的

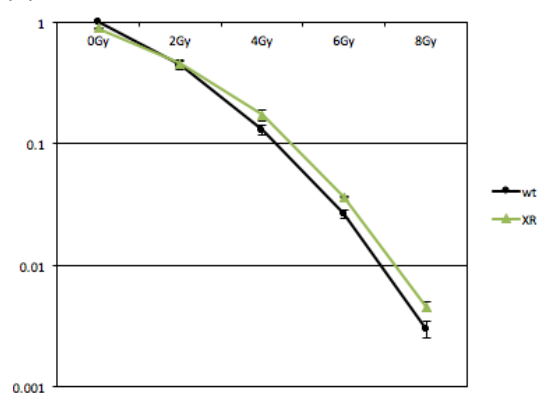
このような重粒子線治療に対する抵抗性を示す細胞に対して細胞内の microRNA の変化を測定・推察し、microRNA に介入することで重粒子線治療抵抗性の改善、あるいは感受性の向上を得る方法を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞が死に至らない低線量の X 線の繰り返し照射により、放射線に抵抗性を示す膵癌細胞株 Panc-1 XR を作成した。この Panc-1 XR は重粒子線照射に対しても wild type より高い細胞生存率を示した。解析は clonogenic assay でなされた。方法について以下の Franken らの方法に従った。X 線照射後 2 週間で固定。細胞数 100 個以上を含むコロニーをカウントした。

N. a P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro.," Nat. Protoc., vol. 1, no. 5, pp. 2315-9, Jan. 2006.

図 1



しかしこの方法では若干の X 線抵抗性は得られたものの、上記図 1 の如く、有意な X 線抵抗性を誘導するところまでは至らず、続けての抵抗性メカニズムの解析に足りるものではないと判断された。

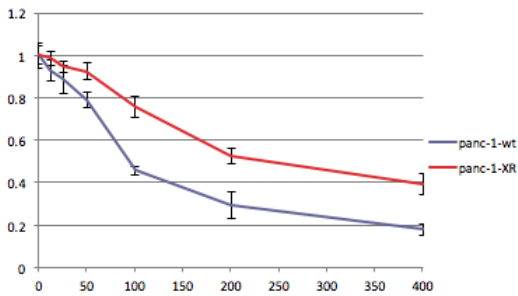
そのため Gemcitabine を繰り返し暴露させることによって Gemcitabine の抵抗性を誘導する方法へと切り替えた。これは Zhiyong らがすでに報告している方法である。Dig Dis Sci. 2011 Mar;56(3):741-50

Gemcitabine については Zhiyong の方法に従い、細胞が死滅しない濃度である 0-10uM の各種濃度の培地を作成し、継代を 1 か月ほど行った。研究者の実験系においては Gemcitabine 4uM 以上の濃度では 1 か月経過の間に細胞数は非常に減少し、また生き残った細胞を Gemcitabine を含まない培地に戻しても良好な培養にはいたらず、4uM は高濃度であると判断された。最終的に 2uM、1uM、0.5uM で継代した細胞を用いて Gemcitabine ならびに、X 線への抵抗性を上述の

clonogenic assay ならびに MTS assay で調査した。
最も抵抗性を示した 2uM で継代を継続した細胞株を panc-1-XR として確定した。

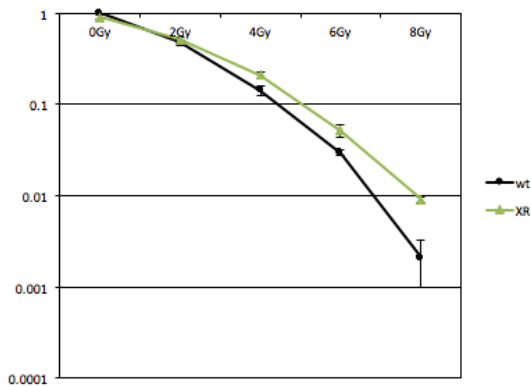
Wild type との Gemcitabine の抵抗性の違いを図 2 に示す。
図 2 は Gemcitabine 24 時間暴露後の MTS assay の結果である。

図 2



Panc-1-XR は IC50 の有意な増加を示している。
この panc-1-XR の放射線抵抗性を clonogenic assay にて確認した(図 3)。

