

機関番号：34521

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790168

研究課題名 (和文) 大腸癌の抗癌剤感受性を予測するバイオマーカーの同定と臨床的応用

研究課題名 (英文) Development and clinical application of biomarker for predicting the sensitivity to chemotherapeutic agents

研究代表者

高良 恒史 (TAKARA KOHJI)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：00329939

研究成果の概要 (和文) : ヒト大腸癌細胞株 7 種の遺伝子発現レベルが抗腫瘍性白金錯体 (3 種) の IC<sub>50</sub> 値と負の相関を示したのは 8 種、逆に正の相関は 48 種であった。また、シスプラチンの IC<sub>50</sub> 値は、DNA 修復関連酵素の発現量と比較的高い正の相関を示し、5-FU の IC<sub>50</sub> 値は一部の薬物トランスポータ発現と正の相関を示した。一方、抗腫瘍性白金錯体に低感受性の細胞で高い発現を示した蛋白は 200 種、逆に低い発現は 156 種の蛋白であり、これらには鉄イオンの恒常性維持や重金属の解毒に関与する蛋白質が含まれていた。

研究成果の概要 (英文) : Eight genes, which were correlated negatively with the IC<sub>50</sub> values for platinum derivatives, were extracted by a microarray analysis. In contrast, 48 genes were extracted, which showed the positive correlation with the IC<sub>50</sub> values for platinum derivatives. The level of BRCA1/2 expression showed a positive correlation with the IC<sub>50</sub> values for cisplatin, and that for 5-FU showed a positive correlation with the levels of MRP2 and MRP5 expression. In addition, proteome analysis indicated that 200 or 156 protein was expressed highly or low in the low-sensitive cells, respectively. Among them, the regulators for homeostasis of iron and for detoxification of heavy metal, were included.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
|        |           |         |           |
|        |           |         |           |
| 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：オーダーメイド医療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する治療、特に化学療法は、新規抗癌剤の開発、新規レジメンの開発など確実に進歩している。しかしながら、本邦に

において、癌による死亡者数は増加の一途を辿っており、最近では、全死亡者の 30%以上が癌による死亡となっている (がんの統計 '07、財団法人がん研究振興財団)。

この要因として、I. 癌細胞の抗癌剤に対する耐性獲得並びに II. 患者の化学療法に対する応答の個体差が考えられる。従って、癌化学療法の治療成績向上のために、各患者に適した治療法の選択（テーラーメイド療法）が必要である。

そこで、上記 I の課題解決を目指して、既に多岐にわたる研究を実施した。このうち、抗癌剤耐性株を新規に樹立することにより、耐性獲得に関わる分子メカニズムの一因を明らかにするとともに、その複雑性、多様性についても明らかにした。さらに、これらの耐性細胞を使用することにより、抗癌剤耐性を回復可能な物質の候補・方法論を提唱し、抗癌剤耐性の克服に向けた有用な基礎的知見を提供している。

また、上記 II の課題解決に向けて、大腸癌細胞株の抗癌剤感受性を規定する要因について既に基礎的検討を進め、それは単一ではなく、複数の要因に支配されていることを明らかにした。これは網羅的な解析の必要性並びに重要性を示している。一方、このような研究成績を実地医療で応用するためには、患者の抗癌剤応答性に関する情報を効果的かつ簡便に得るためのバイオマーカーへと発展させる必要となる。しかしながら、化学療法の効果を予測できるバイオマーカーに関して、薬物代謝酵素やトランスポーターの遺伝子変異は明らかにされているものの、癌細胞の特性に依存したバイオマーカーはほとんどないのが実状である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌細胞株を用いて、大腸癌化学療法で汎用される抗癌剤、すなわち抗腫瘍性白金錯体及び 5-フルオロウラシル (5-FU) に焦点を絞り、抗癌剤感受性と相関するバイオマーカー候補を網羅的に探索し、抗癌剤感受性を効果的に予測できる癌細胞由来のバイオマーカーを同定することである。

