

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18615

研究課題名(和文) 多面的アプローチによる膀胱癌のGCプライマリレジスタンスを予測するマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of the marker predicting GC primary resistance of the bladder cancer by multifaceted approach

研究代表者

米森 雅也 (YONEMORI, Masaya)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00758013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膀胱癌細胞株(BOY, T24)をシスプラチン添加培養液で6か月間継続して培養することで樹立したシスプラチン耐性株(CDDP-R-BOY, CDDP-R-T24)を用いて、シーケンス解析を行い、シスプラチン耐性株で変化しているmicroRNA(miRNA)を検索した。解析結果より28個のmiRNAを候補に挙げ、miR486-5pが最も強い増殖抑制効果を示すことが分かった。miR-486-5pの標的としてEHHADHに注目し、標的遺伝子をノックダウンすることにより増殖能・遊走能・浸潤能が抑制され、更にシスプラチン投与にて相加相乗効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性・転移性膀胱癌における標準治療であるゲムシタピン + シスプラチン療法に対するプライマリーレジスタンスとして、miR-486-5pを同定した。シスプラチン耐性膀胱癌細胞の増殖アッセイにてmiR486-5pは最も強い増殖抑制効果を示し、miR-486-5pの標的としてペルオキシソームにおける長鎖脂肪酸の分解、脂肪酸の酸化に關与する機能を有するEHHADHを発見した。EHHADHをノックダウンすることにより増殖能・遊走能・浸潤能が抑制され、更にシスプラチン投与にて相加相乗効果が認められた。これらの結果より、膀胱癌におけるシスプラチン耐性のメカニズムの一端を解明することができた。

研究成果の概要(英文)：Using cisplatin-resistant strains (CDDP-R-BOY, CDDP-R-T24) which we had established by culturing human bladder cancer cell strain (BOY, T24) in cisplatin addition culture medium for six months, we searched microRNA(miRNA) which changed with a cisplatin resistant strain. Among 28 candidate miRNAs, we found showed that miR486-5p has the strongest suppressant effect in cisplatin-resistant strains. We also found that knocking EHHADH, a target of miR-486-5p, inhibited proliferation, migration, and invasion ability in cisplatin-resistant strains.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱癌 GC療法抵抗性

1. 研究開始当初の背景

進行性膀胱癌の予後は不良であり、再発・転移症例に対してゲムシタビン + シスプラチン (GC)療法が 1st ライン治療であるが、GC に対するプライマリーレジスタンスの症例や治療後に再発をきたす症例も少なからず存在する。これらの症例に対して、有効な 2nd ラインの治療法は確立されていなかったが、最近、免疫チェックポイント阻害剤であるペンブロリズマブが保険適応となった。さらに現在、これを 1st line とする臨床試験が進行中であり、近い将来に実現するものと考えられている。その奏効率は 20% 程度ではあるが 10% 程度に長期生存例が報告され、期待度は大きい。しかしながら適応症例選択のための腫瘍マーカーはまだ開発されていない。翻って、GC が著効する症例もあるため、まずは GC に対するプライマリーレジスタンスを見極める腫瘍マーカーの開発が重要と考えた。

2. 研究の目的

本研究では従来の RNA シーケンスやマイクロ RNA の発現プロファイルに基づく解析に加えて、メタボロミクス解析や新しいゲノム編集技術である CRISPR ライブラリーを膀胱癌細胞に導入して解析する。このように多くのデータベースから多面的アプローチを行い、核心的な GC に対するプライマリーレジスタンスを予測する有効な腫瘍マーカーを見つける提案である。

