The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	MicroRNA profiles involved in trifluridine resistance
Author(s)	常國, 健太
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67122
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　常國　健太

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	森　正樹
	副　査	大阪大学教授	野々村　祝夫
	副　査	大阪大学教授	奥村　明之進

論文審査の結果の要旨

Trifluridine(FTD)/tipiracilは、大腸癌において臨床での有効性が国際共同第Ⅲ相試験で検証されている。しかしその主成分であるFTDの明確な作用機序および耐性機序は、解明されていない。本研究では治療の上で重要な課題となる耐性機序の解明を目的として行われた。FTDの耐性株において発現減少を認めたことにより見出されたmiRNA let-7d-5pは、FTDの感受性を増強する作用を有しており、その発現を抑制することによりFTDへの感受性の減少を認めた。論文中でlet-7d-5pは5-FUよりもFTDに対しての作用が強く認められていることから、FTD耐性特異的に関与するmicroRNAを見出し、その耐性獲得機序の一部を明らかとするに至った。let-7d-5pは血中エクソソームからも検出可能なことから、大腸癌治療における効果予測バイオマーカーとしての応用に繋がり得る新たな知見と考えられる。以上のことから本論文を学位に値するものと認める。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	常國　健太
論文題名 Title	MicroRNA profiles involved in trifluridine resistance （trifluridineの耐性機序に関わるmicroRNAプロファイルの解析）

論文内容の要旨

〔目　的〕

Trifluridine(FTD)/tipiracilは「治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」の適応症で承認された新規メカニズムを持つ経口抗癌剤である。FTD/tipiracilは、これまでに5-FU低感受性株を含め幅広い癌細胞株に対して抗腫瘍効果を発揮することが基礎的に示されており、臨床での有効性もP-Ⅲ試験において検証されている。FTDはDNAの複製時にチミジンの代わりにDNA鎖に取り込まれ、DNAの機能障害を引き起こして抗腫瘍効果を発揮すると推測されており、その取り込み量はよく似た構造である5-FUと比較して20倍以上と報告されている。ただし明確な作用機序および耐性機序は解明されておらず、その耐性機序の解明は重要な課題である。本研究では抗腫瘍活性成分であるFTDの作用においてmiRNAが関与する未知の耐性機序を探索するため、大腸癌細胞株を用いてFTD耐性株を樹立し、耐性株と親株での発現プロファイルの変化を解析することにより、見出されたmicroRNAの機能を検討することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

*in vitro*ヒト大腸癌細胞株(DLD-1,HCT-116, RKO) を用いてFTDを低濃度から5ヶ月間徐々に濃度を上げて継続的に接触することにより耐性株を樹立し、親株と耐性株でのmiRNA発現およびmRNA発現の網羅的解析を実施した。樹立したバックグラウンドの異なる3種類のFTD耐性株はいずれもFTDに対してIC_{50}濃度比で22倍以上の耐性度を示した。一方で、5-FUに対して交叉耐性を示さなかった。FTDはDNAに直接作用する薬剤であることから、耐性化の過程においてゲノム自体に変化が生じたものと予想し、miRNAとmRNAが共通して変動するゲノム領域を探索した。結果、FTD耐性株において第9番染色体上にmiRNAとmRNAが共通して1/2以下に減少した因子が多く含まれるゲノム領域が存在し、その減少したmiRNA群の一つがlet-7d-5pであった。let-7はDNA複製に関与することが報告されているものの、RNA合成へ関与するとする報告は無い。5-FUはRNA合成を阻害する作用も有しており、DNAへの寄与が高いと予想されるFTDにおいてlet-7d-5pが抗腫瘍効果に特徴的に関与していると予想された。DLD-1においてlet-7d-5pのノックダウンを行ったところ、FTDに対する感受性が減少し(IC_{50}はコントロールで7.6 μM、 ノックダウンで16.8 μM)、過剰発現を行った結果ではFTDに対する感受性が増強した(IC_{50}はコントロールで13.9 μM、 過剰発現で 3.7 μM)。一方でlet-7d-5pのノックダウンおよび過剰発現において5-FUに対する感受性の変化はほとんど認められなかった。

let-7d-5pの標的遺伝子を探索するためにDLD-1の親株と耐性株のmRNAマイクロアレイデータを用いてGene set enrichment analysis(GSEA)を行ったところ、let-7d-5pの標的であるAurora Bを含むchromosomal passenger complex(CPC)の活性化に関与する遺伝子群と有意な相関を認めた。CPCは細胞周期の進行に伴い染色体分離反応およびその後の細胞質の分裂に関与する。マイクロアレイデータではDLD-1の耐性株において親株と比べAurora Bおよびその基質であるSurvivinおよびCPC複合体の構成因子であるINCENP、Borealinの上昇を認めた。CPCの活性に中心的役割を果たすAurora Bのlet-7d-5pを介するFTD感受性に及ぼす影響への関与が示唆されたため、DLD-1においてAurora Bのノックダウンを行った結果、FTDに対する感受性の増強が認められた(IC_{50}はコントロールで82.7 μM、 ノックダウンで15.7 μM)。一方でAurora Bのノックダウンによる5-FUに対する感受性の変化はほとんど認められなかった。

〔総　括〕

FTD耐性株から見いだされたlet-7d-5pはFTDに対する感受性を増強する作用を有しており、5-FUに対する感受性に及ぼす影響よりも顕著であることが示された。さらにその作用にはlet-7d-5pの標的であるAurora Bが関与している可能性が示唆された。本知見は、臨床におけるTrifluridine/tipiracilの効果予測因子探索に有用であることが示唆された。