

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462031

研究課題名(和文)大腸癌におけるオキサリプラチン耐性の異なる二つの分子マーカー同定と臨床応用

研究課題名(英文) Detection and application of different molecular markers associated with Oxaliplatin resistance in colorectal cancer

研究代表者

富田 尚裕 (Tomita, Naohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00252643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大腸癌細胞株DLD1とHCT116でオキサリプラチン(OHP)耐性株を樹立、研究に用いた。DLD1由来のOHP耐性細胞は、OHPのみに耐性であるが、HCT116由来のOHP耐性細胞は5-FU、CPT-11、トリフルオロチミジンにも耐性を示した。HCT116におけるOHP及び多剤耐性のメカニズムを見出すために、HCT116由来OHP耐性細胞の細胞培養、腫瘍組織での遺伝子発現を親細胞での遺伝子発現の違いをマイクロアレイ解析で比較、検討した。さらにエクソーム解析の結果と併せるとLMO7, LTBP1, WWWC3が、蛋白機能を考えるとAKR1C1, AKR1C3が分子マーカー候補であった。

研究成果の概要(英文)：We used oxaliplatin resistant clones derived from DLD1 and HCT116 for this study. The clones derived from HCT116 were resistant to 5-FU, CPT-11, and TFT other than OHP, although those from DLD1 were resistant to OHP alone. We compared gene expressions between HCT116 and OHP resistant clones in cell culture and tumor by microarray analysis. LMO7, LTBP1, and WWWC3 were considered as molecular marker when exon sequence data was combined with array data. AKR1C1 and AKR1C3 were considered as molecular marker, when function of the candidate genes were included for consideration.

研究分野：大腸外科

キーワード：オキサリプラチン 薬剤耐性 大腸癌 AKR1C1 AKR1C3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オキサリプラチン(以下 OHP)の薬剤感受性マーカーは実用化には至っていない。

2. 研究の目的

ヒト大腸癌細胞株からオキサリプラチン耐性細胞をクローニングし、クローンを調べることで薬剤耐性のメカニズムの発見を目指した。

3. 研究の方法

HCT116 とそのオキサリプラチン耐性クローン(HCT/OHP1, HCT/OHP3, HCT/OHP5)、DLD1 とそのオキサリプラチン耐性クローン(DLD/OHP1, DLD/OHP4, DLD/OHP5)の遺伝学的差異を見つけることが出来れば大腸癌治療におけるバイオマーカーになると考え、マイクロアレイ解析とエクソーム解析を行い、マーカーを抽出することを試みた。特に HCT116 での耐性メカニズムは多剤耐性メカニズムに繋がると考えられたので、重点的に行った。また、マウス皮下腫瘍モデルでも薬剤耐性が認められるかどうかを調べて、薬剤耐性に関する遺伝子の絞り込みを行った。

4. 研究成果

薬剤に対する IC50 は

オキサリプラチン (OHP; μM)

DLD1: 4.1, DLD/OHP1: 11.7, DLD/OHP4: 10.2, DLD/OHP5: 16.8

HCT116: 0.6, HCT/OHP1: 3.5, HCT/OHP3: 9.7, HCT/OHP5: 7.1

5-FU (μM)

DLD1: 0.6, DLD/OHP1: 0.6, DLD/OHP4: 0.9, DLD/OHP5: 0.9

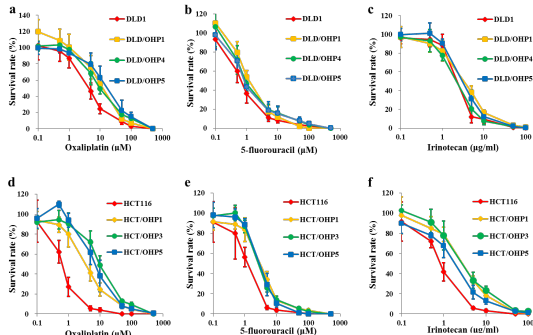
HCT116: 1.2, HCT/OHP1: 3.0, HCT/OHP3: 2.6, HCT/OHP5: 2.9