3. 研究の方法

GC 耐性機序の核心的な機序の解明と耐性克服が可能となる既存薬剤を提案する基礎データを収集するために次のステップを踏みながら明らかにしていく。

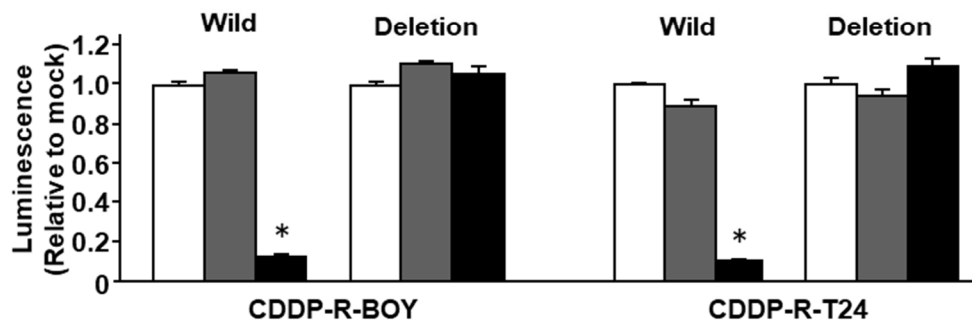
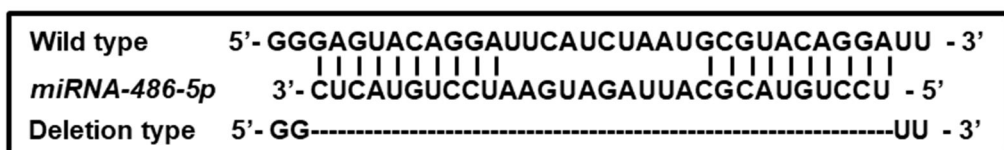
- (1) GC 耐性膀胱癌細胞株の RNA シーケンス・メタボロミクス・マイクロ RNA シーケンス解析による GC 耐性関連遺伝子およびタンパクの同定
- (2) CRISPR ライブラリーを用いた GC 耐性に関わる遺伝子群の同定
- (3) 候補マーカーの同定と膀胱癌患者血清での測定による実証

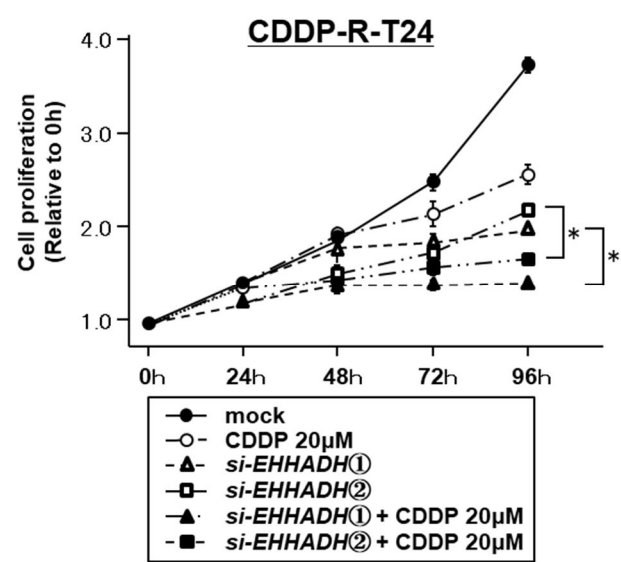
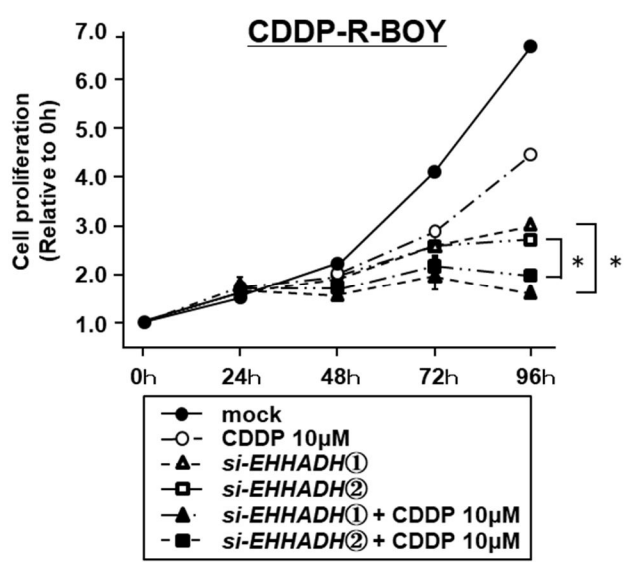
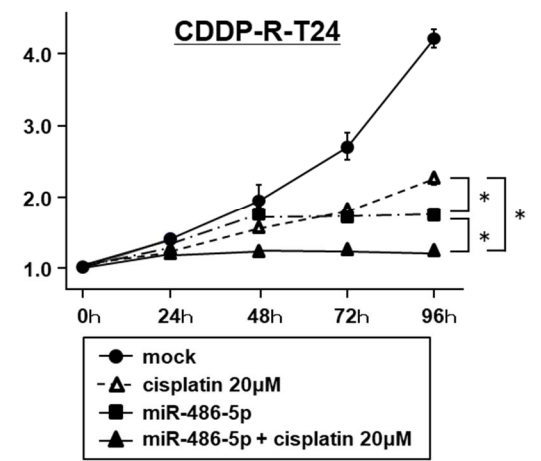
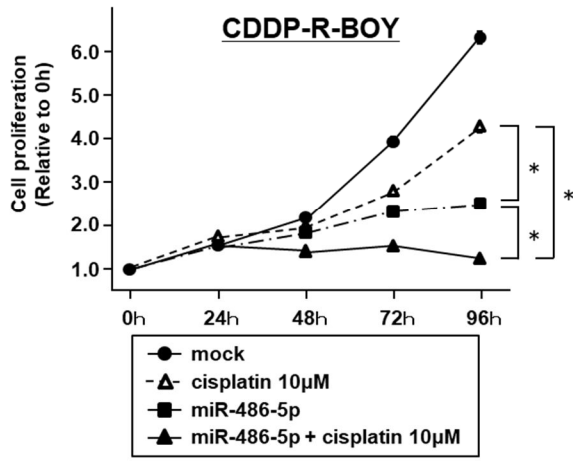
4. 研究成果

