

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590677

研究課題名（和文） RNA結合蛋白RBM5の関与する抗癌剤耐性克服機序の解明

研究課題名（英文） RNA binding protein RBM5 modulates chemotherapy resistance

研究代表者

小林 隆彦 (KOBAYASHI TAKAHIKO)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80333607

研究成果の概要（和文）：RBM5に対するモノクローナル抗体により胃癌組織におけるRBM5のタンパク発現量と病理学的因子との関連性を検討したところ、RBM5の発現が低下している症例では、胃癌の進行度が高く、予後不良の傾向があった。RBM5のノックダウン細胞ではp53やp21の発現が低下しており、5-FUに対する薬剤耐性を示した。これらの結果より癌細胞内のRBM5の発現量が、抗癌剤の感受性に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Prognostic value of RBM5 in gastric cancer was evaluated and compared with other histopathologic parameters. RBM5 protein expression was determined by immunohistochemistry in 106 gastric carcinomas. Reduced expression of RBM5 was observed in 29 cases (27.4%), and it was correlated with tumor size, depth, histological classification, and advanced stage. Furthermore, it was significantly associated with unfavourable prognosis. Furthermore, knockdown of endogenous RBM5 led to decreased p53 and p21 protein expression levels in gastric cancer cells, and increased drug resistance against 5-fluorouracil. Taken together, these results suggest that decreased function of RBM5 is associated with malignant transformation and resistance to cancer chemotherapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

消化器癌は造血器腫瘍や生殖器癌に比較し

て化学療法の奏効率は低く、進行癌においては多剤併用による強力な化学療法を行って

も予後は不良である。癌化学療法における大きな問題の一つに、治療によって薬剤耐性細胞が高頻度に出現し、再増殖あるいは再発の原因となっていると推測される。そのため抗癌剤に対する耐性化の機序の解明とその克服は、臨床上重要な意義を持つと考えられる。

遺伝情報の発現は、DNA から蛋白質までの様々な段階で複雑に制御されている。RNA 結合蛋白質(RBP)は、mRNA のスプライシング、核外輸送、細胞質内局在、安定性及び翻訳効率の調節などの転写後遺伝子発現調節において重要な働きをしている。RNA 結合蛋白である RBM5 の遺伝子座は、3p21.3 にあり、同部位は肺癌、頭頸部癌、腎癌において高頻度に LOH が起こる領域として知られている。我々はこれまでに、癌細胞内において RBM5 が癌抑制遺伝子 p53 の転写活性を亢進させることを見出したが、RBM5 の癌組織における機能は解明されておらず、薬剤耐性との関連性も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、臨床検体における RBM5 の発現量と予後などとの関連性を検討する。RBM5 が癌細胞内において抗癌剤感受性あるいは耐性に与える影響を検討し、その機序を解明し、抗癌剤耐性克服への応用を目指そうとするものである。

3. 研究の方法

RBM5 に対する特異的モノクローナル抗体を独自に作成し、胃癌組織における RBM5 の発現量を検討し、臨床病理学的因子との関連性を検討した。症例は北海道大学病院において 1990 年から 2000 年までの 10 年間に胃癌と診断され、部分切除を含めた胃切除術を施行された 106 症例を対象とした。

In vitro における RBM5 の機能を探るために、RBM5 遺伝子を発現誘導可能あるいはノッ

クダウンさせた培養癌細胞を樹立し、抗癌剤感受性あるいは抗癌剤耐性に与える影響を検討する。さらに RBM5 が細胞周期調節因子の発現量に与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 胃癌組織における RBM5 の発現

RBM5 の胃癌における臨床病理学的な意義を調べるために、独自に RBM5 のモノクローナル抗体を作成した。次に、胃癌手術標本を用いて癌部、非癌部を免疫組織学的に比較し、臨床病理学的事項との関連性の検討を行った。RBM5 は胃癌組織において、細胞核に特異的に染色された(図 1)。非癌部の胃腺管上皮の核の染色強度を score 2、正常染色群として内部コントロールとした。それよりも染色が弱いものを score 1、低染色群、強いものを score 3、高染色群、全く染まらないものを score 0 として 4 段階評価を行った。score 1 群は 29 例、score 2 群は 33 例、score 3 群

