

ヒト大腸がん細胞株 SW620 細胞における
オキサリプラチン抵抗性と浸潤能に関する研究

2016

薬剤学

田中 章太

目次

目次.....	i
略語表.....	iii
緒論.....	1
本論.....	11
第1章 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における上皮間葉転換の誘導と miR-200c 及び miR-141 の発現量の変化	
序論.....	11
第1節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の作製.....	13
第2節 SW620 細胞のオキサリプラチン抵抗性獲得に伴う 交叉耐性についての検討.....	19
第3節 SW620 細胞のオキサリプラチン抵抗性獲得による上皮間葉転換の 誘導及び miR-200 ファミリーの発現量の変化についての検討.....	25
小括.....	36
第2章 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における浸潤能と exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに及ぼすデシタビンの影響	
序論.....	37
第1節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の運動能及び浸潤能に及ぼす デシタビンの影響についての検討.....	39
第2節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の上皮間葉転換関連因子の 発現量に及ぼすデシタビンの影響についての検討.....	45

第3節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに及ぼすデシタビンの影響についての検討.....	52
小 括.....	58
第3章 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における浸潤能と 上皮間葉転換関連因子の発現量に及ぼす各種 DNA メチル基転移酵素阻害薬 の影響と exosome 中の let-7b の発現レベルに及ぼすゼブラリンの影響 序 論.....	59
第1節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の浸潤能と 上皮間葉転換関連因子の発現量に及ぼす 各種 DNA メチル基転移酵素阻害薬の影響についての比較検討	61
第2節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の細胞内及び exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルに及ぼすゼブラリンの影響 についての検討	67
小 括.....	73
総 括.....	74
謝 辞.....	76
参考文献.....	77

略語表

3'UTR	3'-untranslated region
5-FU	fluorouracil
ABC	ATP-binding cassette
AC	azacitidine
Ara-C	cytarabine
BCRP	breast cancer resistance protein
CD44s	standard CD44 isoform
CD44v9	CD44 variant 9 isoform
CDDP	cisplatin
CDH1	cadherin 1
CNT	concentrative nucleoside transporter
CPT-11	irinotecan
CRC	colorectal cancer
CTR1	copper transporter 1
DAC	decitabine
DACH	1,2-diaminocyclohexane
DCFH-DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DNMT	DNA methyltransferase
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ENT	equilibrative nucleoside transporter
ERCC1	excision repair cross complementing group 1
FBS	fetal bovine serum
HPF	high-power field
HSP70	heat shock protein 70
HRP	horseradish peroxidase
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
L-15	Leibovitz 15

L-OHP	oxaliplatin
MAGEA1	melanoma-associated antigen 1
MET	mesenchymal-epithelial transition
miRNA	microRNA
MRP2	multidrug resistance protein 2
MS-HRM	methylation-sensitive high resolution melting
NC	negative control
nSMase2	neutral sphingomyelinase 2
PVDF	polyvinylidene difluoride
ROS	reactive oxygen species
RPL27	ribosomal protein 27
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
S.E.M.	standard error of the mean
SN-38	7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin
snRNA	small nuclear RNA
SW620/OxR	oxaliplatin-resistant SW620
TGF- β	transforming growth factor- β
uPA	urokinase plasminogen activator
xCT	cystine/glutamate transporter
Zeb	zebularine
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1

緒論

悪性新生物は2014年の日本における死因別順位において第1位であり、全体の約30%を占めた¹⁾。その中でも、大腸がんによる死亡数は年々増加しており、2014年の悪性新生物による死亡数において女性では第1位を示し、男性では肺がん、胃がんに次いで第3位であった (Fig. 1)²⁾。特に、肝臓や肺などへ遠隔転移を認めるステージIVの大腸がん患者の5年生存率は未だ20%以下と著しく低く、有効な治療法が乏しい現状にある (Table 1)³⁾。したがって、大腸がんの治療成績を向上させることが望まれている。

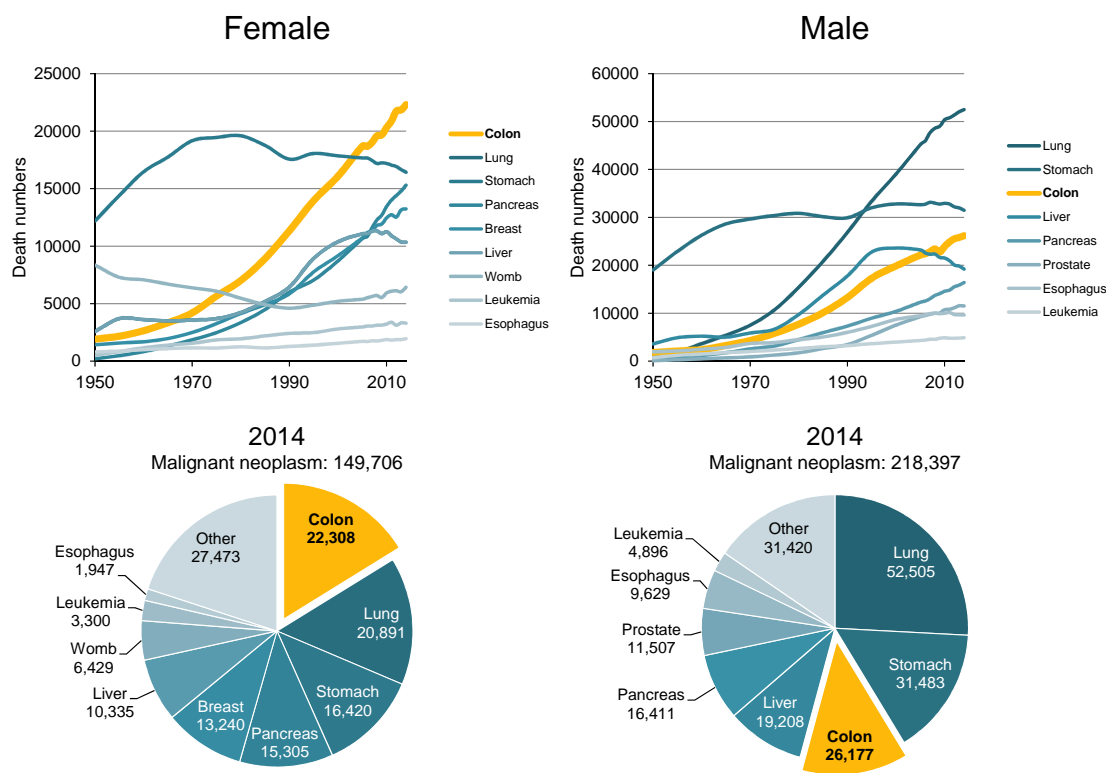


Fig. 1. Changes in Death Numbers by Cancers in Japan, 1950-2014²⁾

Table 1. Five-Year Relative Survival Rate of Patients with Colorectal Cancer (CRC) in Japan³⁾

Five-Year Relative Survival Rate	
Stage I	0.984
Stage II	0.905
Stage III	0.791
Stage IV	0.178

現在、大腸がんに対し、適応が認められている抗悪性腫瘍薬として、オキサリプラチン (L-OHP)、イリノテカン (CPT-11)、フルオロウラシル (5-FU) や 5-FU のプロドラッグであるカペシタビンなどがある (Fig. 2)。再発予防を目的とする術後補助化学療法や、切除不能な大腸がんに対する全身化学療法において、これらの抗悪性腫瘍薬は組み合わせて用いられる⁴⁾。また、大腸がんは肝臓や肺に転移し易く、その後全身に転移すると考えられている。そのため、遠隔転移を認める切除不能な大腸がん患者に対して、がん細胞の増殖速度の遅延や全身への転移の抑制を目的に化学療法が行われる⁵⁾。ステージ I から III の大腸がん患者の約 7% で肝臓に、約 5% で肺に再発転移を認めるため、再発はもちろん遠隔転移を補助化学療法により予防することも重要である⁴⁾。切除不能な進行性大腸がん患者の生存期間中央値は約 8 ヶ月であるが、L-OHP などを用いた多剤併用療法により、2 年以上に延長されることが 2011 年に報告された⁶⁾。しかし、切除不能な進行性大腸がん患者において、化学療法による完治は望めないことが現状であり、化学療法の目的はがん組織の増殖速度の遅延による延命や症状のコントロールを行うことに留まっている。そのため、大腸がんの転移能を抑制する全身化学療法や補助化学療法を開発することは治療成績向上のための重要な課題である。

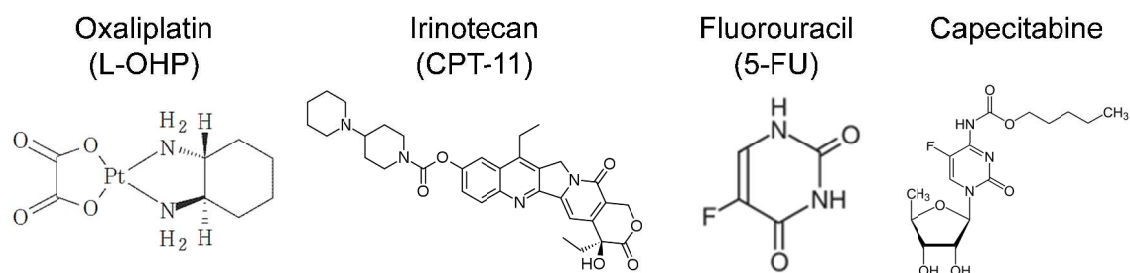
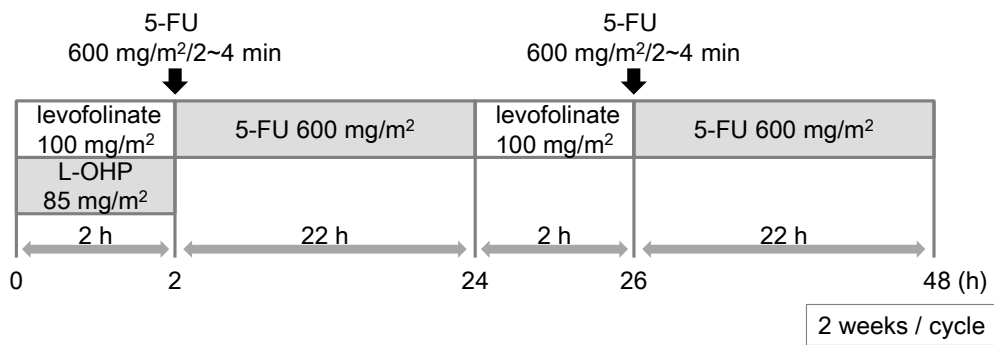


Fig. 2. Structure of Anti-cancer Drugs for CRC Patients

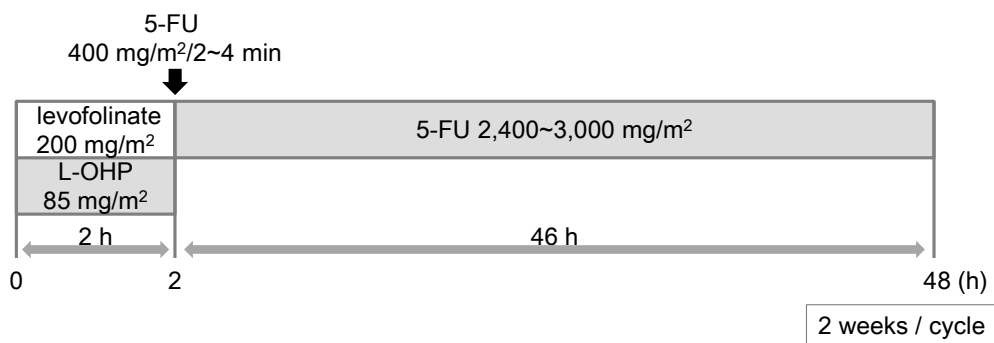
L-OHP は大腸がん治療の中心的薬物の一つである。L-OHP は生体内でジクロロ 1,2-ジアミノシクロヘキサン (DACH) 白金、モノアクオモノクロロ DACH 白金やジアクオ DACH 白金に変換され、がん細胞の DNA と共有結合し、白金-DNA 架橋を形成する。これらの架橋が DNA の複製及び転写を阻害することにより、殺細胞効果を示す⁷⁾。L-OHP を用いる大腸がん化学療法として、レボホリナート及び 5-FU と併用され、1 サイクルを 2 週間間隔で繰り返し実施される FOLFOX4 療法及び mFOLFOX6 療法などの FOLFOX 療法が、一次または二次療法として切除不能な進行性大腸がん患者に用いられ

る (Fig. 3, 4)^{4,7)}。また、カペシタビンと併用され、1 サイクルを 3 週間間隔で繰り返し実施される XELOX 療法 (CapeOX 療法) が、FOLFOX 療法と同様に用いられる。FOLFOX 療法や XELOX 療法が術後の補助化学療法として、外科的切除後の患者にも用いられている。術後補助化学療法としては FOLFOX 療法が 12 サイクル、XELOX 療法が 8 サイクル繰り返し実施される。ステージⅢの大腸がん患者に対する術後補助化学療法として用いることで、再発が抑制されることや、生存期間が延長することが示された⁴⁾。しかし、サイクルが進行することで L-OHP の投与回数が増加する。その結果、残存する大腸がん細胞が L-OHP に対して抵抗性を獲得することが知られており、抵抗性克服が大きな問題の一つとなっている。大腸がん細胞が L-OHP 抵抗性を獲得する一因として、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターがある。ABC トランスポーターは細胞外に薬物を排出することにより、抗悪性腫瘍薬の細胞内取り込みを抑制する。L-OHP 抵抗性を獲得した大腸がん細胞では、ABC トランスポーターである multidrug resistance protein 2 (MRP2) の発現が増加することが報告された⁸⁾。さらに、大腸がん細胞において、ABC トランスポーターの breast cancer resistance protein (BCRP) を過剰発現させることで L-OHP の感受性が低下することが示された⁹⁾。また、ABC トランスポーター以外にも、銅流入トランスポーターである copper transporter 1 (CTR1)、CTR2 及び銅流出トランスポーター ATP7A、ATP7B などの銅トランスポーターは、L-OHP などの白金錯体を細胞内に流入させることや細胞外に流出させることで、白金錯体の感受性に影響を与えることが認められた^{10,11)}。しかし、Mirakhorli らは、MRP2 の発現量と FOLFOX4 療法の治療成績に相関性がないことを報告した¹²⁾。L-OHP 抵抗性の要因として、トランスポーター以外にも様々な報告がなされている。例えば、アポトーシス促進因子である caspase 3 や Bax は、L-OHP の感受性と関連することが報告された¹³⁾。また、Seetharam らの報告において、遺伝子修復を行う excision repair cross complementing group 1 (ERCC1) は、L-OHP の感受性にも影響を及ぼすことが示唆された¹⁴⁾。しかし、L-OHP に対する抵抗性を獲得した大腸がんに対する治療法は確立されていない。そのため、L-OHP に対して抵抗性を克服する治療法を開発することは大腸がんの治療において重要な課題である。

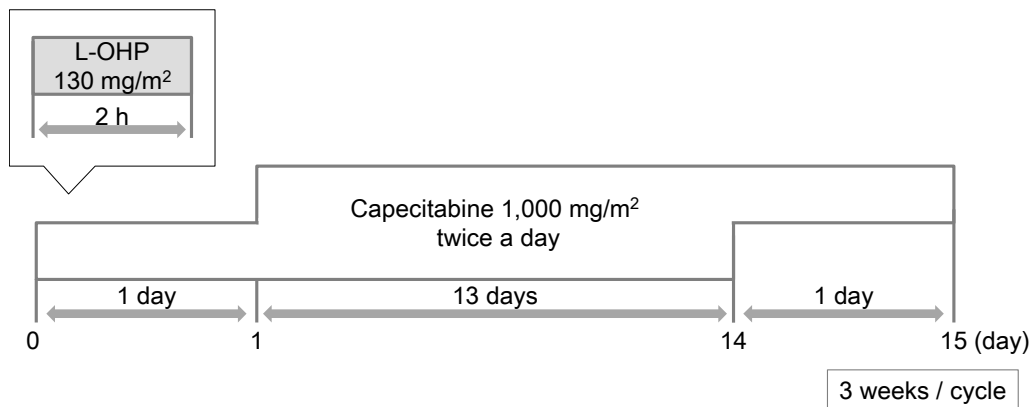
FOLFOX4 regimen

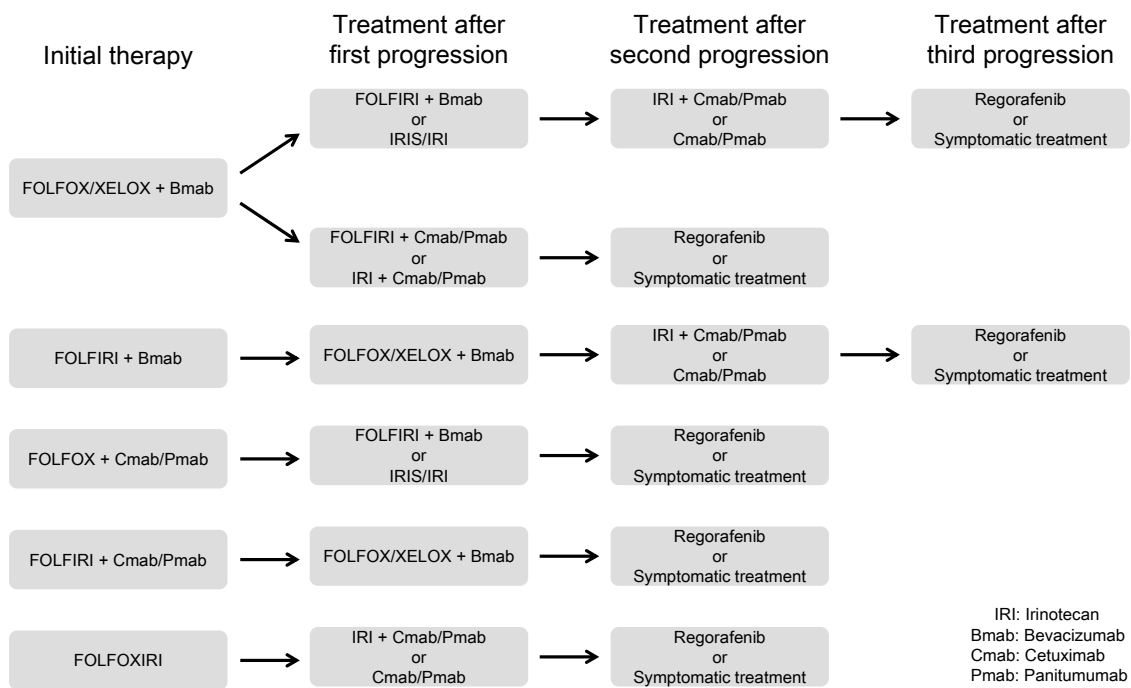


mFOLFOX6 regimen



XELOX regimen

Fig. 3. Regimen of FOLFOX and XELOX⁷⁾



FOLFIRI: 5-FU + LV + IRI
 FOLFOXIRI: 5-FU+LV+L-OHP+IRI
 IRIS: IRI +S-1

Fig. 4. Algorithm of Systemic Chemotherapy for CRC Patients with Distant Metastasis⁴⁾

抗悪性腫瘍薬に対する抵抗性の獲得と同様に、がん細胞の遠隔転移も重要な問題となっている。大腸がん細胞は高い細胞接着性と厳格な細胞極性を持つ上皮細胞の状態である。転移過程において大腸がん細胞では細胞運動能の亢進した間葉系細胞の状態へと変化する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が誘導される。そして、転移した部位で間葉系細胞が運動能を失い、細胞極性を強めて上皮細胞の形質を獲得する間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: MET) が起こると考えられている。つまり、Fig. 5 に示すように、まず大腸がん細胞は EMT により大腸上皮の基底膜を破壊して、間質へと浸潤する。次に血管内に侵入し、血流により移動して、肝臓など他の臓器組織内へ遊走する。そして、血管外へ遊走した大腸がん細胞は MET を経て、肝臓などで微小転移と呼ばれる少量の細胞の塊で存在し、その後、増殖を開始して転移巣を形成する。

EMT の過程において上皮細胞に特異的に発現している接着因子である E-cadherin の発現低下と並行して、間葉系細胞に特異的に発現する vimentin の発現増加や形態の変化が誘導され、高い運動能及び浸潤能を獲得する。EMT は zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) や Snail などのいくつかの制御因子により制御される。ZEB1 や Snail などの制御因子は、E-cadherin をコードする *cadherin 1 (CDH1)* 遺伝子のプロモーター領域に存在する E-box 配列に結合することで、*CDH1* の mRNA 発現を抑制する^{15,16)}。その結果、がん細胞は細胞間接着能が低下し、高い運動能を獲得する。ZEB1 や Snail などは様々なシグナル伝達を通じて増加する^{15,16)}。例えば、transforming growth factor- β (TGF- β) や tumor necrosis factor- α 等による刺激が知られている。このように、EMT を介した転移には細胞外の環境や刺激が関与する。さらに、L-OHP などの抗悪性腫瘍薬に対する抵抗性を獲得したがん細胞は間葉系細胞の特性を示すことも報告されている^{17,18)}。

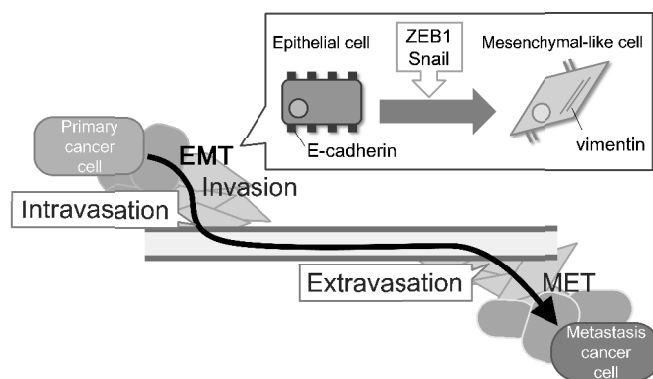


Fig. 5. Processes of Cancer Metastasis

がんの遠隔転移を制御する機構として、mRNA の生成を抑制する microRNA (miRNA) の重要性が認められている。miRNA はタンパク質をコードしていない 20 から 25 塩基程度の一本鎖 RNA である。miRNA の 5' 末端側の 2 塩基目から 8 塩基目までの配列は seed 領域と呼ばれ、mRNA 配列の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) と seed 領域が相補的に結合することで、mRNA の分解、またはタンパク質への翻訳抑制が誘導される (Fig. 6A)。上皮細胞の特性を示す多くのがん細胞においては、miRNA-200 (miR-200) ファミリー (miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141、miR-429) が特異的に発現する¹⁹⁾。また、miR-200 ファミリーは miR-200b/200a/429 と miR-200c/141 の 2 つのクラスターを形成し、それぞれ 1 つの RNA として転写後、切断され、各 miRNA となる。miR-200 ファミリーや miR-205 は、EMT の誘導因子である ZEB1 mRNA の 3' UTR と相補的に結合し、ZEB1 の発現低下を介し、EMT を抑制することが報告されている (Fig. 6B)¹⁹⁻²¹⁾。また、近年 miR-200 ファミリーのプロモーター領域が CDH1 のプロモーター領域と同様に、E-box 配列を持つため、その発現が ZEB1 により抑制されることが明らかになった (Fig. 6B)²²⁾。

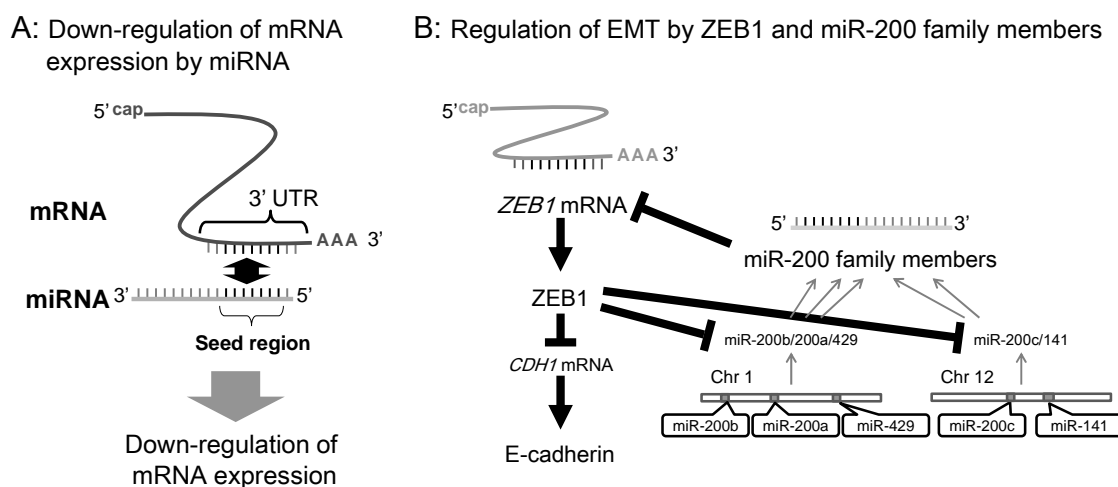


Fig. 6. Regulation of EMT by ZEB1 and miR-200 Family Members

miR-200 ファミリー以外にも、転移を抑制する miRNA として let-7 ファミリーがある。let-7 ファミリーは let-7a、let-7b、let-7c、let-7d、let-7e、let-7f、let-7g 及び let-7i などから構成される。let-7 ファミリーはがん抑制関連 miRNA として、転移や細胞増殖、アポトーシスなどに関与する多くの遺伝子の発現に影響を及ぼす²³⁻²⁸⁾。転移を認めた大腸がん患者で let-7c の発現量が有意に低下し、転移能に関連していることが示唆された²⁷⁾。

さらに、let-7g の発現低下により、肝がん細胞において Snail のタンパク質発現量が増加し、EMT が誘導されることが報告された²⁸⁾。

浸潤能などのがん細胞の特性を示す指標として、exosome の内容物が有用であると期待されている。exosome は粒子径が約 100 nm ほどの小さな膜小胞で、血液などの体液中に存在し、タンパク質や RNA を含有する。これらの含有物は exosome 膜により体液中の分解酵素から保護され、安定した状態で存在する。また、その発現レベルは放出した細胞の特性や生理条件を反映することが明らかになっている。exosome 中の miRNA などの血液中に存在する miRNA ががん患者の診断や治療のためのバイオマーカーとして有用である可能性が示されている。例えば、大腸がん患者の血液中に存在する exosome において、非大腸がん患者に比べ、let-7a や miR-21 などの発現量が高いことが報告された²⁹⁾。浸潤能の相違するがん細胞間では、それらの細胞から放出された exosome の miRNA 発現レベルも相違することが知られている。例えば、高浸潤性卵巣がん細胞において let-7 ファミリーが exosome に選択的に移行するため、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルが低浸潤性卵巣がん細胞と比べ、高いことが報告された³⁰⁾。一方、高浸潤性卵巣がん細胞において miR-200 ファミリーの exosome 中の発現レベルは、細胞内の miR-200 ファミリーと同様に低いことが報告されている³⁰⁾。

がん転移には、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構であるエピジェネティック修飾として知られている DNA のメチル化も関与することが明らかになっている。DNA のプロモーター領域に存在するグアニンとシトシンの繰り返し配列である CpG アイランドのシトシンがメチル化することで、RNA への転写が抑制される。近年の研究により、一部のがん転移に関連する mRNA や miRNA の発現が DNA のメチル化により制御されることが示された。例えば、各種がん細胞の EMT 及び MET が miR-200b/200a/429 や miR-200c/141 をコードしている DNA のメチル化により制御されることが報告された^{31,32)}。DNA のメチル化は DNA メチル化酵素ファミリーに分類される DNA メチル基転移酵素 (DNMT) により制御される。DNMT には DNA の複製の際に DNA のメチル化状態を保持する役割を担う DNMT1 や、新たなメチル基を導入する DNMT3 などが存在することが知られており、様々な遺伝子の発現制御に関わっている (Fig. 7A)。DNMT を阻害する薬として、2'-デオキシシチジン類似体であるデシタビン (DAC)、シチジン類似体であるアザシチジン (AC) やゼブラリン (Zeb) などがある (Fig. 8)。これらの DNMT 阻害薬はシチジンや 2'-デオキシシチジンと同様に、

concentrative nucleoside transporters や equilibrative nucleoside transporters などの核酸トランスポーターにより細胞内に流入し³³⁾、その後、DAC は代謝されて DNA に、AC 及び Zeb は代謝されて DNA もしくは RNA に組み込まれる (Fig. 7B)。DNA に組み込まれた DNMT 阻害薬は、主に DNMT1 と強固に結合し、その活性を抑制する。そのため、DNA のメチル化状態が保持されず、本来抑制されている遺伝子の発現が誘導され、様々な細胞の性質を変化させる。さらに、がん抑制遺伝子などにも作用すると考えられており、DNMT 阻害薬などのエピジェネティック修飾に影響を与える薬は新たな作用機序の抗悪性腫瘍薬として期待され、開発が進められている。また、DNMT 阻害薬により、がん転移や EMT が抑制されることも報告された³⁴⁻⁴¹⁾。ただし、がん細胞や DNMT 阻害薬の種類により影響を及ぼす遺伝子が異なることも認められている^{36,37,42,43)}。しかし、L-OHP に対する抵抗性を獲得したヒト大腸がん細胞における DNMT 阻害薬の浸潤能などへの影響についての報告は乏しい。

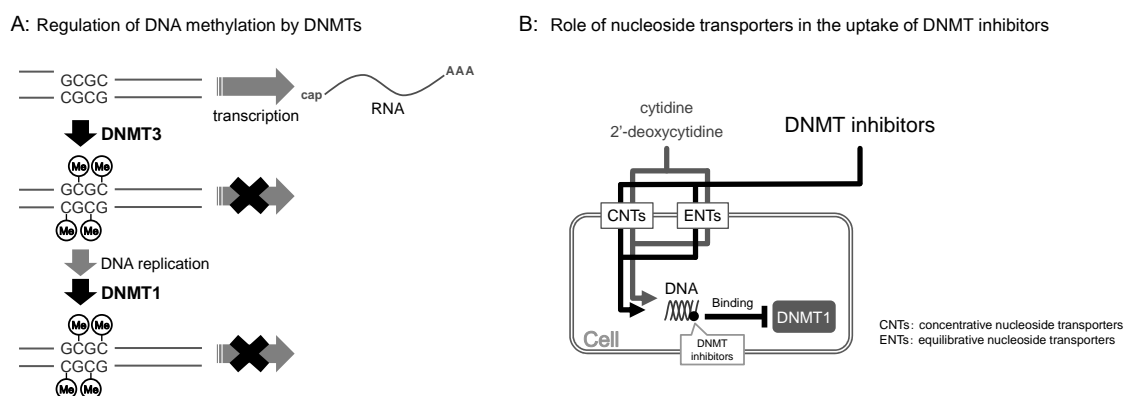


Fig. 7. Regulation of DNA Methylation by DNMTs

(A) DNA methylation is caused by DNMTs and inhibits RNA transcription. (B) DNMT inhibitors are taken up by nucleoside transporters and are incorporated into DNA.

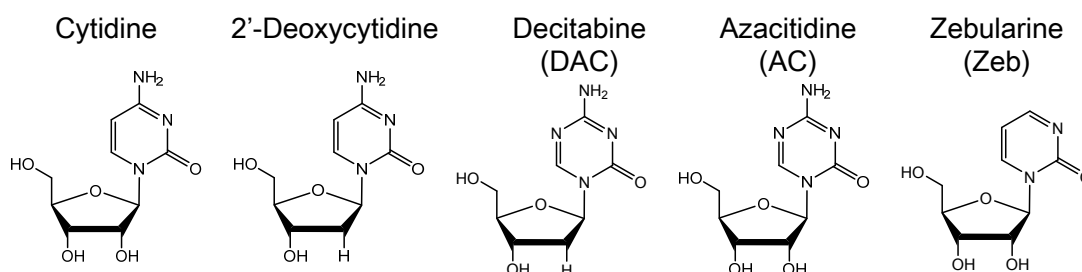


Fig. 8. Structure of Cytidine, 2'-Deoxycytidine and DNMT Inhibitors

L-OHP は全身化学療法や術後補助化学療法に用いられる大腸がん治療の中心的薬物の一つである。しかし、L-OHP に対する抵抗性を獲得した大腸がん細胞に対する治療法は確立されていない。さらに、L-OHP はその長期処置により L-OHP 抵抗性を獲得するだけでなく、EMT の誘導により転移能が亢進することが明らかになっている¹⁷⁾。そのため、大腸がんの転移能を抑制するがん化学療法を開発することは重要な課題である。EMT を抑制する一部の miRNA の発現などは DNA のメチル化の影響を受けるため、DNMT 阻害薬は転移能獲得を抑制することも考えられる³⁵⁻⁴²⁾。しかし、DNMT 阻害薬の影響は細胞の特性により異なるにもかかわらず、L-OHP 抵抗性を獲得し転移能が亢進したヒト大腸がん細胞における DNMT 阻害薬の影響についての報告は乏しい。

ヒト大腸がん細胞株を用いた各種薬物の殺細胞効果や転移能への影響についての検討が行われており、同一患者から単離されたヒト大腸がん細胞株で、低浸潤性を示す原発巣由来の SW480 細胞と、高浸潤性を示すリンパ節転移巣由来の SW620 細胞を用いた比較検討も進められている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。そこで、著者は SW480 細胞及び SW620 細胞を用いて L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞の作製を試み、浸潤能に及ぼす DNMT 阻害薬の影響について比較検討を行った。次に、exosome 中の miR-200 ファミリーや let-7 ファミリーの発現レベルとがん細胞の浸潤能との関係や、DNMT 阻害薬による exosome 中の miR-200 ファミリーや let-7 ファミリーの発現レベルの変動についても検討を行った。

すなわち、第 1 章では、L-OHP 抵抗性を示す SW620 細胞を作製し、その細胞の EMT 関連因子や miRNA の発現量について検討した。第 2 章では SW620/OxR 細胞、SW480 細胞及び SW620 細胞を用いて、浸潤能や exosome 中の miR-200 ファミリーの発現レベルに及ぼす DAC の影響について検討した。第 3 章においては、これら 3 細胞を用いて、浸潤能に及ぼす各種 DNMT 阻害薬の影響について比較した。そして、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルに及ぼす Zeb の影響について検討した。

本 論

第 1 章 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における

上皮間葉転換の誘導と miR-200c 及び miR-141 の発現量の変化

序 論

上皮性がん細胞では EMT の過程で、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現が抑制され、細胞間接着能を失い、並行して vimentin などの間葉系細胞マーカーの発現が上昇する。また、miR-200 ファミリーは上皮細胞に選択的に発現し、EMT を制御している¹⁹⁻²¹⁾。その他にも Mashita らは、*standard CD44 isoform (CD44s)* と *variant 9 isoform (CD44v9)* の mRNA 発現量比 (CD44s/CD44v9 ratio) が上皮細胞と比較して間葉系細胞で高いことや、CD44 の抑制により運動能及び浸潤能が抑制されることを報告した⁴⁷⁾。また、活性酸素 (ROS) が EMT を誘導しており、CD44 の影響を受けるトランスポーターである cystine/glutamate transporter (xCT) により、細胞内 ROS 量が制御されている⁴⁸⁾。

EMT と抗悪性腫瘍薬に対する感受性との関連性は数多く報告されている。例えば、薬物を細胞外に排出する ABC トランスポーターの遺伝子には、プロモーター領域に EMT 誘導因子が結合する E-box 配列が存在する塩基配列がある。そのため、TGF- β を処置し EMT を誘導することで ABC トランスポーターの発現が増加する⁴⁹⁾。また、膵臓がん細胞において EMT の誘導因子である ZEB1 の発現上昇はシスプラチン (CDDP) や 5-FU などに対する感受性を低下させることが Arumugam らにより報告された⁵⁰⁾。一方、Snail の過剰発現によりがん細胞のがん幹細胞化が促進され、抗悪性腫瘍薬に対する感受性が低下することも認められている⁵¹⁾。さらに、抗悪性腫瘍薬に対する感受性への miRNA の関与については、EMT を抑制する miR-200c が乳がんにおける多剤耐性化の一因となる P-糖タンパク質の発現を抑制することも最近明らかにされた⁵²⁾。

抗悪性腫瘍薬に対する抵抗性を獲得したがん細胞は、間葉系細胞の特性を示すことが知られている。Yang らは L-OHP に対する耐性を獲得したヒト大腸がん細胞株 KM12L4 細胞及び HT29 細胞において、E-cadherin の発現低下及び Snail や vimentin の発現上昇といった EMT の特徴を報告した¹⁷⁾。しかし、ヒト大腸がん細胞が L-OHP 抵抗性を獲得する過程での EMT の誘導において、miR-200 ファミリーの関与は明らかになっていな

い。一方、ヒト前立腺がん細胞株 PC3 細胞及び DU-145 細胞において、ドセタキセルに対する抵抗性獲得の過程で EMT が誘導され、両細胞で ZEB1 の発現上昇だけでなく、miR-200c 及び miR-205 の発現の低下を認めたとの報告もある¹⁸⁾。そのため、ヒト大腸がん細胞株では、L-OHP に対する抵抗性を獲得する過程において、EMT の誘導に参与する miRNA の発現量が変化することで、EMT が誘導されている可能性が考えられた。そして、miRNA の内、EMT を抑制する miR-200 ファミリーなどが、L-OHP 抵抗性獲得による EMT 誘導を抑制するための新たな治療標的となる可能性が期待される。

ヒト大腸がん細胞株である SW480 細胞及び SW620 細胞は、同一の白人男性の結腸がん原発巣 (50 歳時) 及びリンパ節転移巣 (51 歳時) からそれぞれ株化されたことが 1976 年に報告された上皮性がん細胞である⁵³⁾。SW480 細胞と比較して、SW620 細胞はより転移能の高い間葉系細胞の特性を示すため、しばしば転移に関する研究に用いられている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。

そこで、著者は本章において、SW480 細胞及び SW620 細胞を用いて L-OHP の長期処置を行い、L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞の作製を試みた (第 1 節)。そして、作製した L-OHP 抵抗性 SW620 細胞を用い、CDDP や大腸がんの治療に用いられる抗悪性腫瘍薬に対する交叉耐性の有無について検討した (第 2 節)。さらに、EMT 関連因子の発現量、運動能、浸潤能及び EMT の誘導を抑制する miR-200 ファミリーの発現量の変化について検討を行った (第 3 節)。

第 1 節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の作製

日本では現在、L-OHP を使用するがん化学療法である FOLFOX 療法や XELOX 療法は再発予防を目的とする補助化学療法や切除不能な大腸がんに対する全身化学療法として治療に用いられる⁴⁷⁾。しかし、L-OHP の長期処置により、大腸がんが L-OHP 抵抗性を獲得することがある。L-OHP 抵抗性を獲得した大腸がん細胞に対する治療法を開発することは大腸がんの治療において重要な課題である。そのためには、L-OHP 抵抗性大腸がん細胞の特性について検討する必要がある。

本節では L-OHP に対する抵抗性を獲得した細胞の特性について検討するために、SW480 細胞及び SW620 細胞に L-OHP の長期処置を行い、L-OHP に対する抵抗性を獲得した細胞の作製を試みた。

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

ヒト大腸がん細胞株 SW480 細胞及び SW620 細胞は、各々 American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA) 及び DS Pharmabiomedical (Osaka, Japan) より購入した。Leibovitz 15 (L-15) 培地は Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA, USA) より購入した。L-OHP は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。Penicillin 及び streptomycin は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。

1-2 細胞培養及び L-OHP 抵抗性細胞の作製

SW480 細胞及び SW620 細胞は 10% FBS、100 U/mL penicillin 及び 100 µg/mL streptomycin を加えた L-15 培地において 37°C で培養した。SW480 細胞または SW620 細胞を 1.0×10^3 cells/60-mm dish で播種し、5 µM L-OHP を含む培地で 2 週間培養した⁵⁴⁾。2 週間後、生存細胞を回収し、 4.0×10^5 cells/60-mm dish で播種し、継代培養を繰り返した。SW620 細胞に暴露させる L-OHP の濃度は 5 µM、20 µM、40 µM、80 µM と段階的に上昇させた (Fig. 9)。また、SW480 細胞に暴露させる L-OHP の濃度は 5 µM、10 µM、20 µM、40 µM と段階的に上昇させた (Fig. 9)。本研究において、L-OHP 抵抗性の獲得を L-OHP に対する IC₅₀ 値が 10 倍以上に上昇することに設定した。

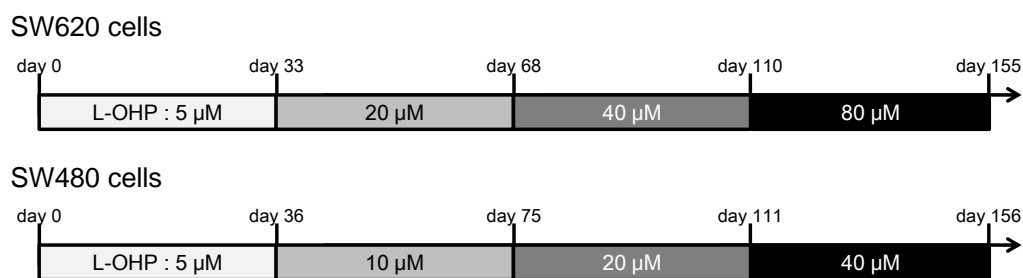


Fig. 9. Schedule of Long-term Treatments with L-OHP

1-3 殺細胞作用

細胞に対する抗悪性腫瘍薬の殺細胞作用は WST-8 アッセイにより測定した。細胞を 3.0×10^3 cells/well で 96-well プレートに播種し、24 時間後、抗悪性腫瘍薬を培地で希釈し、各 well に添加後、37°C で 72 時間培養した。72 時間後、各 well の培地を除き、抗悪性腫瘍薬を含まない 100 μL 培地及び 10 μL WST-8 reagent solution を加え、1-4 時間後に Model 550 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により測定波長 450 nm、参照波長 655 nm で吸光度を測定した。各細胞における抗悪性腫瘍薬の IC_{50} 値 (細胞増殖を 50% 阻害する薬物濃度) は、以下の式を用いて算出した⁵⁵⁾。

$$E = E_{\max} \times C^{\gamma} / (C^{\gamma} + IC_{50}^{\gamma})$$

E: surviving fraction (% of control)

E_{\max} : surviving fraction maximum

C: drug concentration in the medium

IC_{50} : 50% inhibitory concentration

γ : sigmoid factor

第 2 項 結果

SW480 細胞及び SW620 細胞に対し、L-OHP を 4 ヶ月以上処置した。Fig. 10 及び Table 2 に示すように、L-OHP の長期処置により SW620 細胞の L-OHP に対する抵抗性は徐々に増大し、L-OHP の 155 日間処置により L-OHP の IC₅₀ 値は約 16 倍に上昇した。一方、SW480 細胞に対し、L-OHP の長期処置を行っても L-OHP に対する抵抗性の顕著な増大は観察されなかった (Table 3)。

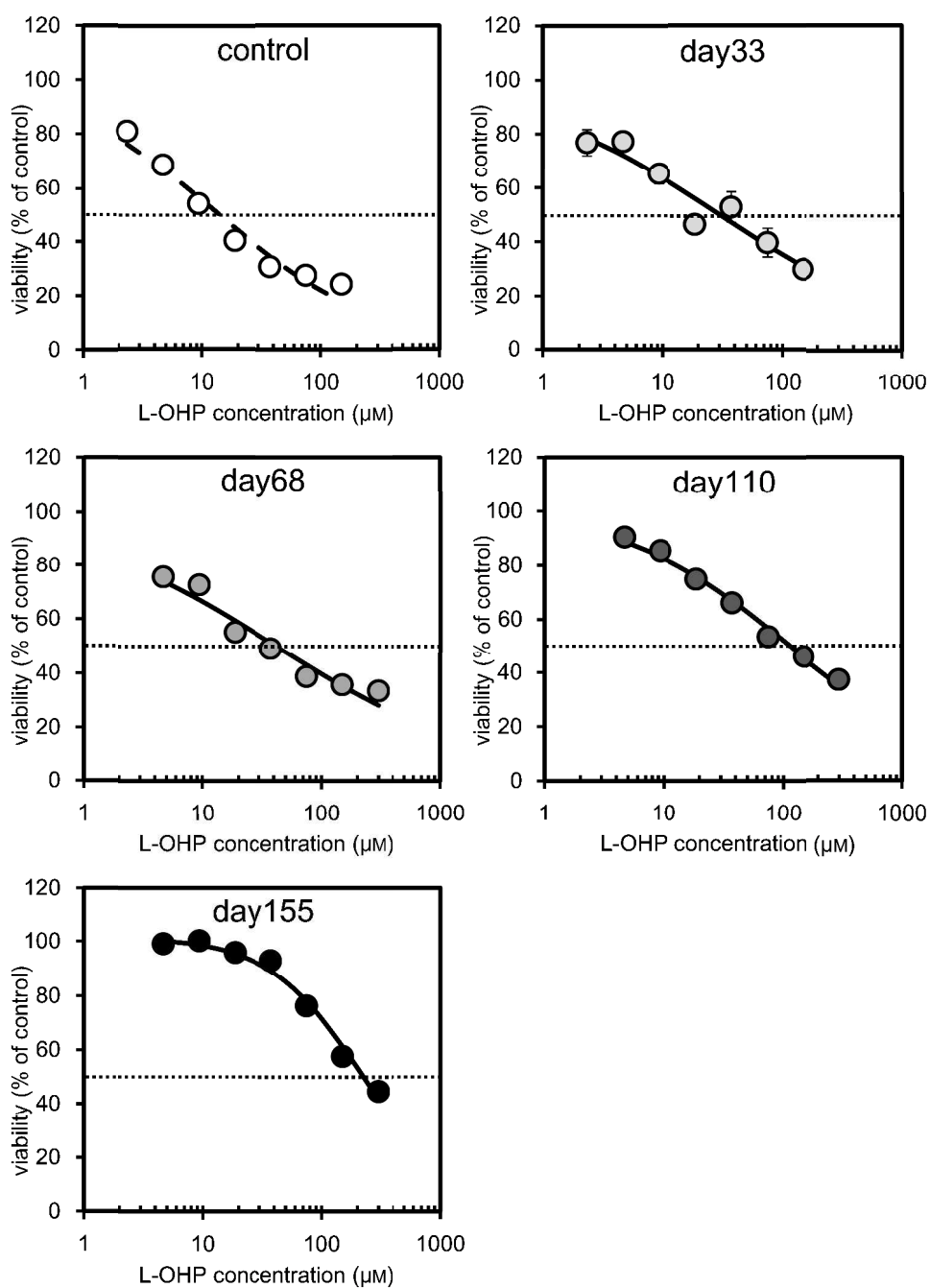


Fig. 10. Comparison of the Sensitivity of L-OHP-treated SW620 Cells to L-OHP

Control SW620 cells and SW620 cells treated with L-OHP for 33, 68, 110, and 155 days were incubated with various concentrations of L-OHP for 72 h in a 96-well plate. Cell viability was measured by the WST-8 assay. Each value represents the mean \pm S.E.M. of four experiments.

Table 2. IC₅₀ Values of L-OHP in SW620 Cells Treated with L-OHP

L-OHP treatment	IC ₅₀ (μM)	Relative resistance
control	13.4	1.0
Day 33	30.2	2.2
Day 68	40.2	3.0
Day 110	110.0	8.2
Day 155	215.6	16.1

Relative resistance was calculated by dividing each IC₅₀ value in SW620 cells treated with L-OHP by that in control SW620 cells.

Table 3. IC₅₀ Values of L-OHP in SW480 Cells Treated with L-OHP

L-OHP treatment	IC ₅₀ (μM)	Relative resistance
control	39.3	1.0
Day 33	70.2	1.8
Day 75	66.9	1.7
Day 111	72.9	1.9
Day 156	No growth*	-

Relative resistance was calculated by dividing each IC₅₀ value in SW480 cells treated with L-OHP by that in control SW480 cells. *: Concentration of L-OHP; 40 μM.

第 3 項 考 察

L-OHP の 155 日間処置により、L-OHP の IC_{50} 値が約 16 倍以上に上昇した SW620 細胞が得られ、この細胞を L-OHP 抵抗性 SW620 細胞 (SW620/OxR 細胞) として以下の検討に用いた。

L-OHP 抵抗性 SW480 細胞を得られなかったことから、原発巣由来の SW480 細胞と比較して、リンパ節転移巣由来の SW620 細胞において⁵³⁾、L-OHP の耐性化が誘導されやすいことが示唆された。

第 2 節 SW620 細胞のオキサリプラチン抵抗性獲得に伴う交叉耐性についての検討

銅流入トランスポーターである CTR1、CTR2 及び銅流出トランスポーター ATP7A、ATP7B などの銅トランスポーターは L-OHP や CDDP などの白金錯体の細胞内外への流入や流出に関与し、白金錯体の感受性に影響を与えることが知られている^{10,11)}。また、抗悪性腫瘍薬に対する抵抗性を獲得した細胞において、しばしば、細胞増殖速度の遅延や交叉耐性を認めることがある。そこで、SW620/OxR 細胞及び control SW620 細胞における銅トランスポーターの mRNA 発現量、細胞増殖速度及び CDDP や大腸がん患者の治療に用いられる抗悪性腫瘍薬の感受性について比較した。

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

CDDP は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) より購入した。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) で用いたプライマーは Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。5-FU は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。CPT-11、SN-38 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。

1-2 細胞培養

本章第 1 節で作製した SW620/OxR 細胞及び control SW620 細胞を用い、10% FBS、100 U/mL penicillin 及び 100 µg/mL streptomycin を加えた L-15 培地において、37°C で培養した。SW620/OxR 細胞は 80 µM L-OHP を含む培地で培養し、検討に用いる前に L-OHP を含まない培地で一度継代培養した。

1-3 RT-PCR による mRNA 発現量の定量

Total RNA を RNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用い、細胞から抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) により total RNA を cDNA に逆転写し、MiniOpticon System (BioRad, Tokyo, Japan) により SYBR Green を用いた Real-time PCR を以下の条件で行った。初めに 95°C、30 秒で熱変性させた後、95°C 5 秒 (denaturation)、55°C 10 秒 (annealing)、72°C 20 秒 (extension) を 40

サイクル行った。サイクル後、融解曲線分析により、産生物が単一であるか検討した。各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である *ribosomal protein 27 (RPL27)* により標準化し⁵⁶⁾、相対発現量として、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ で表した。本検討に用いたプライマーの配列を Table 4 に示す。

Table 4. Real-time RT-PCR Primers for mRNA Expression

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>RPL27</i>	ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA	TCTGAAGACATCCTTATTGACG
<i>CTR1</i>	ACCATCACCCAACCACTTCAGCC	ACACTGCCACAAAAGCTCCAGCC
<i>CTR2</i>	TGGCAAAGCCAAGCTGCTCAAC	AGCCGATGACCACCTGGATGAC
<i>ATP7A</i>	TGGCTGGCAAGGCAGAAGTAAGG	ACGCAGGAGGCACACGTCATTC
<i>ATP7B</i>	TTGGAAACCGTGAGTGGCTGAGG	AGCGTCTGCGATTGCGATCATCC

1-4 殺細胞作用

本章第 1 節第 1 項 1-3 と同様に殺細胞作用を評価した。

1-5 細胞増殖

細胞を 5.0×10^3 cells/well で 96-well プレートに播種し、24、48 または 72 時間培養した。培養後、各 well の培地を除き、新しい 100 μ L 培地及び 10 μ L WST-8 reagent solution を加え、1 時間後に Model 550 Microplate Reader により、測定波長 450 nm、参照波長 655 nm で吸光度を測定した。

1-6 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で表し、2 群間の比較検討には Unpaired Student's *t*-test を用いた。

第 2 項 結果

SW620/OxR 細胞及び control SW620 細胞における銅流入トランスポーターである *CTR1*、*CTR2* 及び銅流出トランスポーター *ATP7A*、*ATP7B* の mRNA 発現量について比較した。その結果、SW620/OxR 細胞において、control SW620 細胞と比較して、*CTR1*、*CTR2* 及び *ATP7A* の mRNA 発現量が有意に低下していた (Fig. 11)。

CDDP の IC_{50} 値は、SW620/OxR 細胞と control SW620 細胞との間で有意な差を認めなかった (Table 5)。さらに、大腸がんの化学療法に用いられる 5-FU、CPT-11、及び CPT-11 の活性代謝物である SN-38 に対する SW620/OxR 細胞の感受性について検討した。その結果、SW620/OxR 細胞において、control SW620 細胞と比較して、5-FU の IC_{50} 値はわずかに高い値を示し、CPT-11 及び SN-38 の IC_{50} 値はわずかに低い値を示した (Table 5)。

細胞倍加時間について検討したところ、SW620/OxR 細胞の細胞倍加時間は約 28 時間であり、control SW620 細胞の細胞倍加時間は約 20 時間であった (Fig. 12)。この結果から、SW620/OxR 細胞の細胞増殖速度は、control SW620 細胞と比較して遅いことが示唆された。

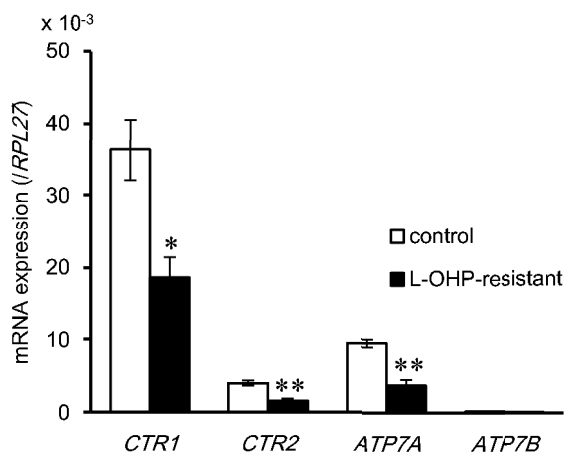


Fig. 11. Comparison of Copper Transporters in SW620/OxR Cells and Control SW620 Cells

The mRNA expression of *CTR1*, *CTR2*, *ATP7A*, and *ATP7B* was detected in SW620/OxR cells and control SW620 cells by real-time RT-PCR and normalized by *RPL27* mRNA expression. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 significantly different from control SW620 cells).

Table 5. IC₅₀ Values of Anti-cancer Drugs for CRC Treatments in SW620/OxR Cells and Control SW620 Cells

Cell	IC ₅₀ value				
	L-OHP (μ M)	CDDP (μ M)	5-FU (μ M)	CPT-11 (μ M)	SN-38 (nM)
control	13.8 \pm 2.2	30.6 \pm 3.5	8.4 \pm 1.6	4.3 \pm 0.2	10.0 \pm 0.7
L-OHP-resistant	260.8 \pm 13.7	32.3 \pm 2.2	16.8 \pm 1.9	3.2 \pm 0.3	4.9 \pm 0.1
<i>p</i> value	0.0001	0.698	0.026	0.032	0.002

The IC₅₀ values of anti-cancer drugs were calculated. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

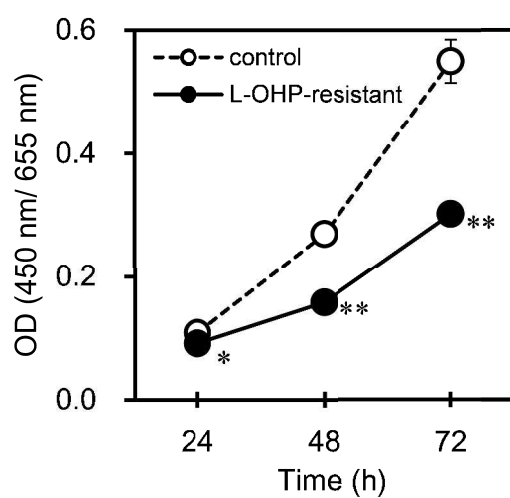


Fig. 12. Proliferation Profile of SW620/OxR Cells and Control SW620 Cells

The number of SW620/OxR cells and control SW620 cells was compared by the WST-8 assay. Data represents the mean \pm S.E.M. of four independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from control SW620 cells).

第 3 項 考 察

SW620/OxR 細胞において、白金錯体の細胞内への流入や細胞外への流出に関与する銅トランスポーターである *CTR1*、*CTR2* 及び *ATP7A* の mRNA 発現量が抑制されていることを認めた。しかし、CDDP の IC₅₀ 値は、SW620/OxR 細胞及び control SW620 細胞において、有意な差を認めなかった。これらの結果から、SW620 細胞において、銅トランスポーターの発現量の変化は白金錯体への感受性に影響しないことが示唆された。そのため、SW620 細胞の L-OHP 抵抗性の獲得には、銅トランスポーターの発現量の変化以外の因子の関与が推測された。

L-OHP に対する感受性には銅トランスポーター以外にも様々な因子が関与する。例えば、アポトーシス促進因子である caspase 3 や Bax は、L-OHP に対する感受性と関連することが報告されている¹³⁾。しかし、これらの因子は L-OHP だけでなく CDDP に対する感受性にも関連する。本検討において、SW620/OxR 細胞と control SW620 細胞の CDDP に対する感受性に有意な差を認めなかった。そのため、SW620/OxR 細胞における L-OHP 抵抗性にこれらの因子は関与していないと考えられた。

SW620 細胞において、5-FU、CPT-11 及び SN-38 に対する感受性は L-OHP 抵抗性獲得により有意に変化した。しかし、その変化はわずかなものであり、SW620/OxR 細胞は L-OHP に選択的な抵抗性を示すことが示唆された。

第 3 節 SW620 細胞のオキサリプラチン抵抗性獲得による上皮間葉転換の誘導及び miR-200 ファミリーの発現量の変化についての検討

Yang らは、L-OHP に対する抵抗性を獲得したヒト大腸がん細胞株 KM12L4 細胞及び HT29 細胞では、EMT により転移能が亢進することや、間葉系細胞の性質を獲得したことを報告した¹⁷⁾。そこで、本節では第 1 節で作製した SW620/OxR 細胞における EMT 関連因子の発現量や、運動能及び浸潤能について検討した。さらに、EMT 関連因子の発現を制御する miR-200 ファミリー及び miR-205 の発現量について検討した。

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

Matrigel は Corning (New York, NY, USA) より購入した。Monoclonal mouse anti- β -actin 抗体、goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) 抗体及び goat anti-rabbit IgG-HRP 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。Monoclonal rabbit anti-E-cadherin 抗体、monoclonal rabbit anti-vimentin 抗体及び monoclonal rabbit anti-ZEB1 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入した。

1-2 細胞培養

SW620/OxR 細胞及び control SW620 細胞は、本章第 2 節第 1 項 1-2 と同様に培養した。また、SW480 細胞は、本章第 1 節第 1 項 1-2 と同様に培養した。

1-3 運動能及び浸潤能の評価

8.0- μ m Transwell Insert を用い、Morelli らの方法により運動能及び浸潤能を評価した⁵⁷⁾。運動能の評価には Matrigel でコートしていない 8.0- μ m Transwell Insert を用いた。浸潤能の評価には、Matrigel でコートした 8.0- μ m Transwell Insert を用いた。細胞を 2.0×10^5 cells/insert で播種し、well 内に 10% FBS を含む培地を加えた。24 時間後、insert 内の培地を無血清培地に、well 内の培地を 20% FBS を含む培地に交換した (Fig. 13)⁵⁷⁾。37°C で 72 時間培養後、Transwell Insert のメンブレンを Diff Quik reagent (Sysmex, Kobe, Japan) で染色し、200 倍の倍率で観察した。5 つの視野で細胞をカウントし、平均値を用い運動能及び浸潤能を評価した。

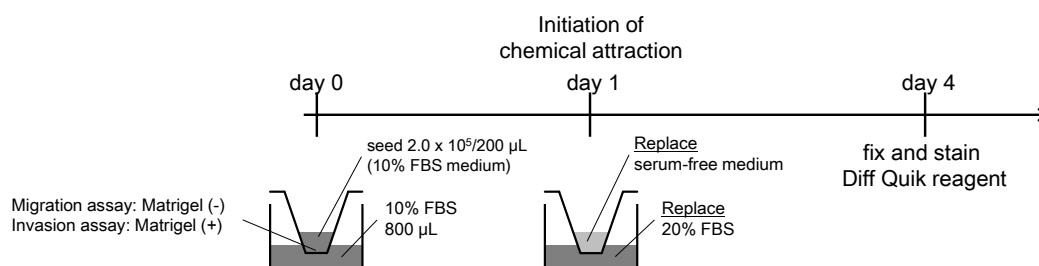


Fig. 13. Migration or Invasion Assay

1-4 RT-PCR による mRNA 発現量の定量

本章第 2 節第 1 項 1-3 と同様の方法で mRNA 発現量を定量した。本検討に用いたプライマーの配列を Table 6 に示す。

Table 6. Real-time RT-PCR Primers for mRNA Expression

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>RPL27</i>	ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA	TCTGAAGACATCCTTATTGACG
<i>CDH1</i>	ACAAGCCCGAATTCACCCAGGAG	AAGCGATGGCGGCATTGTAGGTG
<i>CDH2</i>	ACAGTGGCAGCTGGACTTGATCG	ACGGCCGTGGCTGTGTTTGAAAG
<i>Vimentin</i>	AACCAATGAGTCCCTGGAACGCC	CACGAAGGTGACGAGCCATTTCC
<i>Snail</i>	TCGGAAGCCTAACTACAGCGAGC	AGATGAGCATTGGCAGCGAGGC
<i>ZEB1</i>	ACTCAACTACGGTCAGCCCTGC	CCGCATTTTCTTTTTGGGCGGTG
<i>ZEB2</i>	AACACCCCTGGCACAACAACGAG	ATTGCGGTCTGGATCGTGGCTTC
<i>CD44s</i>	AAAGGAGCAGCACTTCAGGA	TGTGTCTTGGTCTCTGGTAGC
<i>CD44v9</i>	ACCATCCAACAACCTTCTACTCTGACA	CCTTCAGAATGATTTGGGTCTCTT
<i>xCT</i>	TGGCAGTGACCTTTTCTGAGCGG	AGCAAACACACCACCGTTCATGG

1-5 Western blot によるタンパク質発現量の測定

M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、タンパク質を細胞から抽出した。各タンパク質サンプルは 10% または 4-12% NuPAGE polyacrylamide gel electrophoresis Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、4-morpholinepropanesulfonic acid buffer pH 7.7 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により電気泳動した。電気泳動後、iBlot (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用い

polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にタンパク質を転写した。PVDF 膜を室温において Blocking One (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 中で 30 分間振盪後、一次抗体と室温で 1 時間、または 4°C で一晩反応させた。その PVDF 膜を Tris-buffered saline-0.1% Tween 20 で洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。タンパク質は Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) により可視化した。

1-6 細胞内 ROS 量の測定

細胞を 3.0×10^3 cells/well で 96-well プレートに播種し、24 時間培養した。24 時間後 10 μ M L-OHP を加え、さらに 6 時間培養した。ポジティブコントロールとして、200 mM H_2O_2 を 1 時間処置した細胞を用いた。その後、培地を除き、新たに 10 μ M 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を含む培地 100 μ L を加えた。1 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、各 well に 100 μ L PBS を加え、Infinite F200 PRO (Mannedorf, Switzerland) により、励起波長 480 nm、発光波長 535 nm で蛍光強度を測定した。細胞内の ROS 量は各ポジティブコントロールにより標準化した。

1-7 Wound-healing assay による運動能の評価

運動能を wound-healing assay により評価した。細胞を播種し、コンフルエントとした後、1000- μ L ピペットチップの先端により創傷を作製し、その幅を測定した。37°C で 48 時間培養後、創傷の幅を測定し、以下の式を用いて percentage of migration rate を算出し、運動能を評価した。

Percentage of migration rate

$$= ((\text{wound length at 0 h}) - (\text{wound length at 48 h})) \times 100 / (\text{wound length at 0 h})$$

1-8 RT-PCR による miRNA 発現量の定量

Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用い、200 塩基以下の RNA を含む total RNA を細胞より抽出した。Mir-X miRNA First Strand Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) により total RNA を逆転写し、real time-PCR を以下の条件で行った。初めに 95°C、10 秒で熱変性させた後、5 秒 95°C、20 秒 60°C を 40 サイクル行った。

サイクル後、融解曲線分析により産生物が単一であるか検討した。各 miRNA 発現量は、U6 small nuclear RNA (snRNA) により標準化した。本検討に用いたプライマーを Table 7 に示す。また、U6 snRNA の発現量は Mir-X miRNA First Strand Synthesis Kit に含まれるプライマーを使用し定量した。

Table 7. Real-time RT-PCR Primers for miRNA Expression

miRNA	Sequence (5'-3')
miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGT
miR-200b	TAATACTGCCTGGTAATGATGA
miR-429	TAATACTGTCTGGTAAAACCGT
miR-200c	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA
miR-141	TAACACTGTCTGGTAAAGATGG
miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG

1-9 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で表し、2 群間の比較検討には Unpaired Student's *t*-test を用いた。

第 2 項 結果

SW620/OxR 細胞は control SW620 細胞と比較して、より楕円形の形状を示した (Fig. 14A)。次に、EMT 関連因子の発現量について検討した結果、SW620/OxR 細胞において、*CDH1* の mRNA 発現量は低下し、*vimentin* 及び *ZEB1* の mRNA 発現量は増加した (Fig. 14B)。一方、*Snail* の mRNA 発現量に有意な変化は認めなかった (Fig. 14B)。同様に、SW620/OxR 細胞において、E-cadherin のタンパク質発現量は低下し、*vimentin* 及び *ZEB1* のタンパク質発現量は増加した (Fig. 14C)。また、間葉系細胞のマーカールとされる N-cadherin をコードしている *CDH2* 及び *ZEB2* の mRNA 発現量は、control SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において観察されなかった。次に、運動能及び浸潤能について検討したところ、SW620/OxR 細胞の運動能及び浸潤能は control SW620 細胞と比較して有意に亢進していた (Fig. 14D)。これらの結果より、SW620 細胞と比較して SW620/OxR 細胞はより間葉系細胞の特徴を示すことが示唆された。

SW620 細胞において、*CD44s* と *CD44v9* の mRNA 発現量が L-OHP 抵抗性の獲得により低下した (Fig. 15A)。さらに、Mashita らの報告⁴⁷⁾と同様に、*CD44s/CD44v9* ratio は control SW620 細胞と比較して、より間葉系細胞の特徴を示す SW620/OxR 細胞において著しく高値を示した (Fig. 15B)。

その他、ROS により EMT が誘導されることが報告されている⁴⁸⁾。しかし、SW620 細胞において、細胞内の ROS 量及び *xCT* の mRNA 発現量に、L-OHP 抵抗性の獲得による有意な変化は認めなかった (Fig. 16)。

L-OHP を 111 日間処置した SW480 細胞において、control SW480 細胞と比較して、*CDH1* 及び *vimentin* の mRNA 発現量は有意に増加したが、運動能は L-OHP の長期処置により変化しなかった (Fig. 17)。これらの結果より、SW480 細胞においては L-OHP の長期処置により間葉系細胞の特性を獲得しなかったことが示唆された。

SW480 細胞及び SW620 細胞における miR-200 ファミリーの発現量について比較検討したところ、SW480 細胞では、SW620 細胞と比較して、miR-200 ファミリーの発現量が著しく高かった (Fig. 18)。

次に、SW620/OxR 細胞及び control SW620 細胞における miR-200 ファミリー及び miR-205 の発現量について比較検討した。その結果、SW620/OxR 細胞において、クラスターを形成する miR-200c 及び miR-141 の発現量が有意に低下した (Fig. 19)。一方、miR-200a、miR-200b、miR-429 及び miR-205 の発現量は SW620/OxR 細胞及び control

SW620 細胞において、差は認められなかった (Fig. 19)。

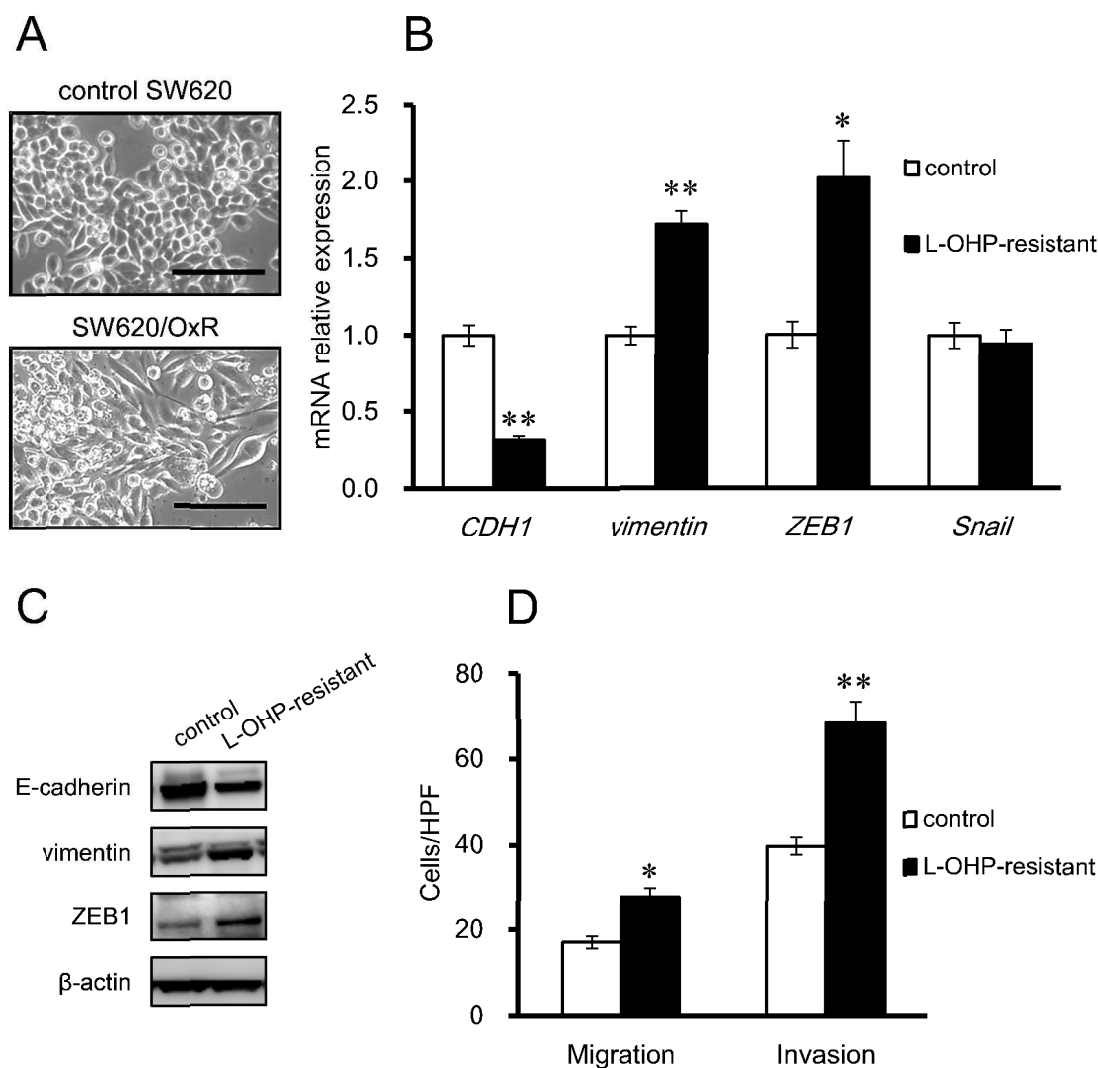


Fig. 14. Changes in EMT-related Molecules and Metastasis Activity in SW620/OxR Cells

(A) Morphological characteristics of SW620/OxR cells and control SW620 cells were observed by phase contrast microscopy (Scale bar: 100 μ m). (B) The mRNA expression of *CDH1*, *vimentin*, *ZEB1*, and *Snail* in SW620/OxR cells and control SW620 cells was detected by real-time PCR analysis and normalized by *RPL27* mRNA expression. (C) The protein expression of E-cadherin, vimentin, and ZEB1 was detected in SW620/OxR cells and control SW620 cells by western blotting. β -actin was used as a loading control. (D) Migration assay and invasion assay were performed in SW620/OxR cells and control SW620 cells. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 significantly different from control SW620 cells). HPF: High-power field ($\times 200$)

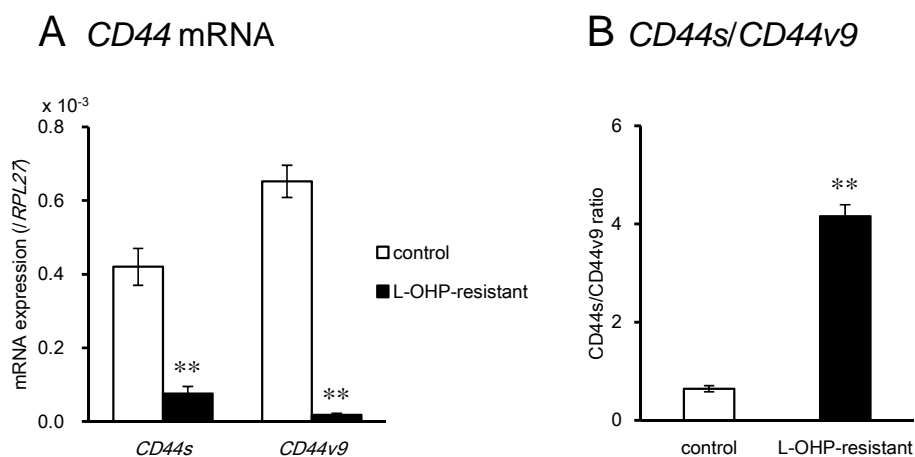


Fig. 15. Comparison of CD44 in SW620/OxR Cells and Control SW620 Cells

(A) The mRNA expression of *CD44s* and *CD44v9* was detected in SW620/OxR cells and control SW620 cells by real-time RT-PCR and normalized by *RPL27* mRNA expression. (B) *CD44s/CD44v9* ratio was determined using the data shown in (A). Each column represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, ***p* < 0.01 significantly different from control SW620 cells).

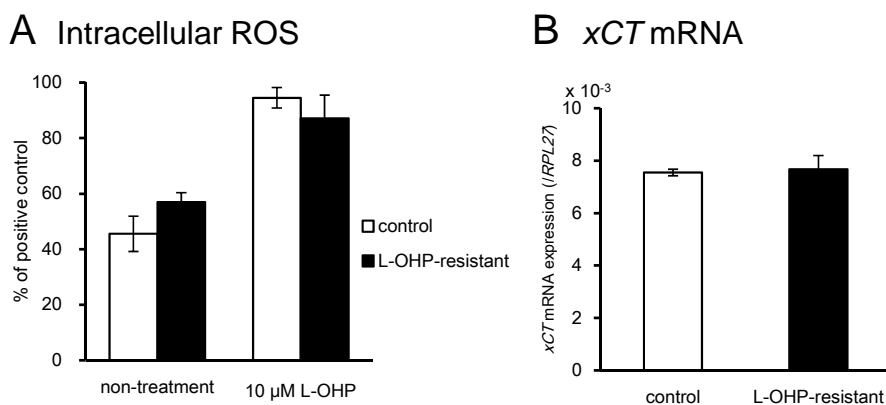


Fig. 16. Comparison of Intracellular ROS and xCT in SW620/OxR Cells and Control SW620 Cells

(A) The intracellular ROS levels were detected in SW620/OxR cells and control SW620 cells by DCFH-DA and normalized by intracellular ROS levels of each positive control treatment. (B) The mRNA expression of *xCT* was detected in SW620/OxR cells and control SW620 cells by real-time RT-PCR and normalized by *RPL27* mRNA expression. Each column represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments.

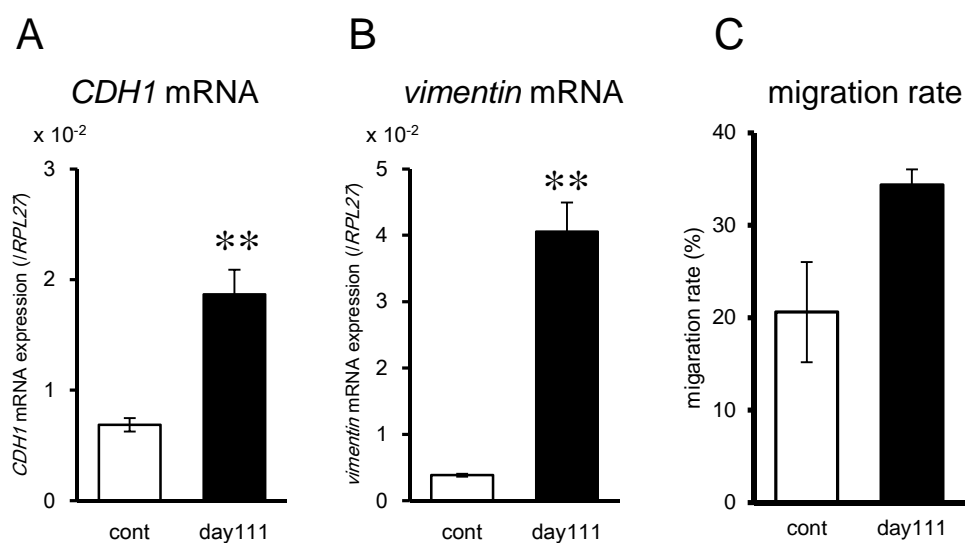


Fig. 17. EMT-related mRNA Expression Levels and Migration Activity in SW480 Cells Treated with L-OHP for 111 Days and Control SW480 Cells

The mRNA expression of *CDH1* (A) and *vimentin* (B) in SW480 cells treated with L-OHP for 111 days and control SW480 cells was detected by real-time PCR analysis and normalized by *RPL27* mRNA expression. (C) Cells were scratched with a 1000- μ L pipette tip and photographed immediately after scratching (0 h). After a 48-h incubation, the lengths of the wounds were taken to calculate the migration rate. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, ***p* < 0.01 significantly different from control SW480 cells).

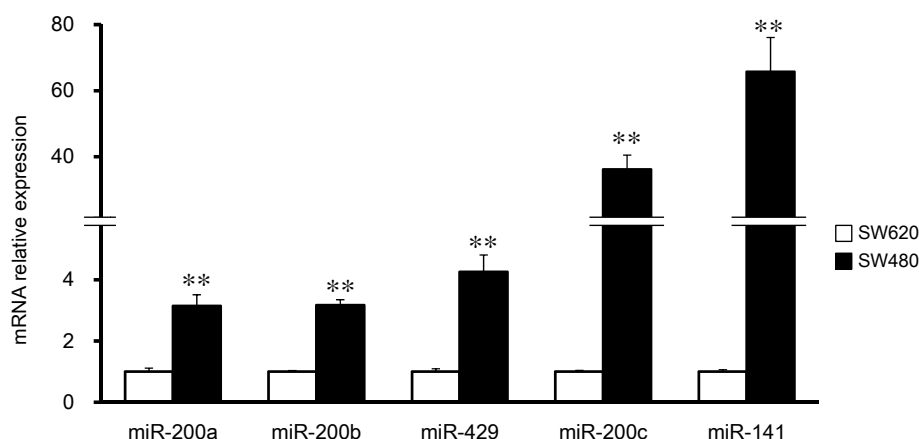


Fig. 18. Comparison of miR-200 Family Members in SW620 Cells and SW480 Cells

The expression of miR-200 family members in SW480 cells and SW620 cells was detected by real-time RT-PCR and normalized by U6 snRNA expression. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (Unpaired Student's *t*-test, ** $p < 0.01$ significantly different from SW620 cells).

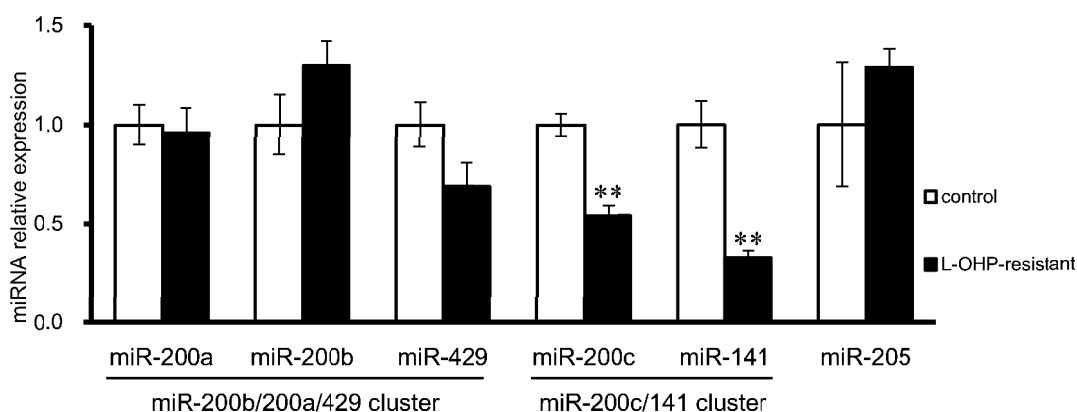


Fig. 19. Expression Levels of miR-200 Family Members in SW620/OxR Cells and Control SW620 Cells

The expression of miR-200 family members and miR-205 was detected in SW620/OxR cells (closed column) and control SW620 cells (open column) by real-time RT-PCR and normalized by U6 snRNA expression. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three to five independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, ** $p < 0.01$ significantly different from control SW620 cells).

第 3 項 考 察

EMT 関連因子の mRNA 及びタンパク質の発現量より、SW620 細胞において、L-OHP に対する抵抗性を獲得する過程で、ZEB1 の発現量が増加し、間葉系細胞の特性を示すことを認めた。また、ROS 量及び xCT の mRNA 発現量に有意な差を認めなかったことから、ROS 量以外の因子により間葉系細胞の特性が誘導されることが示唆された。その例として、L-OHP の感受性を低下させるだけでなく、EMT の誘導により増加する ERCC1 がある^{13,58)}。しかし、ERCC1 は Snail の発現と相関することも知られている⁵⁸⁾。そのため、Snail の mRNA 発現量に有意な変化を認めなかったことから、本検討において ERCC1 は SW620 細胞での L-OHP 抵抗性の獲得に関与していないと考えられた。

L-OHP の長期処置を行った SW480 細胞において、*vimentin* の mRNA 発現量は増加したが、*CDHI* の mRNA 発現量も増加し、運動能は亢進しなかった。この結果より、SW480 細胞は L-OHP の長期処置により、間葉系細胞の特性を獲得しにくいことが示唆された。なお、間葉系細胞の特性を持つ乳がん細胞は、抗悪性腫瘍薬に対する抵抗性を生じやすいことが示唆されている⁵⁹⁾。そのため、L-OHP の長期処置を行った SW480 細胞は間葉系細胞の特性を獲得しにくく、L-OHP に対する抵抗性を獲得しなかった可能性が考えられた。さらに、SW480 細胞では SW620 細胞と比較して、miR-200 ファミリーの発現量が著しく高いことを認めた。

SW620/OxR 細胞において、クラスターを形成する miR-200c 及び miR-141 の発現量が有意に低下した。この結果は L-OHP 抵抗性大腸がん細胞において、miR-200 ファミリーの発現が抑制されていることを初めて明らかにした。さらに、miR-200c 及び miR-141 の発現抑制が本検討において観察された L-OHP 抵抗性の獲得や EMT の誘導を促進する可能性が示唆された。

Zhou らは三種類の大腸がん細胞株とその L-OHP 抵抗性細胞株における miRNA 発現量を比較したが、L-OHP 抵抗性の獲得による miR-200c の発現量抑制は観察されなかったことを報告し、miR-141 の発現量は検討していなかった⁶⁰⁾。しかし、その三種類の大腸がん細胞株の一つである HT29 細胞では、L-OHP 抵抗性獲得の過程で、ZEB1 以外の EMT 誘導因子により EMT が誘導されている可能性が報告された¹⁸⁾。そのため、本検討において miR-200c 及び miR-141 の発現抑制は L-OHP 抵抗性獲得の過程における EMT を誘導する一因である可能性を示したが、それ以外の要因によっても EMT が誘導される可能性があり、大腸がん細胞の特性などさらなる検討が必要と考えられた。

小 括

L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞の作製を試み、浸潤能及び EMT 関連因子の発現量について SW480 細胞と SW620 細胞を用いて比較検討し、以下の結果を得た。

1. L-OHP の 155 日間処置により、L-OHP の IC₅₀ 値が約 16 倍以上に上昇した SW620 細胞が得られ、この細胞を L-OHP 抵抗性 SW620 細胞(SW620/OxR 細胞) として検討に用いた。一方、SW480 細胞への L-OHP の長期処置によって、L-OHP 抵抗性 SW480 細胞を得ることはできなかった。
2. SW620/OxR 細胞において、白金錯体である CDDP 及び大腸がんのがん化学療法に用いられる 5-FU、CPT-11、及び CPT-11 の活性代謝物である SN-38 に対する感受性に、control SW620 細胞と比較して、大きな相違は認めなかった。
3. SW620 細胞において、L-OHP に対する抵抗性を獲得した場合、ZEB1 の発現量が増加することを認めた。
4. SW480 細胞では、SW620 細胞と比較して、miR-200 ファミリーの発現量が著しく高かった。
5. SW620/OxR 細胞において、クラスターを形成する miR-200c 及び miR-141 の発現量が SW620 細胞に比べ、有意に低下した。

第 2 章 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における浸潤能と exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに及ぼすデシタビンの影響

序 論

L-OHP は、FOLFOX 療法や XELOX 療法などの多剤併用療法として、大腸がん患者に対し用いられる。しかし、過去の報告や本研究の第 1 章において、大腸がん細胞が L-OHP に対する抵抗性を獲得する過程で EMT の誘導により、浸潤能が亢進することを明らかにした。そのため、高浸潤性の大腸がん細胞だけでなく、L-OHP に対する抵抗性を獲得した大腸がん細胞に対し、転移を抑制することは重要な課題である。

CDHI などのがん転移に関連する一部の遺伝子の発現制御に DNA のメチル化が関与している^{31,32,34-41,61-66}。さらに、DNMT を阻害する 2'-デオキシシチジン類似体である DAC 処置ががん細胞の転移に影響することが報告された³⁴⁻³⁹。すなわち、Shin らは、胃がん細胞においてタイトジャンクションの形成により、DAC が運動能及び浸潤能を抑制することを報告した³⁵。また、DAC を処置した肝がん細胞において、insulin-like growth factor binding protein 7 の再発現により浸潤が抑制されることや³⁸、上皮細胞マーカーである E-cadherin のタンパク質発現量が増加することが報告された⁶⁵。さらに、多くの腎がん細胞では DAC 処置により上皮細胞マーカーの発現量が増加したことも報告された⁶¹。また、Hur らは、転移を認める大腸がん患者のがん組織でも、がん細胞の EMT 及び MET は miR-200c/141 をコードする DNA のメチル化により制御されることを報告した⁶⁶。一方で、Chik らは、DAC を処置した非浸潤性乳がん細胞において、浸潤能が亢進することを報告した³⁶。さらに、DAC を処置した正常腎細胞では間葉系細胞マーカーの発現量が増加したことも報告された⁶¹。このように、近年の研究において DAC による EMT 関連因子や転移能に及ぼす影響はがん細胞の特性により異なることが示されている。しかし、L-OHP に対する抵抗性を獲得し、浸潤能が亢進した大腸がん細胞の浸潤能や EMT 関連因子の発現量に及ぼす DAC の影響についての報告は乏しい。

近年、がん細胞の浸潤能や DAC による DNA 脱メチル化の進行の指標として、exosome の内容物が有用であると期待されている。exosome は分泌した細胞の特性や生理条件に対応するタンパク質や mRNA、miRNA などを内包する。そのため、exosome の内容物が大腸がんなどの診断のためのバイオマーカーとして有用ではないかと注目を集めている。過去の報告では、血漿中の exosome において、がん抑制因子である tumor protein

p73 のアイソフォームである $\Delta Np73$ の mRNA 発現レベルや、exosome 中の miR-21 や let-7a などの miRNA の発現レベルは大腸がん患者で増加していた^{29,67)}。さらに、高浸潤性がん細胞の exosome 中に miR-200 ファミリーの発現レベルが低浸潤性がん細胞に比べ、低いことが報告されている³⁰⁾。その他にも、human leucocyte antigen-1 などの exosome 中のタンパク質の発現レベルは DAC 処置により増加することが報告された⁶⁸⁾。しかし、exosome 中の miRNA 発現レベルに及ぼす DAC の影響についての報告は乏しい。

以上の知見から、L-OHP 抵抗性大腸がん細胞の転移能及び EMT 関連因子に、DAC が影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで著者は、同一患者から単離されたヒト大腸がん細胞株である SW480 細胞、SW620 細胞及び第 1 章で作製した SW620/OxR 細胞を用い、運動能及び浸潤能に及ぼす DAC の影響を比較検討した (第 1 節)。そして、EMT 関連因子の発現量に及ぼす DAC の影響についても検討した (第 2 節)。さらに、exosome 中の miR-200 ファミリーの発現レベルが各細胞の浸潤能の指標となることが考えられたため、exosome 中の miR-200 ファミリーの発現レベルに及ぼす DAC の影響について検討した (第 3 節)。

第 1 節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の運動能及び浸潤能に及ぼす デシタビンの影響についての検討

近年の研究において DAC による EMT 関連因子や転移能に及ぼす影響ががん細胞の特性により異なることが示唆されている。しかし、L-OHP に対する抵抗性を獲得し、浸潤能が亢進した大腸がん細胞における DAC の影響についての報告は乏しい。そこで、SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞を用い、運動能及び浸潤能に及ぼす DAC の影響を比較検討した

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

DAC は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。DAC と同様に 2'-デオキシシチジン類似体であるが DNMT 阻害作用を示さないシタラビン (Ara-C) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。

1-2 細胞培養

SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞を用い、10% FBS、100 U/mL penicillin 及び 100 µg/mL streptomycin を加えた L-15 培地において、37°C で培養した。SW620/OxR 細胞は 80 µM L-OHP を含む培地で培養し、検討に用いる前に L-OHP を含まない培地で一度継代培養した。

1-3 薬物処置

種々のがん細胞株において、DNMT 阻害薬は細胞増殖を約 20% 抑制する濃度で、シトシンの脱メチル化が誘導されることが報告されている⁶⁹⁾。2.0 µM DAC を 72 時間処置することで、それぞれ細胞増殖が 1-30% 抑制された (Fig. 20)。この結果より、SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞に 2.0 µM DAC を 72 時間処置し、以下の検討を行った。また、Ara-C の 72 時間処置では、細胞増殖の抑制効果が 3 種類の細胞で大きく異なり 3 種類の細胞すべてで適切な濃度を決定できなかった。そのため、SW480 細胞及び SW620 細胞で細胞増殖を 20-30% 抑制する 0.3 µM Ara-C を 72 時間処置し、ネガティブコントロールとして以下の検討を行った。

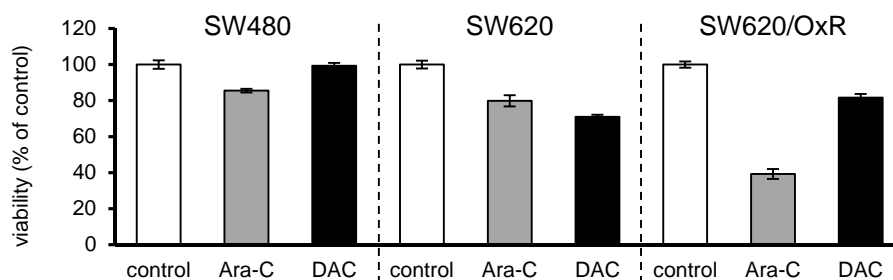


Fig. 20. Viability of CRC Cells Treated with DAC and Ara-C

CRC cells were incubated with 0.3 μM Ara-C or 2.0 μM DAC for 72-h in a 96-well plate. Cell viability was measured by the WST-8 assay. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three to four experiments.

1-4 RT-PCR による mRNA 発現量の定量

第 1 章第 2 節第 1 項 1-3 と同様の方法で mRNA 発現量を定量した。本検討に用いたプライマーの配列を Table 8 に示す。

Table 8. Real-time RT-PCR Primers for mRNA Expression

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>RPL27</i>	ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA	TCTGAAGACATCCTTATTGACG
<i>MAGEA1</i>	AGGTTTCCATTCTGAGGGACGGC	TTCTCCTTGGTGCTCCTCTGTGG

1-5 運動能及び浸潤能の評価

第 1 章第 3 節第 1 項 1-3 と同様の方法で細胞の運動能及び浸潤能を評価した。

1-6 統計学的処理

データは平均値 \pm 標準誤差で表し、3 群間の比較検討には Student-Newman-Keuls test を用いた。

第 2 項 結果

Melanoma-associated antigen 1 (MAGEA1) の mRNA 発現量が脱メチル化の進行により増大することが報告されている^{70,71)}。コントロール及び Ara-C 処置を行った 3 種の細胞株では、*MAGEA1* の mRNA 発現は検出されなかった (Fig. 21)。一方、DAC を処置した 3 種の細胞株において、*MAGEA1* の mRNA 発現が検出された (Fig. 21)。この結果から、SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、*MAGEA1* の DNA は DAC 処置により脱メチル化されたことが示唆された。

次に、運動能及び浸潤能について検討したところ、SW480 細胞では、Ara-C を処置した細胞と DAC を処置した細胞の間で運動能及び浸潤能に有意な差は認めなかった (Table 9, 10)。一方、SW620 細胞において、Ara-C 処置を行った細胞と比較して、DAC を処置した細胞の浸潤能が抑制された (Table 10)。また、SW620/OxR 細胞において、Ara-C 処置を行った細胞と比較して、DAC を処置した細胞の運動能及び浸潤能が抑制された (Table 9, 10)。

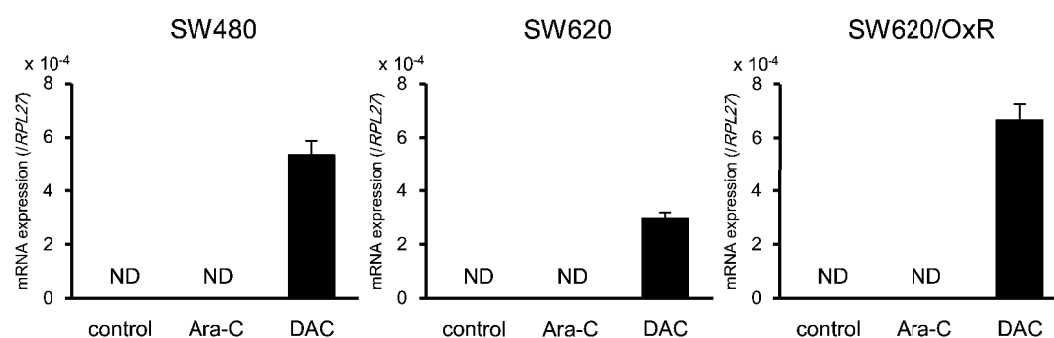


Fig.21 Effects of the DAC Treatment on the mRNA Expression Level of MAGEA1 in CRC Cells

Samples of total RNA from cultured cells after a 72-h treatment with 0.3 μ M Ara-C or 2.0 μ M were prepared. *MAGEA1* mRNA expression levels were detected by a real-time PCR analysis and normalized by *RPL27* mRNA expression levels. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ND: not detected

Table 9. Effects of Ara-C and DAC Treatment on Migration Ability of CRC Cells

Cell line	Migration cells/ High-power field ($\times 200$)		
	control	Ara-C	DAC
SW480	8.8 ± 0.9	7.4 ± 0.5	$5.5 \pm 0.8^*$
SW620	17.5 ± 1.9	15.7 ± 1.8	12.1 ± 1.4
SW620/OxR	20.8 ± 1.2	20.2 ± 0.7	$16.1 \pm 0.7^{*\dagger}$

Cells were treated, and migration assay was performed. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Student–Newman–Keuls test, $*p < 0.05$ significantly different from control cells, $^\dagger p < 0.05$ significantly different from Ara-C treatment cells).

Table 10. Effects of Ara-C and DAC Treatment on Invasion Ability of CRC Cells

Cell line	Invasion cells/ High-power field ($\times 200$)		
	control	Ara-C	DAC
SW480	4.7 ± 0.4	$2.4 \pm 0.2^{**}$	$1.9 \pm 0.3^{**}$
SW620	36.1 ± 2.9	30.6 ± 1.7	$20.9 \pm 0.6^{**\dagger}$
SW620/OxR	65.5 ± 3.3	$45.9 \pm 2.5^{**}$	$31.4 \pm 2.4^{**\dagger\dagger}$

Cells were treated, and invasion assay was performed. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Student–Newman–Keuls test, $**p < 0.01$ significantly different from control cells, $^\dagger p < 0.05$, $^\dagger\dagger p < 0.01$ significantly different from Ara-C treatment cells).

第 3 項 考 察

DAC を処置した SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、*MAGEA1* の mRNA の発現が検出されたため、DAC 処置により DNMT を阻害することで、DNA の脱メチル化反応が進行したことが考えられた。

運動能及び浸潤能について検討したところ、DNA のメチル化を阻害しない Ara-C 処置と比較して、DAC 処置により SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞の浸潤能が抑制された。さらに、SW620 細胞の運動能は DAC 処置により抑制されなかったが、SW620/OxR 細胞の運動能が DAC 処置により有意に抑制された。これらの結果は、L-OHP 抵抗性大腸がん細胞の運動能及び浸潤能が DAC による DNA 脱メチル化によって抑制される可能性を初めて示した。

SW620/OxR 細胞でのみ Ara-C を処置した細胞と比較して、DAC を処置した細胞の運動能が抑制された。このことから、SW620 細胞の運動能は DNA の脱メチル化の影響を受けないが、L-OHP 抵抗性を獲得することで DNA の脱メチル化により抑制される様になった。そのため、L-OHP 抵抗性の獲得の過程において、DNA メチル化された遺伝子の mRNA 発現が抑制され、運動能が亢進している可能性が示唆された。しかし、SW620/OxR 細胞における運動能抑制は、浸潤能抑制と比較すると大きな変化ではなかった。そのため、L-OHP 抵抗性大腸がんを含む高浸潤性の大腸がんには DAC を処置することで、DNA の脱メチル化反応が進行し、高浸潤性大腸がんの浸潤、転移を抑制できる可能性が推測された。

第 2 節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の上皮間葉転換関連因子の発現量に及ぼすデシタビンの影響についての検討

前節では、L-OHP 抵抗性大腸がん細胞の浸潤能が、DAC により抑制されることが示唆された。そこで、その浸潤能抑制に E-cadherin や miR-200c、miR-141 などの EMT 関連因子の発現量増加が関与するかについて、SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞を用い、DAC の影響を比較検討した。

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

miR-200c 及び miR-141 の miRNA mimic は Bioneer (Seoul, Korea) より購入した。メチル化感受性高解像能融解曲線 (Methylation-sensitive High Resolution Melting: MS-HRM) 解析に用いた *CDHI* に対するプライマー (Table 11) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した。

Table 11. MS-HRM Primers for DNA Methylation

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>CDHI</i>	GAGTTTGC GGAAGTTAGTTTAGATTTTAG	CGACTCCAAAAACCCATAACTAACC

1-2 細胞培養及び薬物処置

本章第 1 節第 1 項 1-2、1-3 と同様の方法で細胞を培養し、薬物を処置した。

1-3 Western blot によるタンパク質発現量の測定

第 1 章第 3 節第 1 項 1-5 と同様の方法でタンパク質発現量を測定した。

1-4 RT-PCR による miRNA 発現量の定量

第 1 章第 3 節第 1 項 1-8 と同様の方法で miRNA 発現量を定量した。本検討に用いたプライマーの配列を第 1 章第 3 節第 1 項 Table 7 に示す。

1-5 miRNA mimic の導入と浸潤能の評価

Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で希釈した Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用い、SW620/OxR 細胞に miRNA mimic の導入を行った。FBS、penicillin 及び streptomycin を含まない培地で 10 nM miRNA mimic を 6 時間処置後、培地で洗浄した。その後 24 時間培養し、第 1 章第 3 節第 1 項 1-3 と同様の方法で浸潤能を評価した。

1-6 MS-HRM 解析による *CDHI* の DNA メチル化状態の評価

MS-HRM 解析により *CDHI* の DNA メチル化率を定量することにより、*CDHI* の DNA メチル化の状態を評価した。DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて、細胞から DNA を抽出し、亜硫酸ナトリウム処置による変性を EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) により行った。EpiTect HRM PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用い、以下の条件の PCR により、変性させた DNA を増幅させた。初めに 95°C、5 分で熱変性させた後、10 秒 95°C (denaturation)、30 秒 55°C (annealing)、10 秒 72°C (extension) を 45 サイクル行った。このサイクル後、65°C から 95°C まで 0.1°C/2 秒で上昇させ、MS-HRM 解析を行った。DNA メチル化率は methylated and unmethylated EpiTect Control DNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた検量線により定量した。

1-7 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で表し、3 群間の比較検討には Student-Newman-Keuls test を用いた。相関性は Pearson's correlation test を用い判定した。コントロールと多群間の比較には、Dunnett's test を用い検討した。

第 2 項 結果

上皮細胞に発現する E-cadherin 及び間葉系細胞に発現する vimentin のタンパク質発現量に及ぼす DAC の影響について検討した。SW480 細胞では、Ara-C を処置した細胞と DAC を処置した細胞間で E-cadherin のタンパク質発現量に差は認めず、処置の有無に関わらず vimentin のタンパク質発現量は検出限界以下だった (Fig. 22A)。一方、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、Ara-C 処置と比較して、DAC 処置により E-cadherin のタンパク質発現量は増加し、vimentin のタンパク質発現量は変化しなかった (Fig. 22A)。

上皮細胞において、細胞内の miR-200c 及び miR-141 の発現量は、間葉系細胞と比較して、高値を示すことが報告されている¹⁹⁾。そこで、細胞内の miR-200c 及び miR-141 の発現量について検討した。その結果、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、細胞内の miR-200c 及び miR-141 の発現量は、コントロール及び Ara-C 処置と比較して、DAC 処置により有意に増加したが、SW480 細胞では、DAC 処置による増加は認めなかった (Fig. 22B)。さらに、細胞内の miR-200c 及び miR-141 の発現量と浸潤能の間に強い負の相関を認めた (Fig. 23)。

miR-200c 及び miR-141 の発現量増加が浸潤能に及ぼす影響を観察するため、SW620/OxR 細胞において、miR-200c mimic または miR-141 mimic を導入し、浸潤能の変化について検討した。その結果、miR-200c mimic または miR-141 mimic を導入した細胞では、浸潤能は低下した (Fig. 24)。

SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、Fig. 25A に示す検量線により *CDH1* の DNA メチル化率を算出したところ、*CDH1* の DNA メチル化率は約 30% であった (Fig. 25B)。また、コントロール、Ara-C 処置細胞及び DAC 処置細胞において、*CDH1* の DNA メチル化率に有意な差は認めなかった (Fig. 25B)。これらの結果から、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞における、DAC 処置による E-cadherin のタンパク質発現量の増加に、*CDH1* の DNA の脱メチル化が関与していないと考えられた。

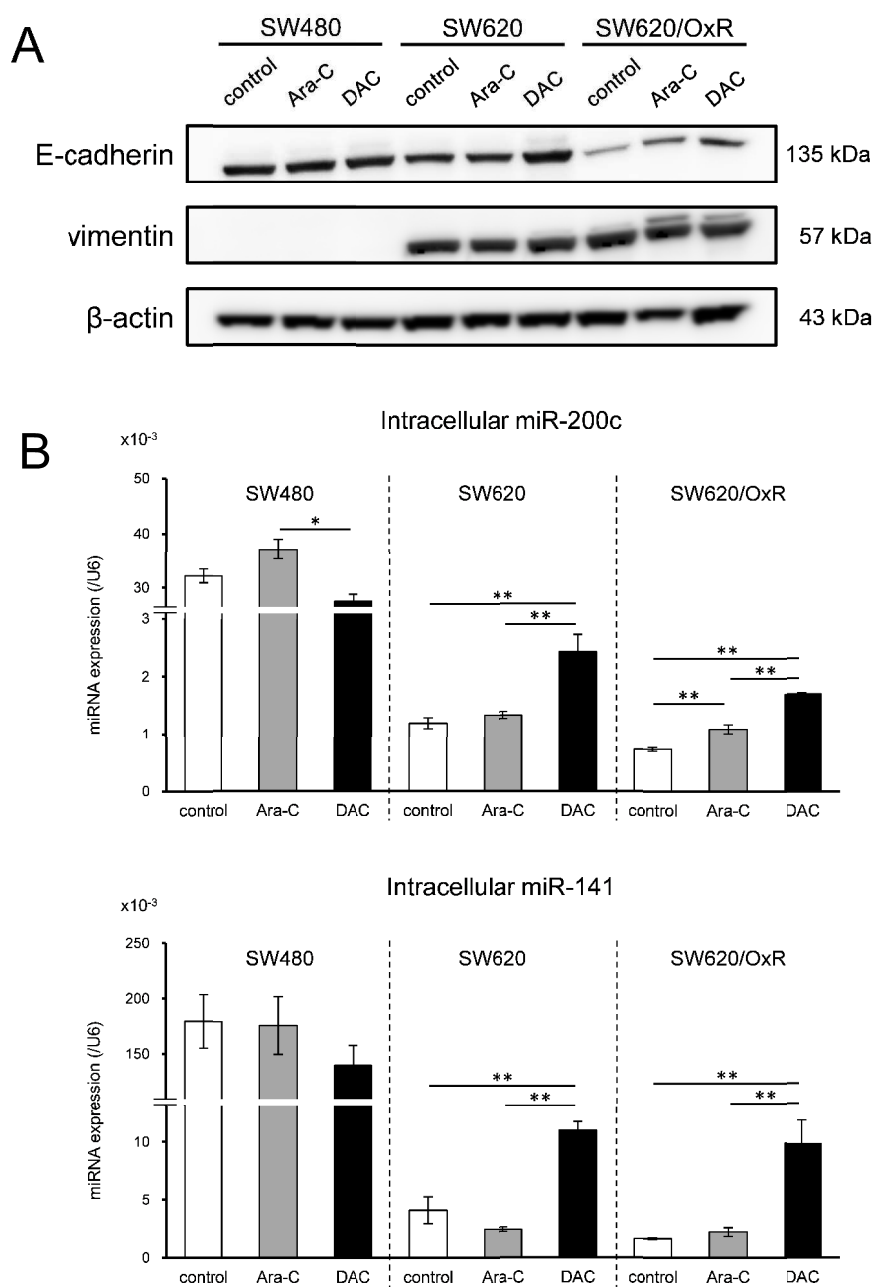


Fig. 22. Effects of Ara-C and DAC Treatment on EMT-related Molecules in CRC Cells

(A) The protein expression levels of E-cadherin and vimentin were detected by western blotting. β -actin was used as a loading control. (B) The intracellular expression levels of miR-200c and miR-141 were detected by real-time RT-PCR and were normalized by U6 snRNA expression levels. Samples of proteins and RNA from cultured cells after the 72-h treatment with 0.3 μ M Ara-C or 2.0 μ M DAC were prepared. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Student-Newman-Keuls test, * p < 0.05, ** p < 0.01).

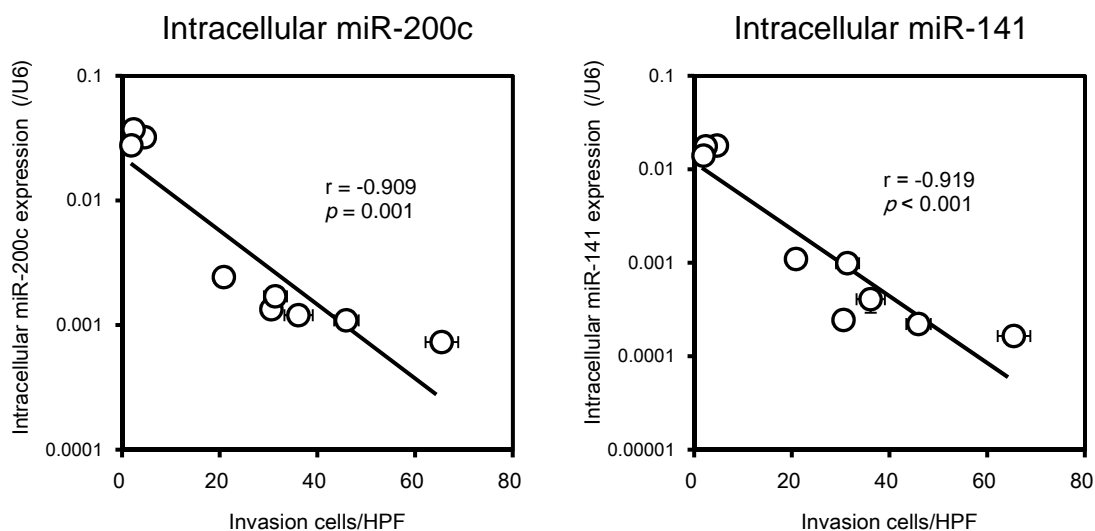


Fig. 23. Correlations between Invasion Ability and Intracellular miRNA Expression Levels

Logarithmic correlations were performed using the data shown in Table 10 and Figure 22B. Each value represents the mean of three independent experiments. The expression level of miRNA was transformed into \log_{10} before performing Pearson's correlation test. Each point represents the mean \pm S.E.M. of three experiments. r : Pearson correlation coefficients

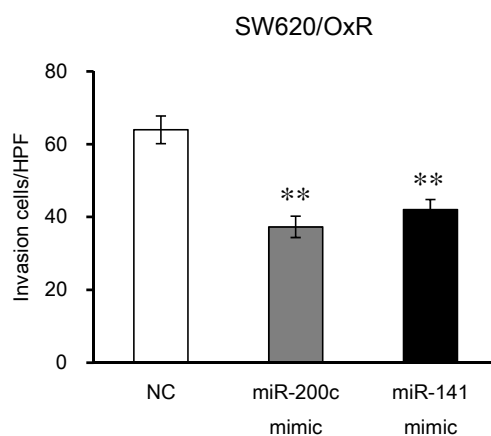


Fig. 24. Effects of miR-200c Mimic and miR-141 Mimic on Invasion Ability in CRC Cells

Invasion assay was performed in SW620/OxR cells after the 6-h treatment with 10 nM miRNA mimic. Each column represents the mean \pm S.E.M. of four independent experiments (Dunnett's test, $**p < 0.01$ significantly different from control cells). NC: negative control HPF: High-power field ($\times 200$)

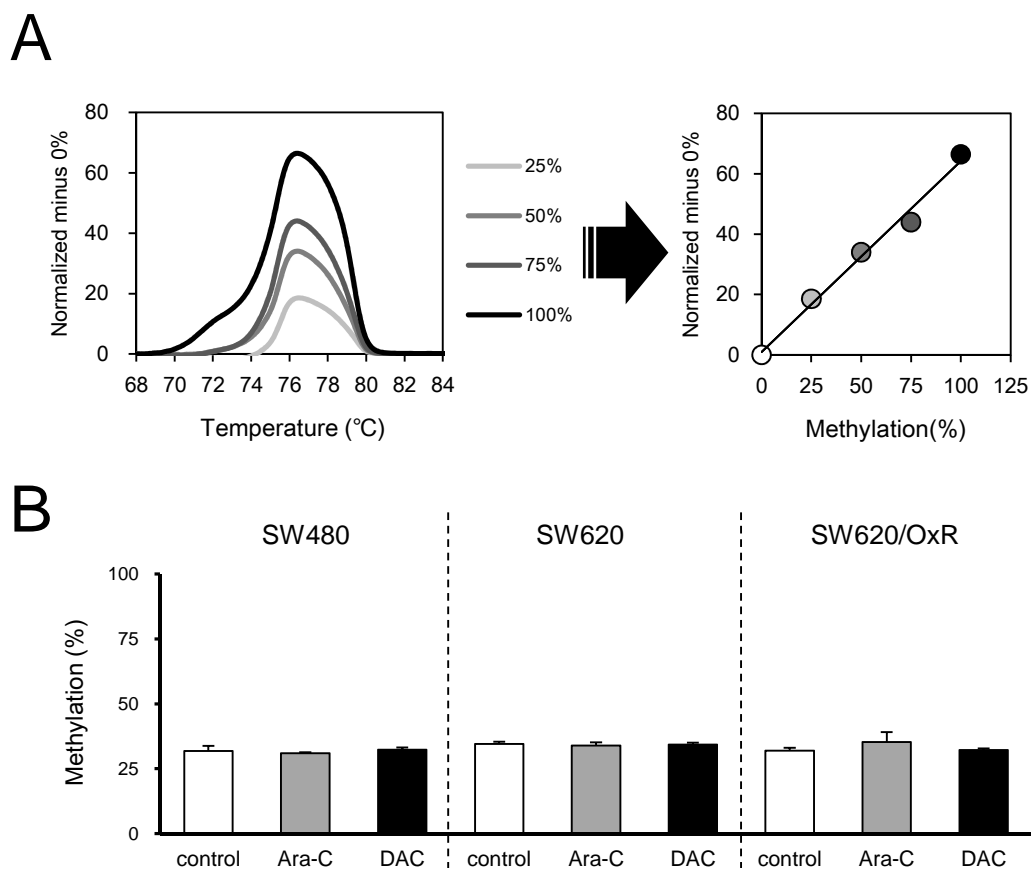


Fig. 25. Effects of Ara-C and DAC Treatment on DNA Methylation of *CDHI* in CRC Cells

The DNA methylation of *CDHI* was detected by MS-HRM analysis. (A) DNA methylation was normalized 0% methylated DNA standards (left panels) and was plotted standard curve (right panels). (B) The percentages of *CDHI* DNA methylation were calculated by standard curve. Samples of DNA from cultured cells after the 72-h treatment with 0.3 μM Ara-C or 2.0 μM were prepared. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

第 3 項 考 察

DNA のメチル化を阻害する DAC が E-cadherin の発現量を増加させ、SW620 細胞のみでなく、L-OHP 抵抗性大腸がん細胞である SW620/OxR 細胞の浸潤能を抑制することを初めて示した。

DAC は SW480 細胞において、コントロールと比較して運動能及び浸潤能を抑制したが、E-cadherin 及び miR-200c、miR-141 の発現量に影響を与えなかった。影響を与えなかった原因として、SW480 細胞は、SW620 細胞や SW620/OxR 細胞と比較して、E-cadherin 及び miR-200c、miR-141 の発現量が高値を示すことから、SW480 細胞において E-cadherin 及び miR-200c、miR-141 の発現量は DNA メチル化により制御されていない可能性が推測された。加えて、DAC を処置した SW480 細胞と Ara-C を処置した SW480 細胞の間で運動能及び浸潤能に差は認められなかった。この結果から、SW480 細胞において、DAC による DNA の脱メチル化は運動能及び浸潤能の抑制に関与しないことが示唆された。

Hur らは、miR-200b/200a/429 をコードしている DNA のメチル化が転移において、重要な役割を担っていないことを報告した⁶⁶⁾。さらに著者は、第 1 章で示したように、SW620/OxR 細胞において miR-200c 及び miR-141 の発現量が低下し、miR-200a、miR-200b 及び miR-429 の発現量が有意な変化を示さないことを認めた。そのため、miR-200 ファミリーではあるが miR-200a、miR-200b 及び miR-429 は、SW620/OxR 細胞における EMT の制御に重要でないと考えられ、以降の検討を行わなかった。

SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、*CDH1* の DNA メチル化率は、DAC 処置により低下しなかった。その原因として各コントロールの *CDH1* の DNA メチル化率が 30%程度と低かったことが考えられた。これらの結果により、DAC による E-cadherin のタンパク質発現量増加に *CDH1* の DNA の脱メチル化は直接的に関与していないことが示唆された。

第 3 節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞 exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに及ぼすデシタビンの影響についての検討

近年、exosome 中の miRNA の発現レベルは、exosome を放出した細胞の特性や生理条件により異なることが報告された³⁰⁾。高浸潤性卵巣がん細胞において、miR-200 ファミリーは細胞内だけではなく、その exosome 中においても高い発現レベルを示すことが Kobayashi らにより報告された³⁰⁾。そのため、exosome 中の miR-200 ファミリーの発現レベルががん細胞の浸潤能を表す指標となることが考えられた。さらに、exosome 中の miR-200 ファミリーの発現レベルが DAC 処置による浸潤能の低下に伴って変化する可能性を考え、各細胞における exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに及ぼす DAC の影響及び浸潤能との相関性について検討した。

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

Monoclonal mouse anti-heat shock protein 70 (HSP70) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。

1-2 細胞培養及び薬物処置

本章第 1 節第 1 項 1-2、1-3 と同様の方法で細胞を培養し、薬物を処置した。

1-3 超遠心分離法による培地からの exosome 中の RNA の抽出

exosome を超遠心分離法により培地から回収した (Fig. 26A)²⁹⁾。細胞を無血清培地で 48 時間培養後、細胞破片を除去するために培地を $500 \times g$ で 5 分遠心後、上清を回収し、 $16,500 \times g$ で 20 分間遠心した。遠心後の上清を回収し、 $0.20 \mu\text{m}$ フィルターでろ過後、 $120,000 \times g$ 、 4°C で 70 分間超遠心した。さらに、超遠心分離法を行い、SW620 細胞の培地から回収した沈殿物を western blot 法により、細胞内及び exosome 中で発現している HSP70、または細胞内でのみ発現している β -actin のタンパク質発現量の測定を行い、沈殿物が exosome であることを確認した (Fig. 26B)。超遠心後の沈殿物から exosome 中の RNA を Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により抽出した。

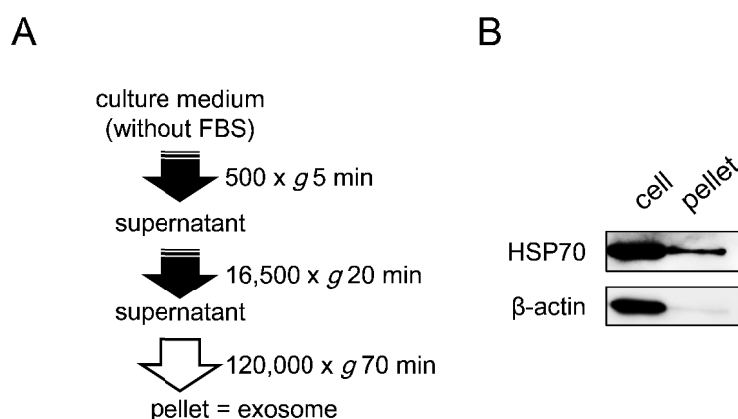


Fig. 26. Isolation and Confirmation of Exosomes

(A) Exosome isolation method used in this study. (B) The protein expression level of HSP70 was detected by western blotting. β -actin was used as an intracellular protein marker. The pellet after ultracentrifugation from culture medium, in which SW620 cells were incubated, were prepared.

1-4 RT-PCR による exosome 中の miRNA 発現レベルの定量

exosome 中の RNA サンプルを miScript Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) により逆転写を行った。cDNA は最大量の exosome 中の RNA を用い合成した。Real-time PCR は miScript SYBR Green Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用い、以下の条件で行った。初めに 95°C、15 分で熱変性させた後、15 秒 94°C、30 秒 55°C、30 秒 70°C を 40 サイクル行った。各 exosome 中の miRNA 発現レベルは miR-451a により標準化した²⁹⁾。本検討に用いたプライマーの配列を第 1 章第 3 節第 1 項 Table 7 及び Table 12 に示す。

Table 12. Real-time RT-PCR Primers for miRNA Expression

miRNA	Sequence (5'-3')
miR-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGTT

1-5 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で表し、3 群間の比較検討には Student-Newman-Keuls test を用いた。相関性は Pearson's correlation test を用い判定した。

第 2 項 結果

SW480 細胞では、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞と比較して、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは著しく高値を示した (Fig. 27A)。コントロールまたは Ara-C を処置した SW480 細胞と比較して、DAC を処置した SW480 細胞において、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに差は認められなかった (Fig. 27A)。一方、DAC を処置した SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、コントロールまたは Ara-C を処置した SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞と比較して、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは有意に増加した (Fig. 27A)。さらに、これらの exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは浸潤能と強い負の相関を示した (Fig. 27B)。また、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルはそれぞれ細胞内の miR-200c ($r = 0.957, p < 0.001$) 及び miR-141 ($r = 0.854, p = 0.003$) の発現量と強い正の相関を示した。

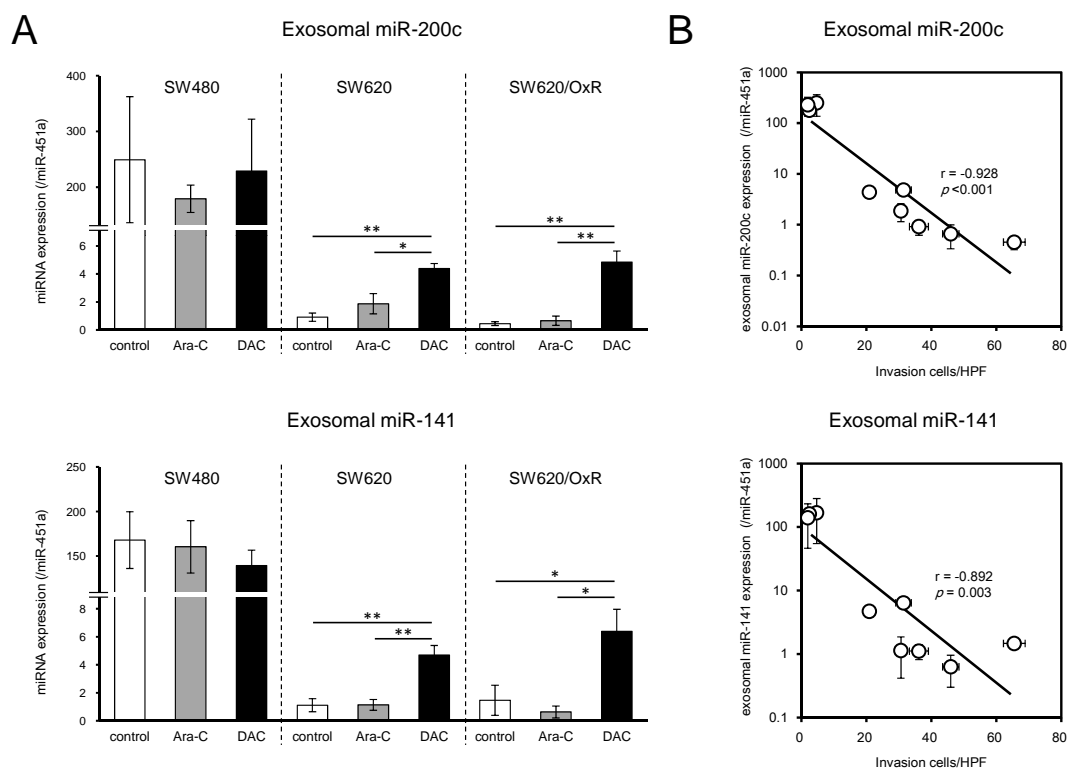


Fig. 27. Effects of Ara-C and DAC Treatment on Exosomal Expression Levels of miR-200c and miR-141 in CRC Cells

Samples of exosomes from cultured cells after the 72-h treatment with 0.3 μM Ara-C or 2.0 μM were prepared, and exosomal RNA was extracted. (A) The exosomal expression levels of miR-200c and miR-141 were detected by real-time RT-PCR and normalized by miR-451a expression levels. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Student-Newman-Keuls test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B) Logarithmic correlations were performed using the data shown in Table 10 and (A). Each point represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. The expression level of miRNA was transformed into \log_{10} before performing Pearson's correlation test. r : Pearson correlation coefficients

第 3 項 考 察

低浸潤性の SW480 細胞において、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルが著しく高値を示した。さらに、DAC 処置により浸潤能が抑制された SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルが有意に増加することを認めた。また、その発現量と各細胞の浸潤能とに強い負の相関も示した。これらの結果から、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルがヒト大腸がん細胞の浸潤能を示す指標となる可能性を示し、さらに DAC 処置による浸潤能抑制によっても exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルが、変化することが示唆された。

SW480 細胞は SW620 細胞や SW620/OxR 細胞と比較して、より上皮細胞の性質を示す。さらに、本章第 2 節の結果により、DAC 処置による浸潤能の抑制が E-cadherin などの上皮細胞マーカーの発現増大と共に誘導されていることが示唆された。また、細胞内の miR-200c 及び miR-141 の発現量は上皮細胞マーカーの発現を反映し¹⁹⁾、本検討においても exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルと細胞内のこれらの発現量の間には強い正の相関を認めた。そのため、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 は、浸潤能だけでなく非侵襲性の上皮細胞のバイオマーカーとなることが示唆された。

これまでに、各種の miRNA は、選択的に exosome に取り込まれることが報告されている^{29,72,73)}。しかし、本検討において、miR-200c 及び miR-141 の細胞内の発現量と exosome 中の発現レベルは正の相関を示したため、miR-200c 及び miR-141 は選択的に exosome に取り込まれていないことが示唆された。

Cheng らや Toiyama らは、転移を認めない大腸がん患者と比較して、転移を認める大腸がん患者の血清中 miR-200c 及び miR-141 の発現レベルが高値を示すことを報告した^{74,75)}。そのため、転移能が亢進した大腸がん細胞は miR-200c 及び miR-141 を細胞外に移行させるため、細胞外でそれらの miRNA 発現レベルが高値を示す可能性が考えられた。しかし、本検討において、原発巣由来の SW480 細胞と比較して、転移能が亢進しているリンパ節転移巣由来の SW620 細胞において、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは低値を示した。血清中では exosome の外にも miRNA が存在する⁷⁶⁾。したがって、転移を認める大腸がん患者の血清中では、exosome に含有されていない miR-200c 及び miR-141 の発現レベルが高値を示す可能性が考えられる。血清中に存在する exosome 内のこれらの miRNA と大腸がん患者でのがんの転移との関係は明らかに

なっておらず、さらなる検討が必要であると考えられた。

小 括

原発巣由来の大腸がん細胞 (SW480 細胞) 及びそのリンパ節転移巣細胞 (SW620 細胞) 並びにその L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞 (SW620/OxR 細胞) を用い、浸潤能、EMT 関連因子及び exosome 中の miRNA の発現レベルに DAC が及ぼす影響を比較検討し、以下の結果を得た。

1. DAC または Ara-C を処置した SW480 細胞の浸潤能及び E-cadherin のタンパク質発現量に差は認めなかった。
2. SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、DAC 処置により浸潤能が抑制され、E-cadherin のタンパク質発現量が増加した。
3. 細胞内の miR-200c 及び miR-141 の発現量は、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、DAC 処置により有意に増加したが、SW480 細胞では、有意な増加は認めなかった。
4. SW480 細胞では、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞と比較して、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは著しく高値を示した。
5. SW620 細胞や SW620/OxR 細胞において、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは DAC 処置により有意に増加した。
6. 各細胞のコントロール、Ara-C 処置細胞及び DAC 処置細胞の exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルと浸潤能は強い負の相関を示した。そのため、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルの増加が浸潤能の抑制を表す指標となる可能性が示唆された。

第3章 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における浸潤能と 上皮間葉転換関連因子の発現量に及ぼす 各種 DNA メチル基転移酵素阻害薬の影響と exosome 中の let-7b の発現レベルに及ぼすゼブラリンの影響

序論

DNMT を阻害する薬として、2'-デオキシシチジン類似体である DAC 以外にもシチジン類似体である AC や Zeb などが開発されており、新たな作用機序のがんに対する治療薬として期待されている。現在、日本では AC が骨髄異形成症候群治療薬として承認され⁷⁷⁾、DAC は AC と同じく骨髄異形成症候群治療薬として臨床試験が行われているが、DNMT 阻害薬は固形がんに対する抗悪性腫瘍薬としては承認が得られていない。したがって、DNMT 阻害薬が大腸がんなどの固形がんの治療においても有用であることを検討するために、基礎研究での知見の蓄積が必要である。

第2章において、DAC により、SW620/OxR 細胞の浸潤能が抑制されることを認めた。しかし、各種 DNMT 阻害薬が開発されているが、Flotho らは個々の DNMT 阻害薬によっては、それぞれ影響を及ぼす遺伝子が異なることを報告した⁴³⁾。また、各種 DNMT 阻害薬は DNA に組み込まれ、主に DNMT1 と強固に結合し、その活性を抑制するが、AC は RNA にも組み込まれ、タンパク質合成阻害を引き起こすことでも殺細胞作用を示す⁷⁷⁾。さらに、Zeb は DNMT 以外にも DNMT 阻害薬の不活化酵素であるシチジン脱アミノ化酵素を阻害する⁷⁸⁾。この様に各種 DNMT 阻害薬には、それらの作用に様々な差異があることが明らかになっている。

Wong らは miRNA である let-7 ファミリーの発現量が AC 処置では増加せず、Zeb 処置によって増加することを見出した⁴²⁾。let-7 ファミリーは 8 種類の miRNA により構成され、がん抑制関連 miRNA として、転移や細胞増殖、アポトーシスなどに関与する多くの遺伝子に影響を及ぼす²³⁻²⁸⁾。胃がん細胞において、let-7b 及び let-7g が AKT2 を抑制することで AKT シグナル経路を阻害し、細胞増殖や浸潤能を抑制することが報告された²⁵⁾。一方、転移を認めた大腸がん患者のがん細胞では、転移を認めない大腸がん患者のがん細胞と比較して、let-7c の発現量が有意に低下していることから、let-7c が転移を抑制することが報告された²⁷⁾。さらに、肝がん細胞において、let-7g の発現低下により、Snail のタンパク質発現量が増加し、EMT が誘導されることが報告された²⁸⁾。

がん細胞の浸潤能の相違により細胞内の let-7 ファミリーの発現量だけでなく、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルも変化する。let-7 ファミリーが exosome に選択的に移行することが示唆され、その選択性は細胞によって異なることが明らかになっている⁷²⁾。卵巣がんでは、高浸潤性がん細胞と低浸潤性がん細胞における細胞内 let-7 ファミリーの発現量に大きな差はないが、exosome 中では、高浸潤性がん細胞に比べ、低浸潤性がん細胞の let-7 ファミリーの発現レベルが低いことが報告されている³⁰⁾。

本章では、L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞を用い、浸潤能及び EMT 関連因子の発現量に及ぼす DNMT 阻害薬である DAC、AC 及び Zeb の影響について比較検討した (第1節)。さらに、転移を抑制する miRNA である let-7 ファミリーの細胞内及び exosome 中の発現レベルに及ぼす Zeb の影響について検討を行った (第2節)。

第1節 オキサリプラチン抵抗性SW620細胞の浸潤能と上皮間葉転換関連因子の発現量に及ぼす各種DNAメチル基転移酵素阻害薬の影響についての比較検討

2'-デオキシシチジン類似体またはシチジン類似体であるDAC、AC及びZebは、低毒性濃度で処置することでDNMTを阻害する。また、これらのDNMT阻害薬やDNAメチル化ががん転移能に影響を与えることが報告された³⁴⁻⁴¹⁾。しかし、L-OHP抵抗性ヒト大腸がん細胞におけるDNMT阻害薬の影響についての比較検討を行った報告は乏しい。そこで、本節では、浸潤能やEMT関連因子の発現量に及ぼすDNMT阻害薬の影響について検討した。

第1項 実験材料と方法

1-1 実験材料

ACはWako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)より購入した。ZebはTokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)より購入した。

1-2 細胞培養及び薬物処置

第1章第2節第1項1-2と同様の細胞を用い、同様の方法で培養した。

2 μ M DAC、3 μ M AC、あるいは150 μ M Zebを72時間処置することで、それぞれ10-30%まで細胞増殖が抑制された (Fig. 28)。この結果より、SW480細胞、SW620細胞及びSW620/OxR細胞に2 μ M DAC、3 μ M AC、あるいは150 μ M Zebを72時間処置し、以下の検討を行った。

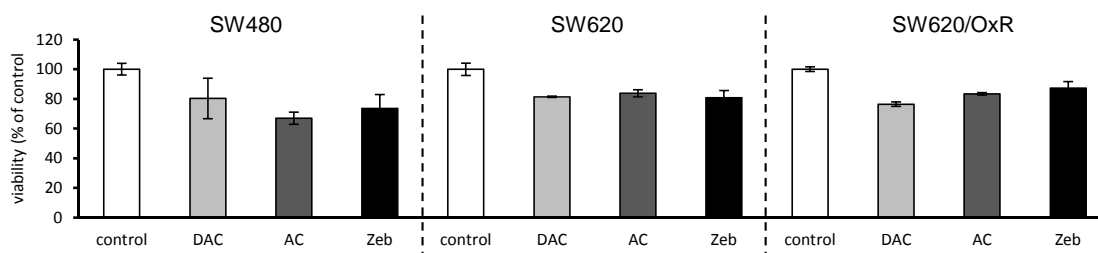


Fig. 28. Viability of CRC Cells Treated with DAC, AC, or Zeb

CRC cells were incubated with 2 μ M DAC, 3 μ M AC, or 150 μ M Zeb for 72-h in a 96-well plate. Cell viability was measured by the WST-8 assay. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three to four experiments.

1-3 RT-PCR による mRNA 発現量の定量

第1章第2節第1項1-3と同様の方法で mRNA 発現量を定量した。本検討には、第2章第1節第1項 Table 8 に示す配列のプライマーを用いた。

1-4 浸潤能の評価

第1章第3節第1項1-3と同様の方法で浸潤能を評価した。

1-5 Western blot によるタンパク質発現量の測定

第1章第3節第1項1-5と同様の方法でタンパク質発現量を測定した。

1-6 RT-PCR による miRNA 発現量の定量

第1章第3節第1項1-8と同様の方法で miRNA 発現量を定量した。本検討に用いたプライマーの配列は第1章第3節第1項 Table 7 に示した。

1-7 統計学的処理

データは平均値 \pm 標準誤差で表し、コントロールと多群間の比較検討には Dunnett's test を用いた。

第 2 項 結果

MAGEA1 の mRNA 発現は、DAC または AC を処置した各ヒト大腸がん細胞において検出されたが、コントロール及び Zeb 処置では検出されなかった (Fig. 29)。

浸潤能の変化について検討したところ、SW480 細胞、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、コントロールと比較して、DAC 処置及び Zeb 処置により浸潤能が抑制された (Table 13)。また、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、コントロールと比較して、AC 処置により浸潤能が亢進した (Table 13)。

次に、EMT 関連因子に及ぼす各種 DNMT 阻害薬の影響について検討した。その結果、SW480 細胞では、DAC、AC または Zeb 処置により E-cadherin のタンパク質発現量は変化せず、各処置の有無に関わらず、vimentin のタンパク質発現量は検出限界以下であった (Fig. 30A)。一方、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、DAC 処置により E-cadherin のタンパク質発現量が増加したが、Zeb 処置により E-cadherin 及び vimentin のタンパク質発現量が低下した (Fig. 30A)。また、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞における DAC 処置及び AC 処置では、vimentin のタンパク質発現量は変化しなかった (Fig. 30A)。さらに、miR-200c 及び miR-141 の発現量について検討したところ、SW480 細胞において、DAC 処置、AC 処置及び Zeb 処置により変化しなかった。一方、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、DAC 処置及び AC 処置により miR-200c 及び miR-141 の発現量がともに増加した。しかし、SW620/OxR 細胞において、Zeb 処置により miR-200c の発現量のみが増加した (Fig. 30B)。

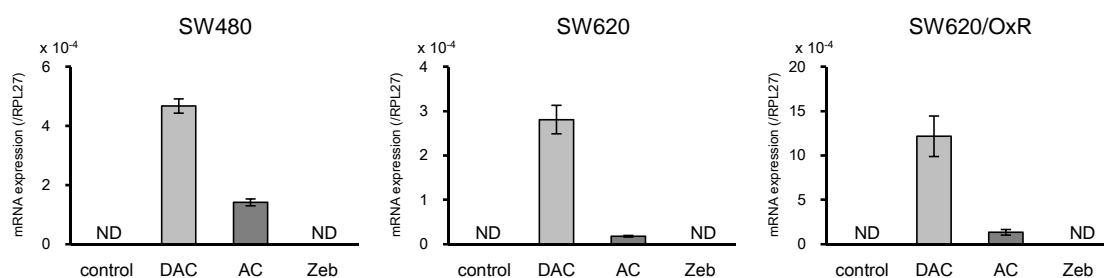


Fig. 29. Effect of DNMT Inhibitors Treatment on mRNA Expression Level of MAGEA1 in CRC Cells

Samples of total RNA from cultured cells after 72-h treatment with 2 μ M DAC, 3 μ M AC, or 150 μ M Zeb were prepared. *MAGEA1* mRNA expression level was detected by real-time PCR analysis and was normalized by *RPL27* mRNA expression level. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. ND: not detected

Table 13. Effect of DNMT Inhibitors Treatment on Invasion Ability of CRC Cells

Cell line	Invasion cells/ High-power field ($\times 200$)			
	Control	DAC	AC	Zeb
SW480	8.3 \pm 0.5	2.9 \pm 0.3 **	6.9 \pm 0.3	5.1 \pm 1.0 *
SW620	61.6 \pm 4.1	41.5 \pm 2.0 **	85.7 \pm 2.9 **	27.5 \pm 1.5 **
SW620/OxR	87.7 \pm 11.1	40.0 \pm 2.8 **	122.7 \pm 9.1 *	30.9 \pm 2.1 **

Cells were treated, and invasion assay was performed. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Dunnett's test, * p < 0.05, ** p < 0.01 significantly different from control cells.).

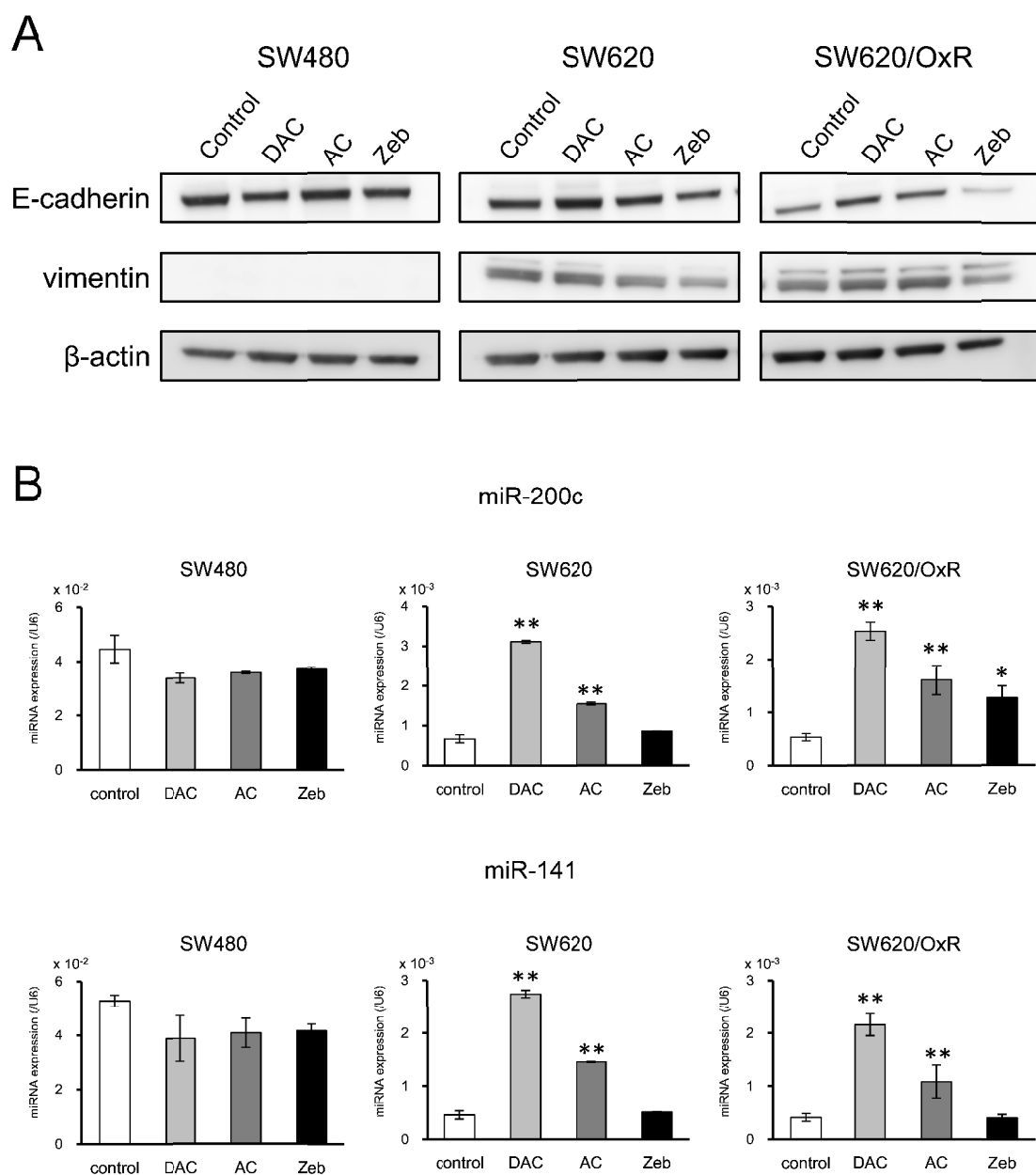


Fig. 30. Effects of DNMT Inhibitors on EMT-related Molecules in CRC Cells

(A) The protein expression levels of E-cadherin and vimentin were detected by western blotting. β -actin was used as a loading control. (B) The intracellular expression levels of miR-200c and miR-141 were detected by real-time RT-PCR and were normalized by U6 snRNA expression level. Samples of protein and RNA from cultured cells after 72-h treatment with 2 μ M DAC, 3 μ M AC, or 150 μ M Zeb were prepared. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Dunnett's test, * p < 0.05, ** p < 0.01 significantly different from control cells.).

第3項 考察

MAGEA1 の mRNA 発現量は、がん細胞株の DNA 全体のメチル化に相関することが報告されている^{70,71)}。Zeb 処置により、変化するものとしては let-7 ファミリーが知られているが⁴²⁾、ほとんどの遺伝子の mRNA 発現量が Zeb 処置で変化しない⁴³⁾。同様に Flothoらは、白血病細胞において同程度の細胞増殖抑制作用を示す DAC 処置や AC 処置と比較して、Zeb 処置により発現量が変化する遺伝子が少なく、DNA 全体のメチル化状況を反映するマーカーも変化しないことを報告した⁴³⁾。したがって、*MAGEA1* の mRNA 発現は、Zeb 処置を行っても検出されなかったことが考えられた。

本検討において、DAC 処置または Zeb 処置により、L-OHP 抵抗性大腸がん細胞を含むヒト大腸がん細胞の浸潤能が抑制された。また、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞における DAC 処置による浸潤能抑制は、第2章で明らかにしたように、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現量が増加することにより誘導されていると考えられた。しかし、Zeb 処置では E-cadherin の発現量の増加を認めなかった。そのため、Zeb 処置では、その他の要因により浸潤能が抑制されたことが示唆された。

DAC を処置した SW480 細胞においても、浸潤能が有意に抑制された。第2章で示したように、DNMT 阻害作用を示さない Ara-C 処置によっても、SW480 細胞の浸潤能は抑制された。さらに、DAC 処置細胞と Ara-C 処置細胞の浸潤能には、有意な差は認めなかった。そのため、この SW480 細胞における DAC による浸潤能の抑制に、DNMT 阻害による DNA の脱メチル化は関与していないと考えられた。

SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、AC 処置により浸潤能が亢進するが (Table 13)、間葉系細胞マーカーの vimentin の発現量が増加しなかった (Fig. 30A)。urokinase plasminogen activator (uPA) は細胞外マトリックスを分解し、浸潤能を亢進することが知られている⁴¹⁾。さらに、前立腺がん細胞において uPA の mRNA 発現量は AC 処置により増加することが報告された⁴¹⁾。そのため、本検討における AC 処置による浸潤能の亢進が、uPA の発現量の増加により誘導される可能性が考えられた。今後さらなるこれらの関連因子の検討が必要と考えられた。

第 2 節 オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞の細胞内及び exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルに及ぼすゼブラリンの影響についての検討

前節の結果より、Zeb 処置による浸潤能の抑制には、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現量の増加は伴っていなかった。そこで、本節では Zeb 処置による浸潤能抑制の要因について let-7 ファミリーに着目し、検討した。

let-7 ファミリーはがん抑制関連 miRNA として、転移や細胞増殖などを亢進する多くの遺伝子に影響を及ぼし、Zeb 処置により発現量が増加することが報告された^{23-28,42)}。さらに、let-7 ファミリーは高浸潤性卵巣がん細胞において、exosome に選択的に移行することが示唆された³⁰⁾。そこで、let-7 ファミリーであり、転移能に影響を及ぼすことが報告されている let-7a、let-7b、let-7c 及び let-7g の細胞内及び exosome 中の発現レベルに及ぼす Zeb 処置の影響について検討した。また、exosome の放出を促進する neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) などの因子が exosome 量だけでなく、個々の exosome 中に含有される miRNA の発現レベルを抑制することが報告されている^{79,80)}。そのため、nSMase2 のタンパク質発現量について比較検討した。

第 1 項 実験材料と方法

1-1 実験材料

Polyclonal rabbit anti-nSMase2 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。

1-2 細胞培養及び薬物処置

本章第 1 節第 1 項 1-2、1-3 と同様の細胞を用い、同様の方法で培養と薬物処置を行った。

1-3 RT-PCR による細胞内 miRNA 発現量の定量

第 1 章第 3 節第 1 項 1-8 と同様の方法で miRNA 発現量を定量した。本検討に用いたプライマーの配列を Table 14 に示す。

Table 14. Real-time RT-PCR Primers for miRNA Expression

miRNA	Sequence (5'-3')
let-7a	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGT
let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT

1-4 超遠心分離法による培地からの exosome 中の RNA の抽出

第2章第3節第1項1-3と同様の方法で exosome 中の RNA を抽出した。

1-5 RT-PCR による exosome 中の miRNA 発現レベルの定量

第2章第3節第1項1-2と同様の方法で exosome 中の miRNA 発現レベルを定量した。本検討に用いたプライマーの配列を Table 14 に示す。各 exosome 中の miRNA 発現レベルは、RNU6 snRNA により標準化した。RNU6 snRNA の発現量は Human RNU6B miScript Primer Assay (QIAGEN, Valencia, CA, USA) をプライマーとして使用し、定量を行った。

1-6 Western blot によるタンパク質発現量の測定

第1章第3節第1項1-5と同様の方法でタンパク質発現量を測定した。

1-7 統計学的処理

データは平均値±標準誤差で表し、2群間の比較検討には Unpaired Student's *t*-test を用いた。相関性は Pearson's correlation test を用い判定した。

第2項 結果

Zeb 処置により、SW480 細胞では細胞内の let-7 ファミリーの発現量は変化しなかった。また、SW620 細胞において細胞内の let-7b 及び let-7c の発現量が、SW620/OxR 細胞において細胞内の let-7b 及び let-7g の発現量が、Zeb 処置によりそれぞれ有意に増加した (Fig. 31A)。

次に、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルについて検討した。SW480 細胞では、SW620 細胞と比較して、Zeb 処置の有無に関わらず exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルは著しく低値だった (Fig. 31B)。一方、SW620 細胞において、exosome 中の let-7b 及び let-7g の発現量が Zeb 処置により有意に減少した (Fig. 31B)。しかし、SW620/OxR 細胞では、高い浸潤能を示すにも関わらず、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルは、SW480 細胞と同様に著しく低値だった (Fig. 30B)。

nSMase2 のタンパク質発現量について比較検討したところ、SW480 細胞と比較して、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、nSMase2 のタンパク質発現量は低レベルであった (Fig. 32)。そして、SW620 細胞と SW620/OxR 細胞の間に顕著な差は認められなかった (Fig. 32)。

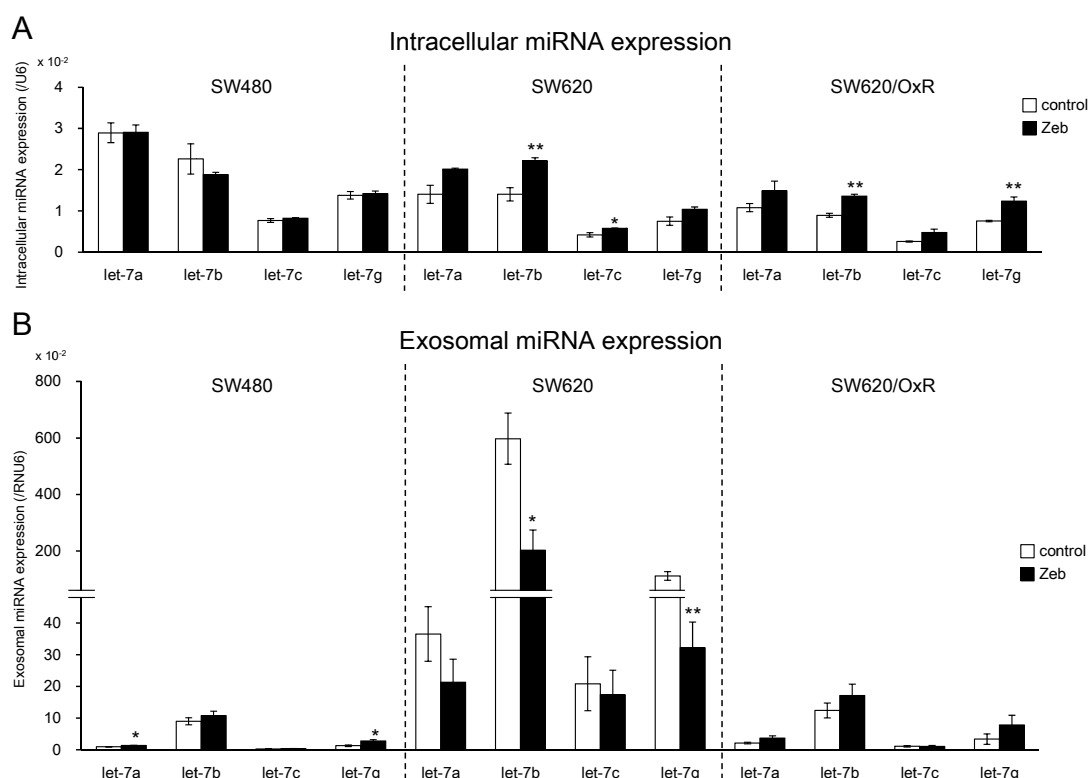


Fig. 31. Effects of Zeb on Intracellular or Exosomal Expression Levels of let-7 Family in CRC Cells

The intracellular (A) or exosomal (B) expression levels of let-7a, let-7b, let-7c, and let-7g were detected by real-time RT-PCR and were normalized by U6 or RNU6 snRNA expression level. Samples of RNA from cultured cells after 72-h treatment with 150 μ M Zeb were prepared. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (Unpaired Student's *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01).

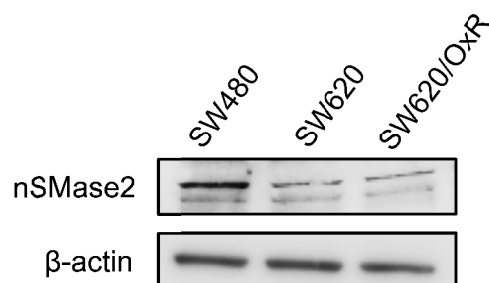


Fig. 32. The Protein Expression Levels of nSMase2 in CRC Cells

The protein expression level of nSMase2 was detected by western blotting. β -actin was used as a loading control.

第3項 考察

SW620 細胞において、Zeb 処置により細胞内の let-7b の発現量は増加したが、exosome 中の let-7b の発現レベルは低下した。この結果から、Zeb 処置により let-7b の exosome への移行が阻害されたため、exosome 中の let-7b の発現レベルの低下したことが示唆された。一方で、SW480 細胞及び SW620/OxR 細胞において、let-7 ファミリーの exosome 中の発現レベルは、SW620 細胞と比較して著しく低値を示した。Kobayashi らは、低浸潤性卵巣がん細胞において、高浸潤性卵巣がん細胞と比べ、細胞内の let-7 ファミリーの発現量は変化しなかったが、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルが低値を示すことを報告した³⁰⁾。その報告と同様に、let-7 ファミリーの exosome 中の発現レベルが低値を示す SW480 細胞の浸潤能は、SW620 細胞と比較して低かった。しかし、SW480 細胞と同様に let-7 ファミリーの exosome 中の発現レベルが低値を示す SW620/OxR 細胞の浸潤能は、SW620 細胞と比較して、高かった。そのため、L-OHP 抵抗性の獲得が exosome を介した細胞外への let-7 ファミリーの移行を阻害することで exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルが低値を示す可能性が示唆された。

Zeb 処置や L-OHP 抵抗性による let-7 ファミリーの exosome 中の発現レベル低下の一因として、exosome 放出の制御因子の変化や、miRNAs の exosome への選択的な移行の阻害が考えられた。近年、nSMase2 などの exosome 放出の制御因子が exosome 中の miRNAs の発現レベルを抑制することが報告されている^{79,80)}。さらに、nSMase2 を阻害する GW4869 を処置することで、L-OHP に対する抵抗性を獲得することも報告された⁸¹⁾。そのため、L-OHP 抵抗性獲得に nSMase2 の発現量が関与する可能性が考えられる。しかし、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、nSMase2 のタンパク質発現量に差は認められなかった。この結果から、SW620/OxR 細胞での L-OHP 抵抗性の獲得は nSMase2 による exosome の放出に影響を与えないことが示唆された。また、nSMase2 以外にも exosome 放出の制御因子として、Rab27a や Rab27b などが知られており⁸²⁻⁸⁴⁾、それらの因子が関与する可能性が考えられた。

miRNAs の exosome への選択的な移行には、いくつかの機序が提唱されている。Villarroya-Beltri らの報告では、miRNAs の exosome への移行が RNA 結合タンパク質の SUMO 化及び miRNA の特定の配列により制御されることが示された⁷³⁾。また、Koppers-Lalic らは miRNA の 3'末端がウラシル化された miRNA もしくは 3'末端にウラシルが存在する miRNA は exosome に移行しやすいことを明らかにしている⁸⁵⁾。let-7 フ

ファミリーは3'末端がウラシルであるため、Zeb 処置や L-OHP 抵抗性による let-7 ファミリーの exosome を介した細胞外への移行の阻害に、3'末端のウラシルが関わる可能性が考えられた。

SW480 細胞において、Zeb 処置により浸潤能が抑制されたが、let-7 ファミリーに有意な変化は認めなかった。しかし、Zeb 処置による浸潤能抑制は DAC 処置時と大きな差はなく、第1節で示した DAC による浸潤能抑制と同様の理由で、この Zeb 処置による浸潤能の抑制に DNMT 阻害作用は関与していないと考えられた。

SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、let-7b の近くにコードされ、let-7b とクラスターを形成する let-7a の発現量は Zeb 処置により増加しなかった。この結果から、Zeb 処置による let-7b の発現量増加には転写制御ではなく、miRNA の成熟や分解における制御が関与する可能性が考えられた。Nishi らは let-7b の発現量が let-7b をコードする DNA のメチル化により制御されることを示した⁸⁶⁾。しかし、今回の結果によると、Zeb 処置による let-7b の発現量増加は let-7b をコードする DNA の転写抑制機構である DNA メチル化によっては制御されていないことが示唆された。また、未成熟の miR-145 の 5'末端のリン酸基がジメチル化されることで成熟経路が阻害され、その発現量が低下することが報告された⁸⁷⁾。その他にも、6種類の miRNA から構成されるクラスターである miR-17~92 の成熟経路において、miR-92 などの一部の miRNA が核内 exosome に取り込まれ、その発現量が低下することが認められている⁸⁸⁾。このような成熟経路での制御が Zeb 処置による let-7b の発現量増加に関与するかを明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

小 括

原発巣由来の大腸がん細胞 (SW480 細胞) 及びそのリンパ節転移巣細胞 (SW620 細胞) 並びにその L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞 (SW620/OxR 細胞) を用い、浸潤能と EMT 関連因子の発現量に及ぼす各種 DNMT 阻害薬の影響について検討した。さらに、細胞内及び exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルに及ぼす Zeb の影響について検討し、以下の結果を得た。

1. SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、Zeb 処置により上皮細胞マーカーである E-cadherin のタンパク質発現量が増加することなく、浸潤能が抑制された。
2. Zeb 処置により、細胞内の let-7b の発現量は、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において有意に増加したが、SW480 細胞ではコントロールと比較して増加は認めなかった。
3. SW620 細胞において、exosome 中の let-7b の発現レベルは Zeb 処置で有意に低下した。そのため、exosome 中の let-7b の発現レベルの低下が浸潤能の抑制を表す指標となる可能性が示唆された。
4. SW480 細胞及び SW620/OxR 細胞において、exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルは Zeb 処置の有無に関わらず SW620 細胞と比較して著しく低値を示した。
5. SW480 細胞と比較して、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞における nSMase2 のタンパク質発現量が低いことを示したが、SW620 細胞と SW620/OxR 細胞の間に顕著な差は認められなかった。

総括

本研究では、新たに著者が作製した L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞を用い、L-OHP 抵抗性獲得や、DNMT 阻害薬の処置による浸潤能の変化を観察し、EMT 関連因子や miRNA の発現量を解析することで、L-OHP 抵抗性獲得や DNMT 阻害薬による浸潤能抑制の一因を明らかにすることを試み、以下の知見を得た。

1) オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における上皮間葉転換の誘導及び miR-200c 及び miR-141 の変化

ヒト大腸がん細胞株 SW620 細胞において、L-OHP に対する抵抗性を獲得する過程で、E-cadherin の発現量低下や vimentin の発現量増加などの EMT の特徴を示した。さらに、L-OHP 抵抗性獲得により、細胞内 miR-200c 及び miR-141 の発現量は低下した。また、SW620 細胞と比較して、miR-200 ファミリーの発現量が著しく高い SW480 細胞では、L-OHP 長期処置により、L-OHP に対する抵抗性を獲得しなかった。

2) オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における浸潤能及び exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルに及ぼすデシタビンの影響

SW620 細胞だけでなく、L-OHP に対する抵抗性を獲得し浸潤能が亢進した SW620/OxR 細胞においても、DAC 処置により浸潤能が抑制され、E-cadherin の発現量は増加した。一方で、SW480 細胞では、DAC 処置により浸潤能は抑制されなかった。また、SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、DAC 処置により exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルは増加した。さらに、exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルが大腸がん細胞の浸潤能と負の相関を示した。

3) オキサリプラチン抵抗性 SW620 細胞における浸潤能と上皮間葉転換関連因子の発現量に及ぼす各種 DNA メチル基転移酵素阻害薬の影響と exosome 中の let-7b の発現レベルに及ぼすゼブラリンの影響

SW620 細胞及び SW620/OxR 細胞において、Zeb 処置により細胞内の let-7b の発現量は増加し、浸潤能は抑制された。また、SW620 細胞において、Zeb 処置により、let-7b の exosome 中の発現レベルは低下した。SW480 細胞及び SW620/OxR 細胞では、SW620 細胞と比較して Zeb 処置の有無に関わらず exosome 中の let-7 ファミリーの発現レベルは、著しく低値を示した。

本研究で、大腸がん細胞が L-OHP 抵抗性を獲得する過程において、miR-200c 及び miR-141 の発現抑制とともに、EMT が誘導され、浸潤能が亢進することを認めた。そして、L-OHP 抵抗性ヒト大腸がん細胞を含むヒト大腸がん細胞の浸潤が、DNMT 阻害薬である DAC 及び Zeb により抑制される可能性を示した。さらに、DAC による exosome 中の miR-200c 及び miR-141 の発現レベルの増加や、Zeb による exosome 中の let-7b の発現レベルの低下が浸潤能の抑制を表す指標となる可能性が示唆された。

これらの本研究による成果は、大腸がんの遠隔転移を抑制し、治療成績を向上させる DNMT 阻害薬を用いた L-OHP 抵抗性を示す大腸がんに対する新たながん化学療法の開発に有用な資料になるものと考えられた。

謝 辞

終わりに鑑み、本研究の論文審査にあたり、貴重な御助言と御高閲を賜りました生化学講座 北川裕之教授、微生物化学講座 小西守周教授、医療薬学講座 力武良行教授に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました薬剤学講座 岩川精吾教授に心より感謝いたします。また、直接の御指導と御助言を賜りました薬剤学講座 上田久美子講師、細川美香助教に謹んで感謝申し上げます。

本研究に対し、終始実験に御協力頂きました米澤武志学士、林 涉学士、渡部恭平学士、松村朱理さん、松原栄美さん、稲田琴美さん、小堀愛夏さんをはじめとする薬剤学講座の諸氏に感謝の意を表します。

最後に、長きにわたり様々な面で支えてくれた家族、友人たちに心より感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 平成 26 年 人口動態統計 上巻 死亡 第 5.17 表 性・年齢別にみた死因順位 (死亡数、死亡率 (人口 10 万対)、割合 (%), 2015 年 9 月.
- 2) 厚生労働省, 平成 26 年 人口動態統計 上巻 死亡 第 5.24 表 悪性新生物の主な部位別にみた性・年次別死亡数及び率(人口 10 万対), 2015 年 9 月.
- 3) 全国がん (成人病) センター協議会編, 生存率共同調査, 2014 年 9 月.
- 4) 大腸癌研究会編, 大腸癌治療ガイドライン 医師用 2014 年版, 2014 年 1 月.
- 5) Sugihara K, Uetake H. Therapeutic strategies for hepatic metastasis of colorectal cancer: overview. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.*, **19**, 523-527 (2012).
- 6) Baba H, Hayashi N, Emi Y, Kakeji Y, Egashira A, Oki E, Shirabe K, Toyama T, Ohga T, Yamamoto M, Hasegawa H, Kohakura F, Higashi H, Niwa K, Fujita F, Ogata Y, Kohnoe S, Inomata M, Samura H, Tokunaga S, Maehara Y; Kyushu Study Group of Clinical Cancer (KSCC). A multicenter phase II clinical study of oxaliplatin, folinic acid, and 5-fluorouracil combination chemotherapy as first-line treatment for advanced colorectal cancer: a Japanese experience. *Surg. Today*, **41**, 1610-1616 (2011).
- 7) エルプラット点滴静注液インタビューフォーム, 株式会社ヤクルト本社, 2013 年 1 月 (第 5 版).
- 8) Liu Z, Qiu M, Tang QL, Liu M, Lang N, Bi F. Establishment and biological characteristics of oxaliplatin-resistant human colon cancer cell lines. *Chin. J. Cancer*, **29**, 661-667 (2010).
- 9) Ceckova M, Vackova Z, Radilova H, Libra A, Buncek M, Staud F. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. *Toxicol. in Vitro*, **22**, 1846-1852 (2008).
- 10) Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 4661-4669 (2004).
- 11) Larson CA, Blair BG, Safaei R, Howell SB. The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol. Pharmacol.*, **75**, 324-330

- (2009).
- 12) Mirakhorli M, Shayanfar N, Rahman SA, Rosli R, Abdullah S, Khoshzaban A. Lack of association between expression of MRP2 and early relapse of colorectal cancer in patients receiving FOLFOX-4 chemotherapy. *Oncol. Lett.*, **4**, 893-897 (2012).
 - 13) Gourdiere I, Del Rio M, Crabbé L, Candeil L, Copois V, Ychou M, Auffray C, Martineau P, Mechti N, Pommier Y, Pau B. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.*, **529**, 232-236 (2002).
 - 14) Seetharam RN, Sood A, Basu-Mallick A, Augenlicht LH, Mariadason JM, Goel S. Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells. *Anticancer Res.*, **30**, 2531-2538 (2010).
 - 15) Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 84-89 (2000).
 - 16) Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 2375-2385 (2005).
 - 17) Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, Ellis LM. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 4147-4153 (2006).
 - 18) Pühr M, Hoefler J, Schäfer G, Erb HH, Oh SJ, Klocker H, Heidegger I, Neuwirt H, Culig Z. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. *Am. J. Pathol.*, **181**, 2188-2201 (2012).
 - 19) Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.*, **22**, 894-907 (2008).
 - 20) Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.*, **10**, 593-601 (2008).
 - 21) Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal

- transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.*, **283**, 14910-14914 (2008).
- 22) Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.*, **9**, 582-589 (2008).
- 23) Wu A, Wu K, Li J, Mo Y, Lin Y, Wang Y, Shen X, Li S, Li L, Yang Z. Let-7a inhibits migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting HMGA2 in nasopharyngeal carcinoma. *J. Transl. Med.*, **13**, 105 (2015).
- 24) Chen KJ, Hou Y, Wang K, Li J, Xia Y, Yang XY, Lv G, Xing XL, Shen F. Reexpression of Let-7g microRNA inhibits the proliferation and migration via K-Ras/HMGA2/snail axis in hepatocellular carcinoma. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 742417 (2014).
- 25) Kang W, Tong JH, Lung RW, Dong Y, Yang W, Pan Y, Lau KM, Yu J, Cheng AS, To KF. let-7b/g silencing activates AKT signaling to promote gastric carcinogenesis. *J. Transl. Med.*, **12**, 281 (2014).
- 26) Hu X, Guo J, Zheng L, Li C, Zheng TM, Tanyi JL, Liang S, Benedetto C, Mitidieri M, Katsaros D, Zhao X, Zhang Y, Huang Q, Zhang L. The heterochronic microRNA let-7 inhibits cell motility by regulating the genes in the actin cytoskeleton pathway in breast cancer. *Mol. Cancer Res.*, **11**, 240-250 (2013).
- 27) Han HB, Gu J, Zuo HJ, Chen ZG, Zhao W, Li M, Ji DB, Lu YY, Zhang ZQ. Let-7c functions as a metastasis suppressor by targeting MMP11 and PBX3 in colorectal cancer. *J. Pathol.*, **226**, 544-555 (2012).
- 28) Qian P, Zuo Z, Wu Z, Meng X, Li G, Wu Z, Zhang W, Tan S, Pandey V, Yao Y, Wang P, Zhao L, Wang J, Wu Q, Song E, Lobie PE, Yin Z, Zhu T. Pivotal role of reduced let-7g expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, **71**, 6463-6474 (2011).
- 29) Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One*, **9**, e92921 (2014).
- 30) Kobayashi M, Salomon C, Tapia J, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE. Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of let-7 miRNA and

- miR-200. *J. Transl. Med.*, **12**, 4 (2014).
- 31) Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, Boque R, Silva P, Carneiro F, Esteller M. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene*, **31**, 2062-2074 (2012).
- 32) Vrba L, Jensen TJ, Garbe JC, Heimark RL, Cress AE, Dickinson S, Stampfer MR, Futscher BW. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS One*, **5**, e8697 (2010).
- 33) Arimany-Nardi C, Errasti-Murugarren E, Minuesa G, Martinez-Picado J, Gorboulev V, Koepsell H, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporters and human organic cation transporter 1 determine the cellular handling of DNA-methyltransferase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 3868-3880 (2014).
- 34) Shin DY, Kim GY, Kim CG, Kim WJ, Kang HS, Choi YH. Anti-invasive effects of decitabine, a DNA methyltransferase inhibitor, through tightening of tight junctions and inhibition of matrix metalloproteinase activities in AGS human gastric carcinoma cells. *Oncol. Rep.*, **28**, 1043-1050 (2012).
- 35) Peng DF, Hu TL, Schneider BG, Chen Z, Xu ZK, El-Rifai W. Silencing of glutathione peroxidase 3 through DNA hypermethylation is associated with lymph node metastasis in gastric carcinomas. *PLoS One*, **7**, e46214 (2012).
- 36) Chik F, Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis*, **32**, 224-232 (2011).
- 37) Ari F, Napieralski R, Ulukaya E, Dere E, Colling C, Honert K, Krüger A, Kiechle M, Schmitt M. Modulation of protein expression levels and DNA methylation status of breast cancer metastasis genes by anthracycline-based chemotherapy and the demethylating agent decitabine. *Cell Biochem. Funct.*, **29**, 651-659 (2011).
- 38) Andersen JB, Factor VM, Marquardt JU, Raggi C, Lee YH, Seo D, Conner EA, Thorgeirsson SS. An integrated genomic and epigenomic approach predicts therapeutic response to zebularine in human liver cancer. *Sci. Transl. Med.*, **2**, 54ra77 (2010).
- 39) Lin J, Lai M, Huang Q, Ruan W, Ma Y, Cui J. Reactivation of IGFBP7 by DNA demethylation inhibits human colon cancer cell growth in vitro. *Cancer Biol. Ther.*, **7**,

- 1896-1900 (2008).
- 40) Cho CY, Wang JH, Chang HC, Chang CK, Hung WC. Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells. *J. Cell Physiol.*, **213**, 65-69 (2007).
- 41) Pakneshan P, Xing RH, Rabbani SA. Methylation status of uPA promoter as a molecular mechanism regulating prostate cancer invasion and growth in vitro and in vivo. *FASEB J.*, **17**, 1081-1088 (2003).
- 42) Wong TS, Man OY, Tsang CM, Tsao SW, Tsang RK, Chan JY, Ho WK, Wei WI, To VS. MicroRNA let-7 suppresses nasopharyngeal carcinoma cells proliferation through downregulating c-Myc expression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **137**, 415-422 (2011).
- 43) Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, Plass C, Niemeyer CM, Lübbert M. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*, **23**, 1019-1028 (2009).
- 44) Thuringer D, Berthenet K, Cronier L, Solary E, Garrido C. Primary tumor- and metastasis-derived colon cancer cells differently modulate connexin expression and function in human capillary endothelial cells. *Oncotarget*, **6**, 28800-28815 (2015).
- 45) Maamer-Azzabi A, Ndozangue-Touriguine O, Bréard J. Metastatic SW620 colon cancer cells are primed for death when detached and can be sensitized to anoikis by the BH3-mimetic ABT-737. *Cell Death Dis.*, **4**, e801 (2013).
- 46) Chen ML, Liang LS, Wang XK. miR-200c inhibits invasion and migration in human colon cancer cells SW480/620 by targeting ZEB1. *Clin. Exp. Metastasis*, **29**, 457-469 (2012).
- 47) Mashita N, Yamada S, Nakayama G, Tanaka C, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Fujii T, Sugimoto H, Koike M, Nomoto S, Fujiwara M, Kodera Y. Epithelial to mesenchymal transition might be induced via CD44 isoform switching in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.*, **110**, 745-751 (2014).
- 48) Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H, Saya H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth.

- Cancer Cell*, **19**, 387-400 (2011).
- 49) Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.*, **2**, e179 (2011).
- 50) Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **69**, 5820-5828 (2009).
- 51) Fan F, Samuel S, Evans KW, Lu J, Xia L, Zhou Y, Sceusi E, Tozzi F, Ye XC, Mani SA, Ellis LM. Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.*, **1**, 5-16 (2012).
- 52) Chen J, Tian W, Cai H, He H, Deng Y. Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. *Med. Oncol.*, **29**, 2527-2534 (2012).
- 53) Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.*, **36**, 4562-4569 (1976).
- 54) Takano M, Otani Y, Tanda M, Kawami M, Nagai J, Yumoto R. Paclitaxel-resistance conferred by altered expression of efflux and influx transporters for paclitaxel in the human hepatoma cell line, HepG2. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 418-427 (2009).
- 55) Kakumoto M, Takara K, Sakaeda T, Tanigawara Y, Kita T, Okumura K. MDR1-mediated interaction of digoxin with antiarrhythmic or antianginal drugs. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1604-1607 (2002).
- 56) de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One*, **2**, e898 (2007).
- 57) Morelli MP, Brown AM, Pitts TM, Tentler JJ, Ciardiello F, Ryan A, Jürgensmeier JM, Eckhardt SG. Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 with cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 2546-2558 (2009).
- 58) Hsu DS, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Chang SY, Tsai TL, Chang CC, Tzeng CH, Wu KJ, Kao JY, Yang MH. Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail

- contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 4561-4571 (2010).
- 59) Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, Sarkar FH. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist. Updat.*, **13**, 109-118 (2010).
- 60) Zhou Y, Wan G, Spizzo R, Ivan C, Mathur R, Hu X, Ye X, Lu J, Fan F, Xia L, Calin GA, Ellis LM, Lu X. miR-203 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by negatively regulating ATM kinase. *Mol. Oncol.*, **8**, 83-92 (2014).
- 61) Ren JZ, Huo JR. Effect of 5-aza-CdR on expression and methylation of E-cadherin gene in human colon carcinoma cells. *Chin. J. Cancer*, **29**, 38-42 (2010).
- 62) Negrotto S, Hu Z, Alcazar O, Ng KP, Triozzi P, Lindner D, Rini B, Sauntharajah Y. Noncytotoxic differentiation treatment of renal cell cancer. *Cancer Res.*, **71**, 1431-1441 (2011).
- 63) Tang JT, Wang JL, Du W, Hong J, Zhao SL, Wang YC, Xiong H, Chen HM, Fang JY. MicroRNA 345, a methylation-sensitive microRNA is involved in cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, **32**, 1207-1215 (2011).
- 64) Li CL, Nie H, Wang M, Su LP, Li JF, Yu YY, Yan M, Qu QL, Zhu ZG, Liu BY. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncol. Rep.*, **27**, 1960-1966 (2012).
- 65) Xiao WH, Sanren GW, Zhu JH, Li QW, Kang HR, Wang RL, Song LP, Ye M. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma. *World J. Gastroenterol.*, **16**, 2371-2377 (2010).
- 66) Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, Hemmi H, Koi M, Boland CR, Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*, **62**, 1315-1326 (2013).
- 67) Ling ZQ, Li P, Ge MH, Zhao X, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, Mao WM. Hypermethylation-modulated down-regulation of CDH1 expression contributes to the progression of esophageal cancer. *Int. J. Mol. Med.*, **27**, 625-635 (2011).
- 68) Soldevilla B, Rodríguez M, San Millán C, García V, Fernández-Periañez R, Gil-Calderón B, Martín P, García-Grande A, Silva J, Bonilla F, Domínguez G. Tumor-derived exosomes are

- enriched in $\Delta Np73$, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 467-478 (2014).
- 69) Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, **66**, 2794-2800 (2006).
- 70) De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 7149-7153 (1996).
- 71) Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **4**, 339-349 (2006).
- 72) Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One*, **5**, e13247 (2010).
- 73) Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.*, **4**, 2980 (2013).
- 74) Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, Harris CC, Chen K, Hamilton SR, Zhang W. Circulating plasma miR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One*, **6**, e17745 (2011).
- 75) Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann. Surg.*, **259**, 735-743 (2014).
- 76) Russo F, Di Bella S, Nigita G, Macca V, Laganà A, Giugno R, Pulvirenti A, Ferro A. miRandola: extracellular circulating microRNAs database. *PLoS One*, **7**, e47786 (2012).
- 77) ビダーザ注射用インタビューフォーム, 日本新薬株式会社, 2012年6月(第3版).
- 78) McCormack JJ, Marquez VE, Liu PS, Vistica DT, Driscoll JS. Inhibition of cytidine deaminase by 2-oxopyrimidine riboside and related compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **29**,

- 830-832 (1980).
- 79) Kubota S, Chiba M, Watanabe M, Sakamoto M, Watanabe N. Secretion of small/microRNAs including miR-638 into extracellular spaces by sphingomyelin phosphodiesterase 3. *Oncol. Rep.*, **33**, 67-73 (2015).
- 80) Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J. Biol. Chem.*, **288**, 10849-10859 (2013).
- 81) Nemoto S, Nakamura M, Osawa Y, Kono S, Itoh Y, Okano Y, Murate T, Hara A, Ueda H, Nozawa Y, Banno Y. Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and Akt activation. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10422-10432 (2009).
- 82) Ostenfeld MS, Jeppesen DK, Laurberg JR, Boysen AT, Bramsen JB, Primdal-Bengtson B, Hendrix A, Lamy P, Dagnaes-Hansen F, Rasmussen MH, Bui KH, Fristrup N, Christensen EI, Nordentoft I, Morth JP, Jensen JB, Pedersen JS, Beck M, Theodorescu D, Borre M, Howard KA, Dyrskjöt L, Ørntoft TF. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res.*, **74**, 5758-5771 (2014).
- 83) Li W, Hu Y, Jiang T, Han Y, Han G, Chen J, Li X. Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS*, **122**, 1080-1087 (2014).
- 84) Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 19-30 (2010).
- 85) Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MA, Sadek P, Sie D, Zini N, Middeldorp JM, Ylstra B, de Menezes RX, Würdinger T, Meijer GA, Pegtel DM. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.*, **8**, 1649-1658 (2014).
- 86) Nishi M, Eguchi-Ishimae M, Wu Z, Gao W, Iwabuki H, Kawakami S, Tauchi H, Inukai T, Sugita K, Hamasaki Y, Ishii E, Eguchi M. Suppression of the let-7b microRNA pathway by

- DNA hypermethylation. *Leukemia*, **27**, 389-397 (2013).
- 87) Xhemalce B, Robson SC, Kouzarides T. Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. *Cell*, **151**, 278-288 (2012).
- 88) Chaulk SG, Thede GL, Kent OA, Xu Z, Gesner EM, Veldhoen RA, Khanna SK, Goping IS, MacMillan AM, Mendell JT, Young HS, Fahlman RP, Glover JN. Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol.*, **8**, 1105-1114 (2011).