図 3



これは図 3 の如く有意な放射線抵抗性を示した。

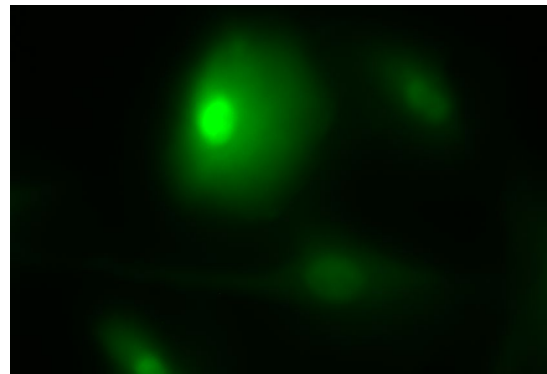
当初は microRNA については wildtype とこの panc-1-XR の発現プロファイルを比較することで検討する予定であったが、予算ならびに期間の問題で、膵癌ならびに他の癌種における放射線や化学療法の抵抗性に係る microRNA から候補の microRNA を絞り込む事と方針を変更した。絞り込みの方法としては、pubmed で microRNA と radiation resistance あるいは chemoresistance を検索し、miRBase (<http://www.mirbase.org/>) で target となりうる配列を参照し、signaling pathway として下流に細胞分裂や生存に係る因子を多く含むものを探求した。

最終候補に残った microRNA のなかで、まずは最も有力である hsa-mir34a-5p についての検討を行う方針とした。

hsa-miR-34a-5p を発現させる lentivirus を

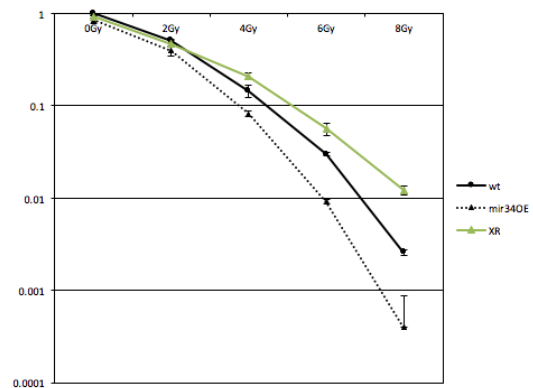
Dharmacon 社より購入し、推奨プロトコール通りに panc-1 wild type 細胞に transfection させた。当該 lentivirus は puromycin に対する耐性を獲得される配列も有しているために、puromycin にて transfection が成功した細胞の selection を行った。この lentivirus はまた GFP を発現させるため、transfection については GFP により確認が可能であった(図 5)。

図 5



この細胞の放射線感受性を clonogenic assay にて検討した。図 6 に示す如くより少ない放射線量で細胞は死滅し、放射線の感受性を誘導できたことが確認された。

図 6



4. 研究成果

上述のごとく、放射線や化学療法に抵抗性を示す細胞内の因子として、microRNA mir-34a の関与が示唆され、Mir-34a の過剰発現は放射線抵抗性の改善に結びつくことが推察された。その要因としては mir-34a の過剰発現により、図 7 に示されるその下流にあるとされるがん幹細胞で過剰発現すると考えられる Snail、notch といったシグナルの抑制やアポトーシスの制御に携わる Bcl-2、survivin の抑制が関与していることが考えられた。

今後は細胞シグナルの具体的な抑制状況の解析や、cancer stem cell としての性質の確

認を進めることでより詳細なメカニズムが明らかになると考えられる。また今回は時間の関係で重粒子線の感受性の評価については不十分であったが、今回の研究のなかで確立された放射線抵抗性株 panc-1-XR ならびに放射線感受性株 panc-1-mir34a0E についてもその生残率について評価していく予定である。また、今回はまず最初のステップとして mir-34a については wild type のみに transection したが panc-1-XR への transfection を現在行っているところであり、これにより panc-1-XR で獲得された放射線抵抗性が実際に改善するかが検証できると考えている。それらの結果を併せて検討した後に、論文発表などを行っていく予定である。

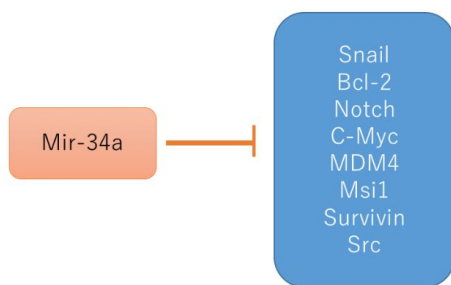


図 7

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 件)

準備中

〔学会発表〕(計 件)

準備中

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

岡本 雅彦 (OKAMOTO, Masahiko)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451725

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()