

平成22年 6月 15日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790147
研究課題名 (和文) miRNAによるシスプラチン耐性獲得機構の解明
研究課題名 (英文) Functional analysis of miRNA dependent cisplatin resistance mechanisms.
研究代表者
鈴木 俊宏 (SUZUKI TOSHIHIRO)
明治薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80322527

研究成果の概要 (和文)：

シスプラチンは臨床上重要な抗腫瘍薬で、その薬剤耐性は治療上大きな問題となる。本研究ではマイクロRNA (miRNA) と呼ばれる小分子RNAがシスプラチン耐性に関与しているのではないかと考え、検討を行った。その結果、シスプラチン耐性株で数種のmiRNAが共通の変動パターンを示すことを明らかにした。

これらの検討によりシスプラチン耐性に関わるmiRNAを見いだすことは、肺がん治療に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Cisplatin is an effective anticancer agent that is widely used in the treatment of cancer. However, the development of resistance to cisplatin is a major obstacle to treatment. To understand the clinically relevant mechanisms of resistance, many studies have been aimed at clarifying the biochemical/molecular alterations of cisplatin-resistance cells. However, these studies did not conclusively identify the basis of cellular resistance to cisplatin.

In this study, micro RNA expression profiles of cisplatin resistant cell lines were analyzed using microarray and real time RT-PCR. We found some of micro RNAs were similarly regulated in couple of cisplatin resistant non small lung cancer cell lines. These finding were useful information for understanding of the miRNA mediated cisplatin resistance mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：シスプラチン、miRNA、薬剤耐性、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) シスプラチンは古典的な抗がん剤であるが、併用化学療法においてはまだまだ使われ、固形癌の治療にはとても重要な薬剤の一つである。

しかしながら、そのメカニズムには不明な点が多く、特に動態を決定する輸送メカニズムの分子機構はいまだ明らかにされていない。

我々もシスプラチン耐性機構の解明を目的として関わる分子の探索、特に輸送機構に関わるとされる ABC トランスポーターや銅輸送体など、様々な検討を行ってきた。

しかしながら、耐性機構の解明は困難で、特に単一分子をクローニング、発現による機能解析を行っても耐性の程度は低く、耐性細胞株が持っているような強い耐性を示す分子を見つけることは困難であった。

(2) マイクロ RNA の存在が知られてきて、様々な生命現象との関係が見いだされはじめた。癌においても、発がんや転移など様々な現象との関係が少しずつではあるが明らかにされてきた。しかしながら、研究開始当初、抗がん剤感受性と miRNA に関する報告は乏しく、シスプラチン耐性との関係を見いだした報告は一報も無かった。

そこで、単一分子でメカニズムが解明できないシスプラチン耐性が miRNA による調節のような複数の分子をコントロールすることで獲得しているのではないかと考え、本研究、すなわち miRNA によるシスプラチン耐性機構の解明を行うに至った。

2. 研究の目的

シスプラチン耐性機構に関わる分子は多岐にわたり、単一分子で解明することが困難であると考えた。そこでシスプラチン耐性を司る miRNA を見だし、その調節メカニズムを解析することでこれまで解明出来なかったメカニズムを明らかにし、シスプラチン耐性の克服や感受性予測など臨床への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) miRNA を含むトータル RNA は miRNeasy (キアゲン) を用いて精製した。miRNA マイクロアレイ (アジレント) 及び 3D-GENE チップ (東レ) を用いてシスプラチン耐性株とその親株における miRNA 発現レベルのプロファイリングを行った。

上記 2 種類のチップで同様の傾向が認められた miRNA についてはサイバードグリーンを用いたリアルタイム PCR により miRNA 発現レベルの定量を行った。

(2) 耐性株で過剰発現していた miRNA については premiR (アンビオン) を親株である PC-9 に導入し、CCK アッセイ (同仁化学) によってシスプラチン感受性の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 子宮頸がん細胞株 KB-3-1、非小細胞肺癌細胞株 PC-9、PC-14 及び小細胞肺

癌細胞株 H69 とそれぞれのシスプラチン耐性株 4 組における miRNA の発現をマイクロアレイを用いて解析したところ、4 株で共通して発現が亢進（2 倍以上）していたのは miR-302a*、miR-199b-3p の 2 種、低下（2 分の 1 以下）していたものは miR-518d-3p の 1 つと極めて少ないものであった。これは細胞株の種による違いが大きく影響し、シスプラチン耐性に関与する因子を見出すには条件が厳しいと判断した。