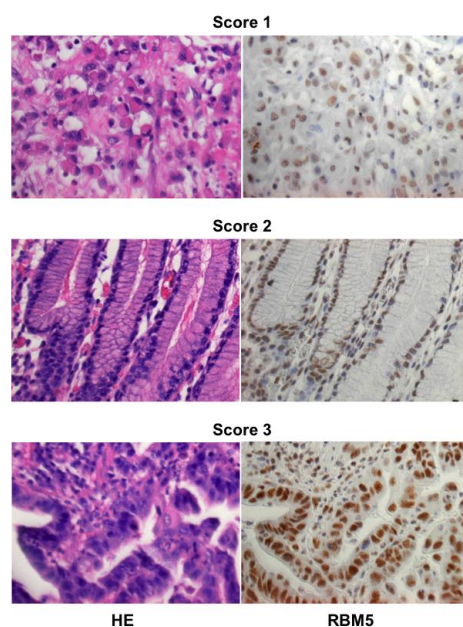


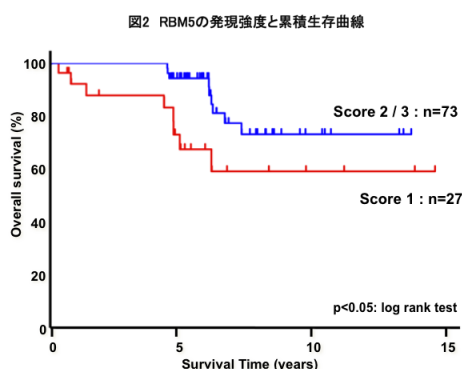
図1 胃癌組織におけるRBM5の発現

は 44 例であったが、今回の検討症例内では、score 0 群は認めなかった。

胃癌組織型との検討では、分化型 58 症例中 5 例、8.6% のみが score 1 を示したが、未分化型では 48 症例中 24 例、50% が score 1 を示し、有意差を認めた。胃壁深達度の T2 以深の 58 症例中 25 例、43.1% が score 1 を示したが、T1 症例では 47 症例中 4 例、8.5% のみが score 1 を示し、深達度の進行している腫瘍が RBM5 の発現低下している傾向を認めました。またリンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲では、いずれも score 1 群にて有意に高い陽性率を示した。これらの病理学的因子を総合評価する進行度では、Stage I, II に占める score 1 群の割合は 17.8% でしたが、Stage III, IV に占める割合は 48.5% を占め、有意に高い傾向を示した。

これらの結果は、RBM5 は胃癌の進行度が高いほど発現が低下する傾向を示唆していると考えられた。

(2) RBM5 の発現量が累積生存率に与える影響予後を検討できた症例のうち、他病死を除いた 100 症例において、RBM5 の発現量が累積生存率に与える影響を Kaplan-Meier 法にて算出し、Logrank 法にて検定した。図 2 のように score 1 群は score 2, 3 群に比較して有意に予後不良であり、RBM5 の発現量が予後に関連することが示唆された。



(3) 胃癌細胞内の RBM5 と細胞周期調節因子

の発現量の関連

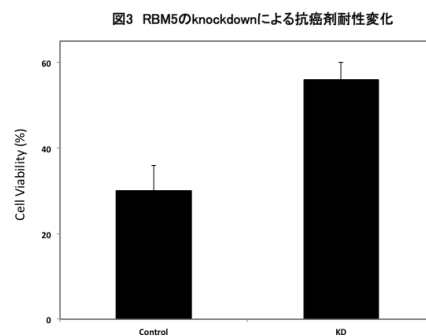
癌細胞内で RBM5 の発現量が低下していることが、癌細胞の性質に与える影響を検討するために、RBM5 ノックダウン細胞株を樹立した。細胞増殖関連因子の発現量をウエスタンブロット法により検討したところ、RBM5 のノックダウンにより p53 や p21 のタンパク発現量が減少していた。