## 3. 研究の方法

ヒト大腸癌細胞として、Caco-2、DLD-1、HCT-15、HCT116、LS180、SW620 及び WiDr 細胞を選択した。また、抗癌剤は、抗腫瘍性白金錯体（シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチン）及び 5-フルオロウラシル (5-FU) を使用した。

抗癌剤感受性は、WST-1 法により 50%増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出することで評価した。

mRNA の発現は、細胞から全 RNA を抽出し、Human-6 V2 BeadChip (Illumina, Inc.) により網羅的に解析した。得られた遺伝子発現データと IC<sub>50</sub> 値について相関解析を行い、正又

は負の相関 ( $p < 0.05$ ) を示した遺伝子を抽出した。

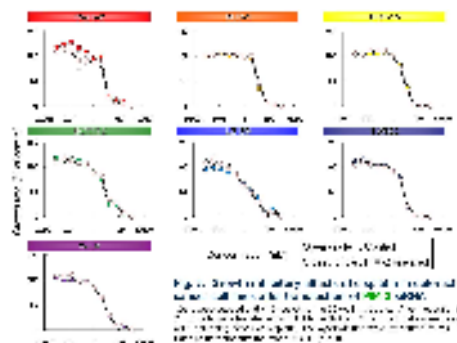
また、蛋白発現の網羅的解析は、iTRAQ® 試薬を用いて細胞溶解液をラベリングし、QSTAR® Elite Hybrid LC/MS/MS Hybrid System にて実施した。得られたデータは、ProteinPilot™ を用いて解析し、蛋白の同定を行った。発現データに基づいて、細胞間で発現レベルの相違している蛋白を抽出した。

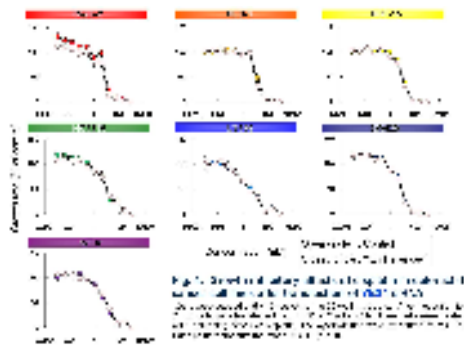
## 4. 研究成果

シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンの IC<sub>50</sub> 値は、大腸癌細胞間で相違することが明らかとなった。

そこで、ヒト大腸癌細胞株 7 種の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、約 48,000 遺伝子のうち、99 遺伝子の発現がシスプラチンの IC<sub>50</sub> 値と負の相関 ( $r < -0.757$ ) を示した。また、カルボプラチン及びオキサリプラチンの IC<sub>50</sub> 値と遺伝子発現量が負の相関を示した遺伝子数は、それぞれ 89 ( $r < -0.755$ ) 及び 89 ( $r < -0.756$ ) であった。さらに、いずれの薬物の IC<sub>50</sub> 値とも負の相関を示した遺伝子は 8 種に絞り込まれた。一方、220、463 及び 260 遺伝子の発現量が、それぞれシスプラチン ( $r > 0.755$ )、カルボプラチン ( $r > 0.755$ ) 及びオキサリプラチン ( $r > 0.756$ ) の IC<sub>50</sub> 値と正の相関を示した。さらに、IC<sub>50</sub> 値と遺伝子発現量が、いずれの薬物においても正の相関を示したのは 48 種であった。なお、既にこれら薬物の感受性等への影響が報告されている遺伝子は、今回抽出した遺伝子群には認められなかった。

絞り込まれた遺伝子のうち、YES-1 と PIM-2 遺伝子の影響を検討したが、抗腫瘍性白金錯体に対する感受性規定因子としての寄与は低いことが示唆された。





そこで、抗癌剤の細胞内動態に影響する酵素及びトランスポータに着目した結果、シスプラチンの  $IC_{50}$  値は、DNA 修復関連酵素 BRCA1 及び BRCA2 mRNA 発現量と比較的高い正の相関を示した。しかしながら、カルボプラチン及びオキサリプラチンの場合、今回検討した因子の中に、抗癌剤感受性と関連性を示すものは認められなかった。一方、5-FU の  $IC_{50}$  値は、トランスポータである MRP2 及び MRP5 mRNA 発現量と正の相関を示すことが明らかとなった。以上の結果より、シスプラチン及び 5-FU 感受性は、それぞれ異なる因子の影響を受けることが示された。したがって、多剤併用化学療法の効果を予測する場合、複数の因子に対する同時評価の重要性が示唆された。

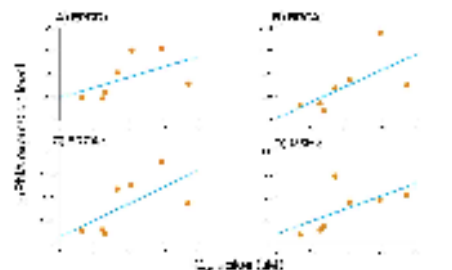


Fig. 4. Correlation between the  $IC_{50}$  values for cisplatin and the expression of BRCA1 and BRCA2 mRNA in HCT116 cells. The regression lines are shown in blue.

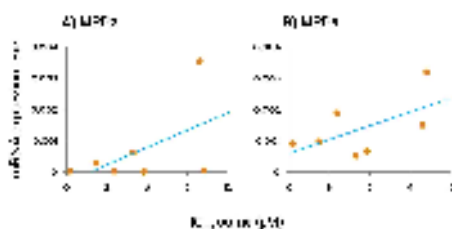


Fig. 5. Correlation between the  $IC_{50}$  values for 5-FU and the expression of MRP2 and MRP5 mRNA in HCT116 cells. The regression lines are shown in blue.

抗腫瘍性白金錯体に対して高い感受性を示す HCT116 細胞と低い感受性を示す SW620 細胞についてプロテオーム解析を実施した結果、両細胞で 1648 種の蛋白について同定できた。そのうち、HCT116 細胞と比較して、SW620 細胞で 2 倍より高い発現を示した蛋白は 200 種類であり、逆に 1/2 より低い発現を示した蛋白は 156 種類であった。SW620 細胞で 2 倍より高い発現を示した蛋白は 200 種類には、鉄イオンの恒常性維持に関与する GLRX5 や重金属の解毒に関与する GST などが含まれていた。

今後、これらの遺伝子及び蛋白の抗癌剤感受性に及ぼす影響を検討することにより、抗癌剤感受性予測のための新たなバイオマーカーの発見につながるものと考えている。

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 藪田直希, 高良恒史, 峯垣哲也, 北田徳昭, 辻本雅之, 西口工司, 横山照由: 網羅的遺伝子発現解析に基づいた抗腫瘍性白金錯体感受性因子の探索 第 19 回日本医療薬学会年会 2009 年 10 月 24 日(長崎)
- ② 峯垣哲也, 高良恒史, 濱口良平, 藪田直希, 辻本雅之, 西口工司: 大腸癌細胞での抗腫瘍性白金錯体及び 5-FU の感受性を規定する要因の探索 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 28 日(岡山)
- ③ 藪田直希, 峯垣哲也, 高良恒史, 河野寛子, 島田実希子, 宮西良佳, 辻本雅之, 西口工司: BRCA1 の抗癌剤感受性予測バイオマーカーとしての有用性 第 32 回日本病院薬剤師会近畿学術大会 2011 年 1 月 23 日(神戸)
- ④ 藪田直希, 峯垣哲也, 伯井理恵子, 藤井尚子, 湯月翔太, 辻本雅之, 高良恒史, 西口工司: BRCA 発現量に基づいた抗癌剤感受性の癌種依存性並びに抗癌剤依存性 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 29 日(静岡)
- ⑤ Juan Chavez; Michael R. Hoopmann; Chad Weisbrod; Kohji Takara; James Bruce: Quantitative Proteomic and Interaction Network Analysis of Drug Resistance in HeLa Cells, 59<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 5-9, 2011 (Colorado)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高良 恒史 (TAKARA KOHJI)  
 姫路獨協大学・薬学部・准教授  
 研究者番号: 00329939