そこで、非小細胞肺癌細胞株のみ絞り込んだ場合、高発現が miR-592、miR-302a*、miR-199b-3p。発現低下が miR-498、miR-522、miR-889、miR-377*、miR-378*、miR-520h、miR-374b*、miR-92a-2*、miR-518d-3p であった。

さらにマイクロアレイの定量性、再現性の低さを補うことを目的として、PC-9/CPr 及びその親株 PC-9 については、これらの細胞株における発現を 3D-Gene チップ（東レ）を用いて再度同様の解析した。

その結果、両マイクロアレイで miR-182、miR-106b、miR-592、miR-301b、miR-25、miR-93、miR-7、miR-181b、miR-7-1* の発現が亢進、miR-21、miR-100、miR-221、miR-99b、miR-193b、miR-125b、miR-365、miR-494、miR-923 のが発現が低下していた。

- (2) 両チップで矛盾したクローンを排除し、非小細胞肺癌細胞株である PC-9、PC-14 で共通の発現傾向にあった miRNA について miRNA レベルをリアルタイム PCR で定量的な解析を行った。

その結果 miR-106b、miR-7、miR-181b の発現が亢進、miR-631 のが発現が低下していた。

- (3) そこでシスプラチン耐性株で過剰発現していた miRNA、miR-106b、miR-7、miR-181b について親株 (PC-9) への導入実験を行ったところ、約 6 倍から 20 倍の発現上昇が認められた。しかしながら、その条件下でもシスプラチンに対する感受性に変化は認められなかった。

現在、miRNA 過剰発現時の mRNA 変動の網羅的解析並びにシスプラチン感受性評価の条件の再検討を行っており、シスプラチン耐性に関わる分子並びにその相互関係について解析中である。

以上、本検討からシスプラチン耐性に関わると思われる miRNA の選択ができた。これは、近年報告されている薬剤耐性と miRNA の関わりのように一組の耐性細胞における検討より信頼性が高くシスプラチン耐性、特に肺癌におけるシスプラチン耐性機構の解明に寄与しうると思われる。

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 2 件)

- ① Yoshioka M, Sagara H, Takahashi F, Harada N, Nishio K, Mori A, Ushio H, Shimizu K, Okada T, Ota M, Ito YM, Nagashima O, Atsuta R, Suzuki T, Fukuda T, Fukuchi Y and Takahashi K, **Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic airway inflammation**, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*、査読有、**296**、2009、30-36
- ② Okabe M, Szakács G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, Weinstein JN and Gottesman MM, **Profiling SLC0 and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters**、*Mol Cancer Ther.*、**9**、2008、3081-3091

[学会発表] (計 8 件)

- ① Toshihiro Suzuki, Kazuto Nishio, Tadayasu Togawa, Kanako Sugawara, Hitoshi Sakuraba, Analysis of miRNA mediated Cisplatin resistant mechanisms., Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2010/4, Washington DC
- ② 鈴木俊宏、西尾和人、兎川忠靖、菅原佳奈子、櫻庭 均、**シスプラチン耐性肺癌細胞株における miRNA 発現プロファイル**: 第 68 回日本癌学会学術総会、2009/10、横浜
- ③ 鈴木俊宏、西尾和人、兎川忠靖、菅原佳奈子、櫻庭 均、**シスプラチン耐性肺癌細胞株における miRNA の発現解析**: 第 82 回日本生化学会大会、2009/10、神戸
- ④ 鈴木俊宏、兎川忠靖、菅原佳奈子、西尾

和人、姫野誠一郎、櫻庭 均、**耐性細胞を用いたシスプラチン耐性因子の探索**：
日本薬学会第 129 年会、2009/3、京都

- ⑤ **鈴木俊宏**、兔川忠靖、櫻庭 均、**薬剤耐性における金属輸送の役割**：第 1 回メタロミクス研究フォーラムS5-4、2008/12、東京
- ⑥ **鈴木俊宏**、兔川忠靖、西尾和人、姫野誠一郎、櫻庭 均、**耐性細胞を用いたシスプラチン耐性因子の探索**：第 81 回日本生化学会大会／第 31 回日本分子生物学会年会、2008/12、神戸
- ⑦ **鈴木俊宏**、Shen Ding-Wu、岡部光規、兔川忠靖、Gottesman M Michael、櫻庭 均、**発現クローニングによるシスプラチン耐性因子の探索**：がん分子標的治療研究会、2008/6、東京
- ⑧ **鈴木俊宏**、**シスプラチンの耐性と金属輸送機構**：日本薬学会第 128 年会シンポジウムS24、2008/3、横浜

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・講師
研究者番号：80322527