RBM5 が細胞内において、これらの細胞周期調節因子の発現調節機能を有していることが示唆された。このことが癌細胞の増殖能に影響を与えている可能性があり、今後はさらに詳細に分子機序を検討する必要性が認められた。

(4) RBM5 と抗癌剤耐性との関連

癌細胞内の RBM5 の発現量の変化が、抗癌剤に対する感受性、耐性に与える影響を検討した。胃癌、大腸癌などの消化器癌に広く用いられているフッ化ピリミジン系薬剤の代表的抗腫瘍薬の一つである 5-fluorouracil (5-FU) に対する感受性増強効果を検討した。

BM5 ノックダウン細胞では、コントロールに比べて 5-FU に対する感受性が低下していた (図 3)。



次に RBM5 を doxycycline による発現誘導を行える細胞株を樹立し、抗癌剤への感受性の変化を検討した。図 4 のように、RBM5 の発現を誘導させると、doxorubicin によるアポ

トーススを起こす細胞が増加した。

これらの実験結果、癌細胞内の RBM5 の発現量が、抗癌剤の感により受性に影響を与えることが示唆された。

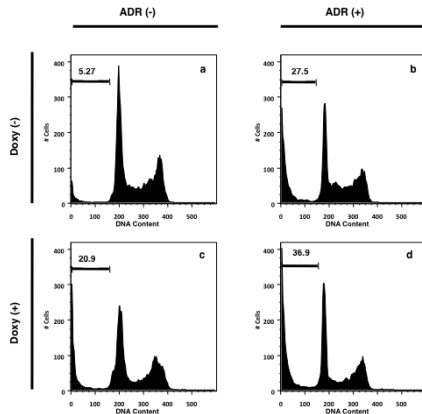


図4 RBM5の発現誘導による抗癌剤感受性増強

(5) 考察と今後の研究への発展

現在、これらの樹立した RBM5 遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンさせた培養癌細胞に 5-FU の投与を行い、それにより変動する遺伝子の網羅的な検討を行っている。これらのマイクロアレイ解析における変動遺伝子群の中から、新規の薬剤感受性遺伝子あるいは薬剤耐性関連遺伝子として有力なものを抽出し、癌細胞における発現調節機序の検討および機能解析を行う予定である。

また 5-FU は癌細胞内において、uridine phosphorylase (UP)、orotatephosphorybosyl transferase (OPRT)、thymidine phosphorylase (TP) により代謝され、その代謝物の 1 つである fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) が thymidylate synthase (TS) を阻害し、DNA 合成阻害を引き起こす。さらに、5-FU 代謝物である fluorouridine triphosphate (FUTP) が RNA へ取り込まれ、RNA 機能障害を引き起こすと考えられている。また、投与された 5-FU は、肝臓や腫瘍中の dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) により分解されると考

えられている。今後は、これらの 5-FU 代謝酵素の発現調節機序に RBM5 が与える影響も合わせて検討していく予定である。さらには、5-FU による RNA 機能障害、DNA 合成障害から細胞死に至るまでの詳細なメカニズムは、未だに十分に解明されていない。従って、DPD、TS、OPRT などの代謝酵素以外の因子が 5-FU の効果を規定している可能性は多分にあり、今後は RBM5 による 5-FU 代謝酵素の発現調節機序をより詳細に解明していきたいと考える。

将来的には、cisplatin や gemcitabine などの他の抗癌剤に対する耐性機序解明への応用へ発展させていきたい。

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)

Kobayashi T, Ishida J, Musashi M, Ota S, Yoshida T, Shimizu Y, Chuma M, Kawakami H, Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Kobayashi M, Itoh H, Edamatsu H, Sutherland LC, Brachmann RK. p53 transactivation is involved in the antiproliferative activity of the putative tumor suppressor RBM5. *Int J Cancer*, 2011 128(2):304-318. DOI: 10.1002/ijc.25345, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 隆彦

(KOBAYASHI TAKAHIKO)

研究者番号：80333607

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員