

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10084

研究課題名(和文) マイクロRNAによる食道癌の抗がん剤感受性予測システムの確立

研究課題名(英文) Chemosensitivity and microRNA signature in esophageal cancer

研究代表者

齋木 由利子 (Saiki, Yuriko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80311223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：6種類の食道癌細胞株にタキサンを長期間投与し、5種類のタキサン耐性株を樹立した。これらの細胞株よりRNAを抽出し、網羅的発現解析を行い、タキサン耐性株にABCB1が高発現していることを明らかにした。マイクロRNAの網羅的解析を行い、優位に変化しているマイクロRNAを同定したが、ABCB1をターゲットとするものは含まれていなかった。ABCB1高発現には、遺伝子増幅とDNAの脱メチル化が関与していた。頭頸部がん患者の血清に、がん特異的なマイクロRNAを検出した。19種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株についてPD-L1タンパク発現とmiR-34a発現量の定量を行ったところ、負の相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：We established taxane resistant esophageal cancer cell lines and explored possible mechanisms for the acquisition of chemoresistance. We found that the ABCB1 gene encoding a member of the ATP binding cassette (ABC) transporter proteins was significantly upregulated in taxane resistant esophageal cancer cell lines. Moreover, ABCB1 amplification was found in taxane resistant cells. In addition, after treatment with 5-Aza and/or TSA in parental TE1 cell line, ABCB1 was upregulated; epigenetic mechanism may be involved. Analyses of CpG islands within the downstream promoter demonstrated that taxane resistant cells showed unmethylated CGI whereas parental cells were dominantly methylated. In conclusion, ABCB1 gene amplification alongside with alteration in epigenetic mechanism could be responsible for acquisition of taxane resistance in esophageal cancer cells.

研究分野：分子病理学

キーワード：esophageal cancer microRNA chemosensitivity ABCB1

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は代表的な non-coding RNA であり、RISC(RNA induced silencing complex) とともにメッセンジャー RNA に結合し、メッセンジャー RNA から蛋白への翻訳を制御する。近年、発癌や発生などさまざまな生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。申請者らはシスプラチン耐性におけるマイクロ RNA の役割を明らかにするために、頭頸部の 10 種類の扁平上皮癌細胞株から樹立したシスプラチン耐性株 (Ogawa T et al. Eur Arch Otolaryngol. 2010 業績欄参照) を用いて、網羅的なマイクロ RNA 発現解析を行い、シスプラチン耐性株における著しい miR-34a の発現低下を見いだした。この miR-34a の臨床的な意義を明らかにするために、頭頸部がんのシスプラチン動注前の生検サンプル (凍結サンプル) を用いて miR-34a の発現を定量し、高発現群と低発現群に分けて検討した。両群には年齢、性別、Stage などに差異はなかったが、miR-34a 高発現群は、疾患特異的生存率 ( $P=0.0015$ )、無病生存率 ( $P=0.0019$ )、局所制御率 ( $P=0.017$ ) において、有為に良好であり、miR-34a はシスプラチン感受性予測マイクロ RNA であることを報告した (Ogawa T et al. Cancer Sci. 2012)。我々の研究グループ以外でも、マイクロ RNA と薬剤耐性の関係が複数報告されている。例をあげると、ワシントン大学のグループは、乳がん細胞株において、miR-634 を過剰発現させることにより、BRCA1 の発現が低下し、UV およびシスプラチンに対する感受性が増すことを報告している (Tan X. et al. Breast Cancer Res. 16:435, 2014)。北海道大学のグループは、miR-31 がパクリタキセル耐性の卵巣がん耐性株において発現が減少しており、その結果、ターゲットである MET の発現が増加し、耐性を獲得することを明らかにした。さらに卵巣がんの臨床検体を検討し、miR-31 の低発現は、パクリタキセル耐性や不良な予後と有為に相関することを報告した (Oncogenesis (2013) 2, e40; doi:10.1038/oncsis.)。

このように、マイクロ RNA は抗癌剤にたいする予測因子としての役割が注目されつつある一方で、近年、血液中のエクソソームに、マイクロ RNA が含有されていることが判明し、がんの有望なバイオマーカーになることが期待されている。すなわち、薬剤感受性予測マイクロ RNA を同定し、循環血液中のがん特異的エクソソームを解析することによって、簡便かつ低侵襲ながん診断法につながり、加えて、個別化医療が可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

食道がんの術前治療や進行・再発症例に対しては、5-FU 系薬剤やシスプラチンの他に、タキサン系薬剤が用いられている。治療前に薬剤の感受性の予測ができれば、薬剤をうま

