

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16310

研究課題名(和文)食道癌における新規核酸医薬としてのcircularRNAに関する研究

研究課題名(英文)A Novel Circular RNA in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

山田 萌 (Yamada, Moyuru)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00781717

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)：食道扁平上皮癌では、治療抵抗性を示し根治に至らない症例を散見する。そこで、治療抵抗性を改善するような新しい核酸創薬の開発を目的に本研究を行った。創薬の鋳型として解析対象としたのはcircular RNA(circRNA)という環状のRNAである。circRNAは遺伝子発現を調節する機能を有し、線状のRNAよりも分解されにくいという特性を持つ。食道癌細胞とそのシスプラチン耐性株でのcircRNAの発現を次世代シーケンサーにて網羅的に調べ、耐性株にて高発現となるCircXを検出した。複数の細胞株での発現パターンや薬剤感受性試験にて再現性が示され、CircXは治療抵抗性に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌における治療抵抗性に関わるcircular RNAの候補として同定された。さらなる検証によりCircXが治療抵抗性のメカニズムがあきらかになれば、CircXの配列を鋳型に人工合成した環状RNAを用いた治療抵抗性改善薬の開発を目指したい。また、CircXは食道癌組織でも発現が見られ、治療効果や予後を予測するバイオマーカーとしての可能性についても検討の余地がある。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is poor, underlying mechanisms causing therapy resistance being unknown. Circular RNAs (circRNAs) is a type of non-coding RNAs with closed loop structure. Recently it has been reported that circRNAs have function to modulate the expression of genes. Here, we analyzed the expression profile of human circRNAs in ESCC cells and Cisplatin-resistant cells in order to detect the circRNAs concerning with therapy resistance.

Altogether, 19085 circRNAs were identified and 87 were significantly upregulated in TE11R. In qPCR targeting top 10 upregulated circRNAs, CircX was upregulated in Cisplatin resistant TE8 cells as well as in TE11R. In vitro, chemosensitivity assay demonstrated that silence of CircX by siRNA increased Cisplatin-sensitivity in TE11. CircX was identified as upregulated target in Cisplatin-resistant cells and supposed to be concerned with the chemosensitivity in ESCC.

研究分野：消化器外科

キーワード：circular RNA 治療抵抗性 シスプラチン 食道扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は、固形癌の中でも最も悪性度が高い癌の一つである。化学療法、手術、放射線療法を用いた集学的治療が進歩しつつあるが、治療に抵抗性を示す症例も多く、依然として予後は不良である。治療効果の改善のため、治療抵抗性メカニズムの解明や新規の治療法の開発は喫緊の課題である。

circRNA は 1976 年に存在が確認されていた(Sanger HL. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1976) が、スプライシング反応の副産物とみなされており、その機能については長らく不明であった。しかし近年、non-codingRNA の働きが解明されつつあり、中でも circular RNA (circRNA) は転写や翻訳を制御する新たな内因性調節因子としての機能が注目されている。circRNA は数百～数千程度の塩基からなり、環状構造を有することにより線状 RNA よりも安定している。1000 種以上の存在が確認され、豊富に発現している。また、組織特異性や分化度特異性を有し、原始的な種からヒトに至るまで進化を経て保存されている。circRNA の持つこれらの機能や特性から、新たなバイオマーカーや核酸医薬の主演としての有用性が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道扁平上皮癌と関連する circRNA を特定すること、さらには、特定された circRNA を用いた新たな核酸医薬の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

ESCC の細胞株である TE11 を 24 週間 CDDP に暴露し、TE11CDDP 耐性株(TE11R)を樹立した。薬剤感受性試験(MTT 法)における 50% 阻害濃度は TE11 が 1.29 μ M, TE11R が 17.4 μ M であった。各 3 検体ずつ 6 検体を解析対象とし、それぞれから抽出した RNA を RNaseR にて線状 RNA を分解除去したのちに Illumina HiSeq®を用いて解析し、CIRCexplorer®を用いて circRNA の検索を行った。circRNA の発現は環状構造が生成される際に生じる特異的な配列を増幅部位するプライマーを用いて qRT-PCR 法 (β -actin にて相対定量) にて定量した。また、検索されたターゲットについて薬剤感受性試験にて再現性を検証した。