進行性・転移性膀胱癌における標準治療であるゲムシタビン + シスプラチン療法に対するプライマリーレジスタンスとして、miR-486-5p を同定した。シスプラチン耐性膀胱癌細胞の増殖アッセイにて miR486-5p は最も強い増殖抑制効果を示し、miR-486-5p の標的としてペルオキシソームにおける長鎖脂肪酸の分解、脂肪酸の酸化に関与する機能を有する EHHADH を発見した。EHHADH をノックダウンすることにより増殖能・遊走能・浸潤能が抑制され、更にシスプラチン投与にて相加相乗効果が認められた。これらの結果より、膀胱癌におけるシスプラチン耐性のメカニズムの一端を解明することができた。

Luciferase reporter assay

Position 1145 - 1179 of *EHHADH* 3' UTR





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Osako Yoichi, Yoshino Hirofumi, Sakaguchi Takashi, Sugita Satoshi, Yonemori Masaya, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki	4. 巻 54
2. 論文標題 Potential tumor suppressive role of microRNA-99a-3p in sunitinib-resistant renal cell carcinoma cells through the regulation of RRM2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1759-1770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4736	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 -

1. 著者名 Sugita Satoshi, Yoshino Hirofumi, Yonemori Masaya, Miyamoto Kazutaka, Matsushita Ryosuke, Sakaguchi Takashi, Itesako Toshihiko, Tatarano Shuichi, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki	4. 巻 54
2. 論文標題 Tumor-suppressive microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 2222-2236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4762	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 -

1. 著者名 Okamura Shunsuke, Yoshino Hirofumi, Kuroshima Kazuki, Tsuruda Masafumi, Osako Yoichi, Sakaguchi Takashi, Yonemori Masaya, Yamada Yasutoshi, Tatarano Shuichi, Nakagawa Masayuki, Enokida Hideki	4. 巻 21
2. 論文標題 EHHADH contributes to cisplatin resistance through regulation by tumor-suppressive microRNAs in bladder cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-07717-0	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 -

1. 著者名 Yoshino Hirofumi, Enokida Hideki, Osako Yoichi, Nohata Nijiro, Yonemori Masaya, Sugita Satoshi, Kuroshima Kazuki, Tsuruda Masafumi, Tatarano Shuichi, Nakagawa Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Characterization of PHGDH expression in bladder cancer: potential targeting therapy with gemcitabine/cisplatin and the contribution of promoter DNA hypomethylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2190 ~ 2202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12697	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
研究協力者	吉野 裕史 (YOSHINO Hirofumi) (90642611)		
研究協力者	大迫 洋一 (OSAKO Yoichi) (60793354)		
研究協力者	鶴田 雅史 (TSURUDA Masafumi)		
研究協力者	黒島 和樹 (KUROSHIMA Kazuki)		

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
---------	---------