く選択することによる治療効果や副作用軽減などの有用な情報が得られるが、現在のところコンセンサスの得られた効果予測因子はない。申請者らは、以前の研究で、腫瘍細胞のマイクロ RNA に着目して網羅的に解析した結果、頭頸部がんのシスプラチン効果予測因子として miR-34a を見いだした。本研究では、食道がんを対象をひろげる。タキサン耐性食道癌細胞株を樹立し網羅的解析を行い、タキサン耐性獲得機序を解明する。さらに、タキサン耐性獲得におけるマイクロ RNA の役割を明らかにしたい。さらにマイクロ RNA による抗がん剤選択薬剤感受性予測システムの実用化をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) 食道がん細胞株を用いてタキサン系薬剤に対する耐性株の樹立を行う。具体的には、食道癌細胞株に IC50 に相当するパクリタキセルあるいはドセタキセルを投与し、漸増する。

(2) (1) で樹立した抗がん剤耐性株に対する網羅的発現解析 (マイクロ RNA, メッセンジャー RNA) を行い、耐性獲得機序の解明とともに、抗がん剤感受性関連マイクロ RNA を特定する。

(3) 抽出したマイクロ RNA に関して、耐性獲得機序における役割を検討する。

(4) 頭頸部がんに関しては、申請者らはシスプラチン感受性予測マイクロ RNA として、miR-34a を同定したが、近年腫瘍抑制因子としての役割が注目されてきており、PD-L1 が target であることがわかってきた。細胞株を用いて、PD-L1 と miR34a の関係を明らかにする。また、臨床症例を用いて、PD-L1 と miR-34a の関連を検討する。

(5) miR-34a のバイオマーカーとしての役割を明らかにするために血清を用いた検討をすすめる。すでに予備実験として、収集した頭頸部がん患者血清 (0.5cc) から、MirVana miRNA Isolation kit (Ambion) を用いてマイクロ RNA を抽出し、miR-34a と、コントロールとして用いた miR-16 の検出を行い、定量に成功している。腫瘍サンプルと血清をセットで採取し、保存する。同一患者の腫瘍の miR-34a の定量を行い、腫瘍の発現量と血清中の miR-34a のコピー数との相関を確かめる。相関が確認できたら、血清 miR-34a 量と患者の治療への応答性や予後との相関を検討し、マーカーとしての有用性を確立する。

## 4. 研究成果

(1) 6 種類の食道癌細胞株に対しパクリタキセルあるいはドセタキセルを漸増しながら、長期間投与し、タキサン耐性株の樹立を試みた。1 ヶ月ドラッグフリーの状態で培養した後、耐性のタキサン耐性獲得の確認を行った。その結果 3 種類の親株 (TE1, TE2, TE15) から 5 種類のタキサン耐性株 (RTE1P, RTE1D, RTE2D, RTE15P, RTE15D) を樹立することができた (R は resistant, P はパクリタ

キセル、Dはドセタキセルを示す)。  
(2) 親株(TE1)とタキサン耐性株(RTE1P)より RNA を抽出し、Agilent のマイクロアレイにより網羅的発現解析を行い、著明に増加あるいは、減少している遺伝子群を同定した。RTE1P で最も顕著に増加していた遺伝子として *ABCB1* が抽出された。定量 RT-PCR と Western blotting を行い、RTE1P における *ABCB1* 高発現を確認した。他の 4 種類のタキサン耐性株、RTE1D, RTE2D, RTE15P, RTE15D すべてにおいて、*ABCB1* は高発現していた。タキサン耐性株、RTE1P、RTE1D、RTE2D に対して、siRNA を用いて *ABCB1* のノックダウンを行ったところ、すべての細胞株においてタキサンの感受性が失われた。さらに、タキサン耐性関連マイクロ RNA を同定するために、親株(TE1)とタキサン耐性株(RTE1P)より MirVana miRNA Isolation kit(Ambion)を用いてマイクロ RNA を抽出し、Agilent のマイクロアレイにより網羅的解析を行った。GeneSpring software を用いて、T Test (unpaired)により、有為に変化しているマイクロ RNA 9 種類 (miR-146b-5p, miR-32, miR-362-3p, miR-503, miR-517a, miR-517c, miR-521, miR-9, miR-99a) をタキサン耐性関連マイクロ RNA として同定した。  
(3) (2) で同定したマイクロ RNA には、残念ながら *ABCB1* の発現を直接制御するものが含まれていなかった。しかしながら、間接的に制御する可能性は否定できていない。耐性を獲得した原因か、結果、あるいは偶然か、明らかになっていない。食道がんタキサン耐性株の *ABCB1* の発現をマイクロ RNA が制御している可能性が低くなったため、その他の機序を検討することとした。今回樹立した 5 種類のタキサン耐性細胞株はすべて *ABCB1* を高発現していたが、その中で、2 種類の耐性株 (RTE1P, RTE1D) について、*ABCB1* 高発現のメカニズムを明らかにするために、詳細に検討した。DNA を抽出し、定量 PCR 法にて、*ABCB1* 遺伝子の増幅があることが明らかになった。さらに、DNA メチル化阻害剤である、5-Aza の投与により、*ABCB1* の発現上昇が見られ、DNA の脱メチル化の寄与が考えられた。*ABCB1* には 2 種類のプロモーター (upstream promoter, downstream promoter) があるが、RACE (Rapid amplification of cDNA ends) を行い、どちらが優位であるか、検討し、downstream promoter が主に使われていることを明らかにした。さらに、親株と耐性株より DNA を抽出してバイサルファイト処理を行い、エクソン 1 と、イントロン 1 の CpG アイランドのメチル化の状態を、解析した。その結果エクソン 1 の領域は、親株でメチル化されているのに対し、タキサン耐性株で脱メチルされていることがわかった。イントロン 1 の領域には変化は見られなかった。以上より、タキサン耐性株の *ABCB1* 高発現は、遺伝子増幅と promoter 領域にある CpG island の脱メチル化が関与していることが明らかとなっ