CPT-11 ($\mu\text{g/ml}$)

DLD1: 7.1, DLD/OHP1: 8.3, DLD/OHP4: 7.0, DLD/OHP5: 8.0

HCT116: 0.8, HCT/OHP1: 2.8, HCT/OHP3: 2.7, HCT/OHP5: 1.8

Figure 1

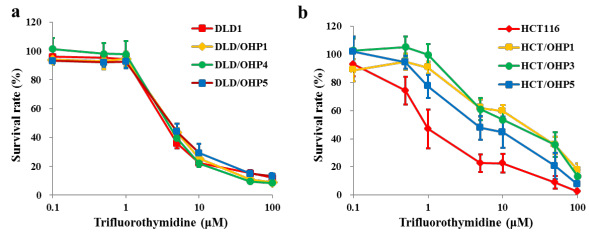


トリフルオロチミジン (TFT) (μM)

DLD1: 3.4, DLD/OHP1: 4.1, DLD/OHP4: 3.7, DLD/OHP5: 4.2

HCT116: 1.1, HCT/OHP1: 20.2, HCT/OHP3: 16.7, HCT/OHP5: 7.9

Figure 2



DLD1 由来の耐性細胞は全てオキサリプラチンにのみ耐性で 5-FU, CPT-11, トリフルオロチミジンといった他の抗癌剤に対して感受性を維持していた。一方、HCT116 由来のオキサリプラチン耐性細胞は全て 5-FU, CPT-11, トリフルオロチミジンにも耐性であり、臨床問題となる多剤耐性となっており、その耐性メカニズムの解明は DLD1 よりも重要と考えられた。

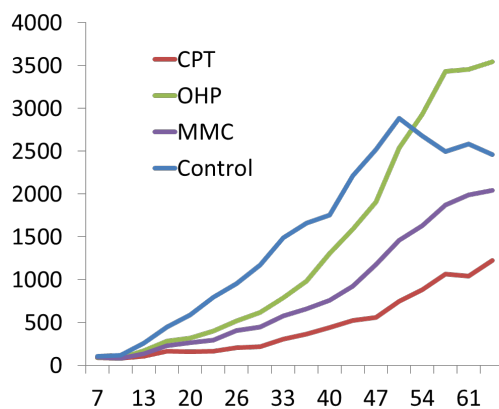
細胞培養でのマイクロアレイの解析結果(耐性 3 クローン全てで、HCT116 に比べて 2 倍以上変化している遺伝子を抽出)はオキサリプラチン耐性細胞で 785 遺伝子発現上昇、502 遺伝子発現減少しており、その中からマーカーとなる遺伝子を抽出するのは困難であった。またエクソーム解析で HCT116 と比べて 3 クローン全てでどこかに変異がある遺伝子は 353 個あった。

また細胞培養で見られた薬剤耐性が皮下腫瘍でも見られるかをチェックした。

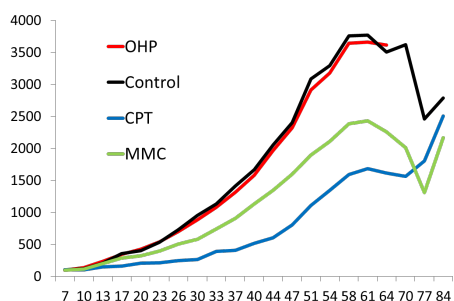
マウス皮下腫瘍モデルでの腫瘍増殖抑制率(値が大きいほど治療効果あり)

HCT116 腫瘍; OHP: 0.34, CPT-11: 0.59

HCT116 腫瘍増殖曲線(下図)



HCT/OHP5 腫瘍 ; OHP:0.07, CPT-11: 0.38
HCT/OHP5 腫瘍での腫瘍増殖曲線 (下図)