4. 研究成果

CIRCexplorer®にて 19085 の circRNA が検出され、87 が TE11R で有意に高発現($p < 0.05$, fold-change > 2.0)、105 が有意に低発現($p < 0.05$, fold-change < 0.5)であった。TE11R において TE11 と比較して低発現または高発現を示した target のうちそれぞれ 5 の target について、TE11 と TE11R における発現定量を行ったところ、7 の target において発現定量が可能であった。高発現を示した target circRNA のうち、circ_X において、TE11R は TE11 と比較してそれぞれ 5.1 倍高発現であった。また、circ_X は TE8 の CDDP 耐性株においても TE8 よりも高発現を示した (図 1)。また TE11、TE11R について siRNA を用いて circ_X をノックダウンし、薬剤感受性試験を行ったところ、circ_X のノックダウンにより CDDP 感受性が増強することが確認された (図 2、3)。circ_X が高発現であることは薬剤耐性に関連することが示唆された。

circ_X と CDDP 耐性または治療抵抗性におけるメカニズムの解明について、今後さらなる検証を行う予定である。

図1 TE8、TE11 およびその耐性株(TE8R、TE11R)における circ_X の発現

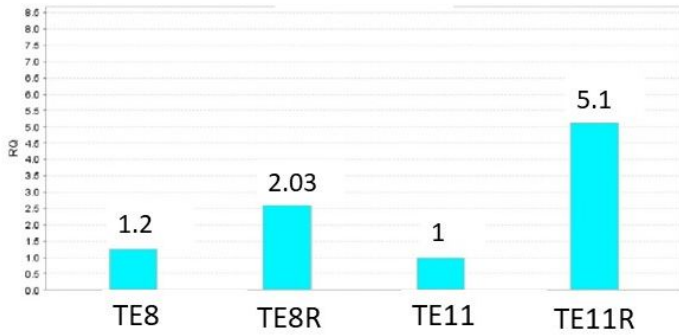


図2 Si circ_X 導入下における TE11 と TE11R の発現

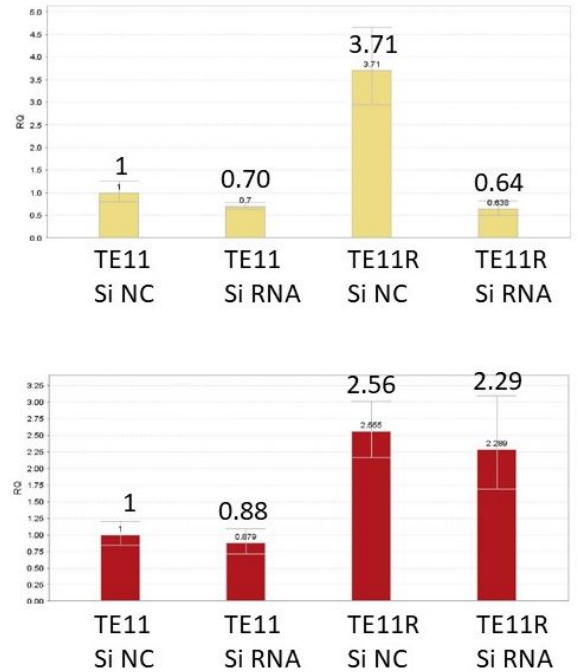
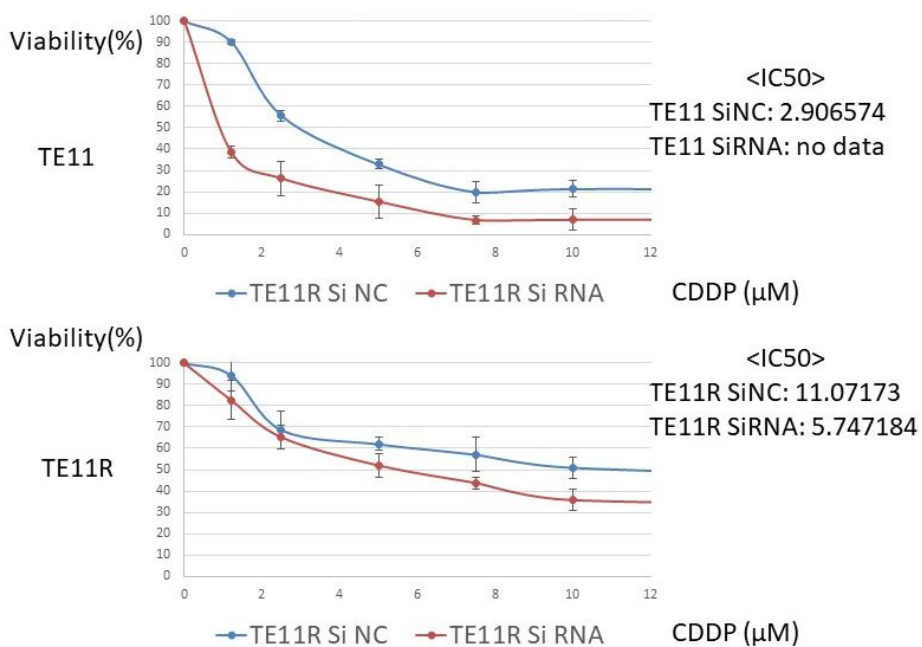


図3 Si circ_X 導入下における 薬剤耐性試験(シスプラチン 48時間 暴露)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田萌、田中晃司、山下公太郎、西塔拓郎、牧野知紀、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における治療抵抗性に関連するcircular RNAの網羅的探索
3. 学会等名 日本外科学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----