た。  
(4) 19 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株について PD-L1 タンパク発現と miR-34a 発現量の定量を行った。miR-34a の発現が高くなると、PD-L1 タンパクの発現は低値を示すことがわかり、統計学的に有意な負の相関があった。さらに、miR-34a が低発現であった HSC3、HSC3CR、HSC2 の 3 株に miR-34a precursor を導入したところ、HSC3CR ではコントロールよりも PD-L1 の発現が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。他 2 株では、PD-L1 発現が低下したが、有意差は認めなかった。miR-34a が高発現であった IMC4CR、IMC4、RPMI の 3 株に miR-34a inhibitor を導入した。いずれの細胞株も有コントロールと比較すると PD-L1 発現が 1.5 倍から 2.2 倍程上昇したが、有意差は認めなかった。臨床検体での miR-34a と PD-L1 の関係をあきらかにするために、臨床検体 18 症例に対して、PD-L1 の免疫組織化学的検討と、miR-34a の発現量の定量を行った。臨床検体では両者間に有意な相関は認めなかった。また PD-L1 発現の有無は疾患特異的生存率に、有意差を認めなかった。

(5) 2014 年 2 月から 2017 年 8 月までに東北大学病院耳鼻咽喉・頭頸部外科にて手術治療を行った HNSCC 症例を対象に、切除標本より正常粘膜、腫瘍組織を採取、および末梢血採血をおこなった。試料の採取に際して、東北大学倫理委員会にヒトを対象とした医学の研究、および臨床応用についての倫理審査申請し承認を得たうえで、対象症例患者から同意書を取得した (受付番号 2012-1-331、2017-1-606)。8 症例の腫瘍組織、正常粘膜から抽出したマイクロ RNA を用い、マイクロアレイ解析を行った。アレイは、866 種類のヒトのマイクロ RNA プローブを含む Human miRNA microarray kit (V3) (Agilent Technologies) を使用し、Bioconductor から提供されるパッケージ Aglip を用い統計ソフト R で解析した。正常組織よりも腫瘍組織で発現が 2 倍以上増加し、かつシグナルの強度が 200 以上変化しているものを抽出した。このうち、miR-21、miR-141、miR-1308 では、半数 (4 症例) 以上で共通に変化しており、頭頸部癌関連 miRNA の候補と考えた。miR-21、miR-141、miR-1308 に加え、以前に我々が頭頸部癌予後不良と関連する miRNA として同定した miR-34a について、HNSCC 患者 5 名の血漿中の濃度を定量した。定量に当たり、既知量の *C. elegans* miR-39 mimic を加え、測定効率のコントロールとして用いた。miR-21、miR-1308 および頭頸部予後不良と関連する miRNA と報告されている miR-34a を循環 miRNA として検出でき、腫瘍マーカーとなりうることを示した。miR-141 に関してはいずれの検体においても検出されなかった。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Establishment and Analysis of Taxane Resistant Esophageal Cancer Cells  
Ruobing Wang, Anton Sumarpo, Yuriko Saiki,  
Makoto Sunamura, Akira Horii  
Tohoku J Exp Med. 2016 Dec;240(4):295-301  
査読あり

〔学会発表〕(計 2件)

第76回日本癌学会学術集会(2017年9月28日~30日)  
Gene Amplification and Epigenetic Mechanisms regulate ABCB1 expression in Taxane Resistant Esophageal Cancer Cells  
齋木由利子、石澤興太、砂村眞琴、堀井明  
第74回日本癌学会学術集会(2015年10月8日~10日、名古屋)  
ABCB1 in side populations is a key ABC transporter essential for acquired taxane-chemoresistance in esophageal cancer cells  
齋木由利子、石澤興太、砂村眞琴、堀井明

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋木 由利子(Saiki, Yuriko)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80311223

### (2) 研究分担者

小川 武則(Ogawa, Takenori)  
東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50375060

### (3) 連携研究者

竹内 裕也(Takeuchi, Hiroya)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：20265838

### (4) 研究協力者

砂村 眞琴(Sunamura, Makoto)  
東北大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：10201584