OHP では明らかに抗癌剤耐性になっているが、CPT-11 に対してはやや耐性となっている。

マウス皮下腫瘍モデルでの遺伝子発現を HCT116 と HCT/OHP1, HCT/OHP5 で比較すると、オキサリプラチン耐性腫瘍で 530 遺伝子 2 倍以上発現上昇、287 遺伝子 2 倍以上発現低下していた。

細胞培養と皮下腫瘍モデル両方で HCT116 に比して 2 倍以上発現上昇している遺伝子は 88 遺伝子、2 倍以上減少している遺伝子は 29 遺伝子であった。

上昇していた遺伝子

ADAMTS14, AKR1C1, AKR1C3, ALCAM, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, ARHGEF37, BCAM, C10orf11, C6orf15, CALB2, CCL28, CD274, CFH, CLIP4, CMPK2, COL13A1, COL9A2, CPAMD8, CSF2RA, CTSD, CXCL1, CXXC4, CYP2J2, DMBT1, DNER, DUSP10, EDN1, EPSTI1, FILIP1L, FOXA1, FOXQ1, GATSL3, HERC6, HOXA3, HOXB3, HOXB8, HRCT1, HSPA1A, IFI44, IFIT3, IGFBP6, IGFL1, IKZF2, IL15, IL7, INHBB, ITGB2, KIAA1244, KLF12, KRT86, KRTAP3-1, LAMP3, LGALS9, LGALS9C, LMO7, LOC100507165, LOC643072, MALT1, MAST4, MGP, MIA, MILR1, MX1, PCDH1, PMEPA1, PPAP2B, PTHLH, RAB27B, RPS6KA2, SAMD9L, SERPINA1, SGK1, SH3BP4, SH3TC2, SNAR-G1, SOAT2, SRPX2, STRA6, TMEM164, TMX4, WNT7A, WWC3, XDH, XLOC_I2_012847, ZNF365

減少していた遺伝子

AP3S1, ARMC4, C1orf61, CERS1, CGREF1, CHN2, DMRT1, EML1, ERVMER34-1, GART, GNAI1, GPR87, HBE1, KITLG, LINGO1, LTBP1, MEST, NKA1N1, OR51B5, PAM, PVT1, SAMD13, SNORD1A, SNORD1B, TAF4B, TERT, TPBG, WFDC2, XLOC_I2_015821

このうちで、エクソーム解析でもクローンに変異が見られる遺伝子は LMO7, LTBP1, WWC3。蛋白機能の薬剤耐性への関与が報告されている遺伝子は AKR1C1 と AKR1C3 であった。

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 6 件)

2015 年 11 月 20 日、消化器癌発生学会：MSI(+)大腸癌細胞におけるオキサリプラチン耐性メカニズムは腫瘍悪性を低下させる可能性がある。シンポジウム。山野智基、富田尚裕 他、「米子全日空ホテル(鳥取県・米子)」

2015 年 10 月 9 日、癌学会：Different mechanism of Oxaliplatin resistance in human colorectal cancer cell lines Yamano T, Tomita N et al. 英語口演。「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

2015 年 7 月 17 日、消化器外科学会：大腸癌細胞におけるオキサリプラチン耐性メカニズムは複数存在する。山野智基、富田尚裕 他、「アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)」

2015 年 4 月 22 日、米国癌学会(AACR2015)：Different mechanism of Oxaliplatin resistance in human colorectal cancer cell lines, Yamano T, Tomita N et al. 「フィラデルフィアコンベンションセンター、フィラデルフィア(米国)」

2014 年 10 月 25 日、日本消化器疾患週間(DDW)：大腸癌における抗がん剤治療の問題点、山野智基、富田尚裕 他、「神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)」

2014 年 7 月 17 日、消化器外科学会：大腸癌細胞における薬剤耐性の不均一性と均一性、山野智基、富田尚裕 他、「郡山市民文化センター(福島県・郡山市)」

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hosp.hyo-med.ac.jp/clinic/de>

partment/lg_surgery.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 尚裕 (TOMITA, Naohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00252643

(2)研究分担者

山野 智基 (YAMANO, Tomoki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00599318

(3)連携研究者

なし()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし()