

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08083

研究課題名(和文)リン酸化シグナル応答性miRNAを用いた受容体型チロシンキナーゼ阻害薬の効果予測

研究課題名(英文) Prediction of the phosphorylation signal response of receptor-type tyrosine kinase (RTK) inhibitors using miRNA as a biomarker.

研究代表者

鈴木 俊宏 (Suzuki, Toshihiro)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80322527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、miRNAを指標とした受容体型チロシンキナーゼ(RTK)阻害剤の効果予測を目的として行った。ゲフィニブ耐性肺がん細胞株でmiR-205の発現が高く、それが、リン酸化シグナルによる可能性を明らかにし、それをレポーターとした評価系でキナーゼ阻害剤による影響を検討した。RTK阻害薬による抑制の検討では、予想以上にバイパスシグナルの影響が大きく、抑制が認められなかった。そこで、Akt、ERK等、よりシグナル伝達の下流を直接阻害したところ、ある種の阻害剤でmiR205の発現が抑制され、シグナル伝達をmiRNAで評価しうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study was performed that predicting the effect of receptor type tyrosine kinase (RTK) inhibitors with miRNA as a biomarker. We found that miR-205 was overexpressed in Gefinitib-resistant lung cancer cell lines with MET amplification. The reporter assay system was developed for kinase signal prediction in gefitinib resistant lung cancer cell lines. This screening system revealed that miR-205 expression was down regulated by p13K Akt inhibitors. In conclusion, clarified the possibility of phosphorylation signal as a regulator of the miRNA expression.

研究分野：医療薬学

キーワード：miRNA RTK阻害薬 キナーゼシグナル

1. 研究開始当初の背景

当時、マイクロ RNA (miRNA) が次々と見出され、多様な役割が脚光をあびてきていた。特に、血漿中にがん組織から漏れ出した miRNA が見出されたことから、がんのバイオマーカーとして発がんや、病気の状態との関係を明らかにする研究が盛んになりつつあった。申請者はこれまでに、シスプラチン耐性細胞において高発現している miRNA を見出し、また、miRNA の生合成機構を破綻させるとシスプラチン耐性が克服できることを見いだした (Pouliot LM, Shen DW, Suzuki T, Hall MD, Gottesman MM., Exp Cell Res., 15, 319(4), 566-74, 2013)。本研究では、近年開発が盛んな分子標的薬の感受性評価として miRNA に着目し、バイオマーカーの可能性とその調節機構の解明を試みることにした。

今後、リン酸化シグナルをターゲットとした分子標的治療薬の開発は益々進むと思われることから、miRNA を指標とした評価系の構築は基礎研究から、臨床におけるコンパニオン診断に至るまで有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR-TKI の感受性を評価する miRNA を探索し、どのようなリン酸化シグナルによって調節を受けるのか検討を行うこととした。さらに、リン酸化シグナルで制御を受ける miRNA は、これまでバイオマーカーとして検討されてきた miRNA よりもより鋭敏にリン酸化シグナルの状態を反映するのではないかと考え、リン酸化シグナルにより制御される miRNA を指標として、がん分子標的治療薬の重要な薬剤である RTK 阻害薬の効果予測を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) miRNA 発現解析

耐性細胞における miRNA 発現レベルは、非小細胞肺癌細胞 PC-9 と、そのゲフィチニ

ブ耐性細胞、PC-9/MET200 及び PC-9/MET1000 を常法に従って培養し、miRNeasy を用いて RNA を抽出した。3D-Gene マイクロアレイ法及び TaqMan プローブによるリアルタイム PCR 法を用いてゲフィチニブ耐性細胞株で高発現している miRNA を同定した。

(2) miRNA 及びターゲット分子の抑制
miRNA とターゲットとの関連については、siRNA 及び miRNA のインヒビターを用い、抑制時の miRNA 発現をリアルタイム PCR 法で、ターゲットの mRNA はリアルタイム PCR 法で、タンパク質発現はウエスタンブロット法で解析した。

(3) リン酸化シグナルの解析

各種条件下における、リン酸化シグナルの状態は抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

(4) キナーゼ阻害剤を暴露した際の miR205 活性の測定

miR-205 の生物学的活性、すなわち、3' -UTR に対する抑制効果は、miR-205 に対する応答配列を組み込んだレポーターベクターを用いたデュアルルシフェラーゼアッセイ法で評価した。

4. 研究成果

(1) ゲフィチニブ耐性細胞における高発現 miRNA の同定

肺癌化学療法において重要な分子標的治療薬であるゲフィチニブに対する耐性株を用いた検討から、2種類のゲフィチニブ耐性

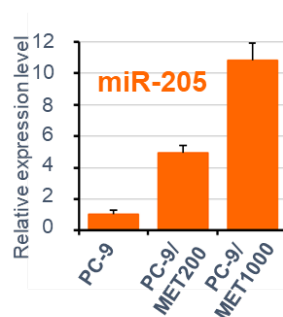


図1 ゲフィチニブ耐性細胞におけるmiR-205の発現

株において miR-205 の発現が亢進していることを見いだした(図1)。しかしながら、これらの耐性株では、miR-205 の標

的分子である ErbB-3 の発現が亢進していた (図2)。これは、従来知られている miRNA による標的分子の発現抑制機構とは矛盾しているものであったことから、従来知られている miRNA による負の制御とは異なることが推測された。

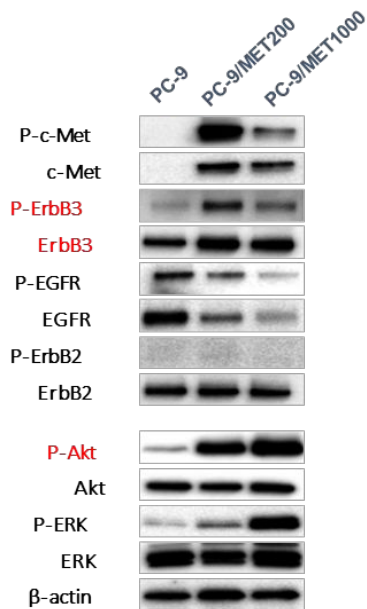


図2 耐性細胞における各種タンパク質のリン酸化状態

(2) miR-205 の発現変化に関わる因子の探索

ErbB-3を抑制することによりmiR-205の発現が低下することを見いだした(図3)。

さらに、この調節がタンパク質自身ではなく、リン酸化シグナルによるものであると考え、RTK 阻害薬であるゲフィチニブと、本研

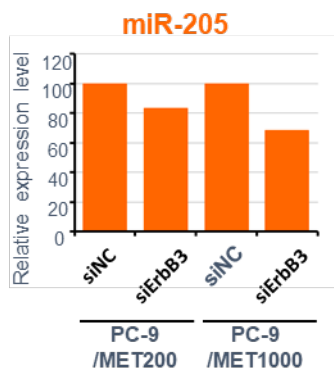


図3 ErbB3抑制時におけるmiR-205の発現

究に用いた耐性株がMETの増幅であることから、MET阻害剤であるフォレチニブを暴露し

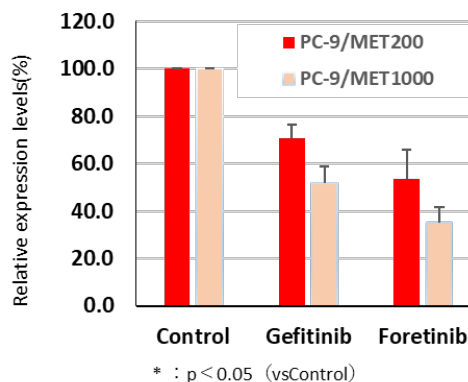


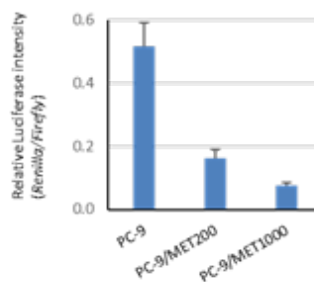
図4 RTK阻害薬によるmiR-205発現の抑制

て検討を行った。その結果、ゲフィチニブよりもフォレチニブで、PC-9/MET200よりもPC-9/MET1000でよりmiR-205の発現が抑制され(図4)、感受性を評価することが示唆された。

(3) レポーターアッセイを用いたキナーゼ阻害剤によるmiR205発現レベルの評価

各種キナーゼ阻害剤による影響を評価するため、miR-205 応答配列を組み込んだレポーターアッセイを用いて、各種

A) Basal biological activity of miR-205



B) Effect of miR-205 silencing for biological activity

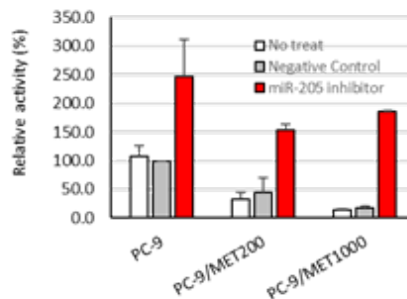


図5 レポーターアッセイによるmiR-205活性の評価

A) 耐性株との比較

B) miR-205インヒビターによる影響の評価

キナーゼ阻害剤曝露時の評価を行うこととした。まず、ベーサルの活性を評価したところ、リアルタイムPCRと逆相関が認められ、miR-205 インヒビターによる阻害で大きなルシフェラーゼの誘導が起こったことから、この評価系が機能していると判断した(図5)。

そこで、miR-205のターゲットであるErbB3と、この耐性株で高発現しているMETをsiRNAで抑制したところ、ErbB3よりもMETでルシフェラーゼの誘導が起こったことから、これまで仮説として考えていたようにキナーゼのシグナルによって、miR-205が誘導されているのではないかと考えた(図6)。

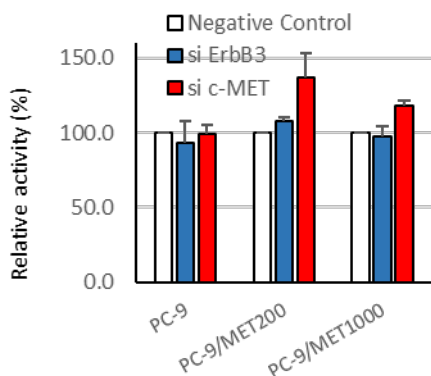


図6 MET抑制によるmiR-205の上昇

さらに、ゲフィチニブ、フォレチニブあるいは同時曝露による検討からも、フォレチニブの影響が若干ではあるが、大きかった(図7)。

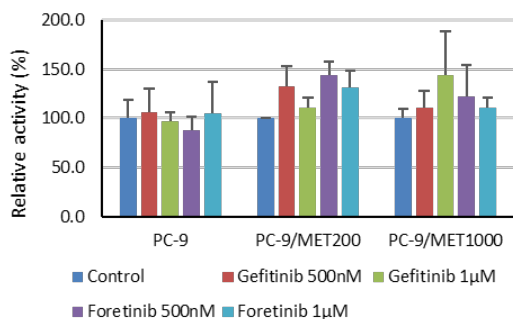


図7 MET阻害剤によるmiR-205の上昇

そこで、どのシグナルがmiR-205の発現をコントロールしているのか、各種キナーゼ阻害剤曝露によって、どのように影響するか検

討を行った。その結果 p13、Akt 経路を阻害する阻害剤(BE2235, MK2260)の曝露で変化が認められた(図8)。

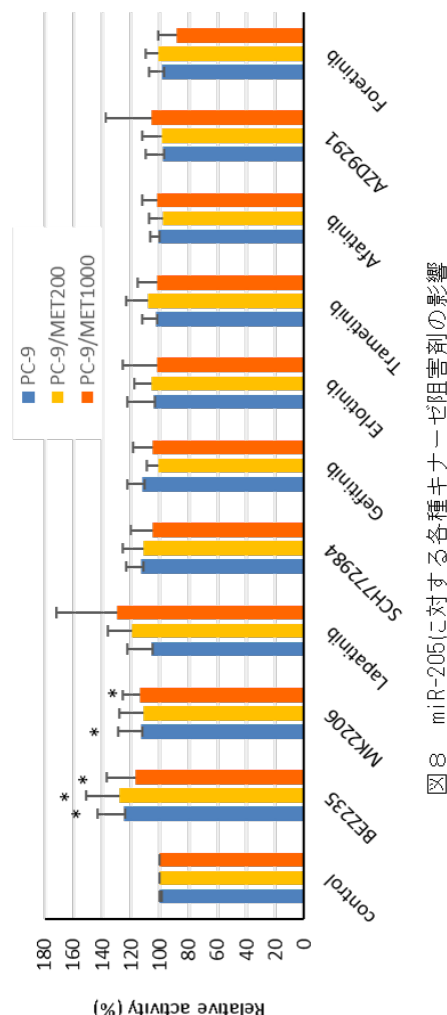


図8 miR-205に対する各種キナーゼ阻害剤の影響

しかしながら本耐性株では、バイパスシグナルの影響が大きく、siRNAによる抑制では残存したシグナルが下流にシグナルを伝達することや、抑制したシグナル以外の影響も認められた。また、リン酸化シグナルの変化はレスポンスも早く、影響をある一定時間以上反映しないことから評価のタイミングが難しく、バイオマーカーとして利用するのは簡単ではないと判断した。しかしながら、基礎研究における評価系としては興味深く、今後は、この調節機構を明らかにし、さらに臨床で用いられているRTK阻害薬の薬剤感受性との関係について明確にすることで、臨床への寄与が期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Toyoshima R, Mori N, Suzuki T, Lowtangkitcharoen W, Suwanborirux K, Saito N, Chemistry of Ecteinascidins. Part 5: An Additional Proof of Cytotoxicity Evaluation of Ecteinascidin 770 Derivatives, *Chem Pharm Bull.*, **64**, 966-969, 2016, DOI: 10.1248/cpb.c16-00192.

Yokoya M, Toyoshima R, Suzuki T, Le VH, Williams RM, Saito N, Stereoselective Total Synthesis of (-)-Renieramycin T, *J Org Chem.*, **81**, 2016, 4039-4047, DOI: 10.1021/acs.joc.6b00327.

Suzuki T, Ishibashi K, Yumoto A, Nishio K, Ogasawara Y. **Utilization of arsenic trioxide as a treatment of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer PC-9/CDDP and PC-14/CDDP cells**, *Oncol Lett.*, **10(2)**, 2015, 805-809, 0.3892/ol.2015.3352

[学会発表](計4件)

Suzuki T, Ito R, Yamaoka T, Ohmori T, Nishio K, Ogasawara Y, **Tyrosine kinase inhibitor resistance were decreased in spheroid culture platform**: The 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2017/4

伊東里紗、鈴木俊宏、山岡利光、大森 亨、西尾和人、小笠原裕樹、**3次元培養法を用いた抗がん剤に対する薬剤耐性の評価**: 2017年度生命科学系合同年次大会、第90回日本生化学会大会、2017/12

Suzuki T, Nagasawa I, Yamaoka T, Ohmori T, Nishio K, Koyama K, Ogasawara Y, **The effect of kinase signaling for miR-205 regulation in gefitinib-resistant lung cancer cell lines**: The 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2016/4

鈴木俊宏、永澤生久子、山岡利光、大森亨、西尾和人^b、小山清隆、小笠原裕樹、**miR-205発現制御におけるErbB3リン酸化の影響**: 第74回日本癌学会学術総会、2015/10

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 俊宏 (SUZUKI Toshihiro)
明治薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80322527