

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591007

研究課題名(和文) RBM5に結合する抗癌剤感受性制御遺伝子による膵癌の耐性克服治療の開発

研究課題名(英文) RBM5 plays important roles in the post-transcriptional regulation of mRNAs that are involved in the metabolism of chemotherapeutic reagents.

研究代表者

河上 洋(Kawakami, Hiroshi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：80399823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の化学療法では、早期に出現する薬剤耐性が大きな問題である。RNA結合タンパクRBM5に免疫共沈するタンパク質を網羅的に解析したところ、HuRがRBM5と特異的に結合することを見出した。次にHuRに結合する標的mRNAを検討するとRBM5の発現誘導によりHuR結合性のmRNAは減少していた。

HuRは抗癌剤などのストレス存在下では核内から核外へ移行し、標的とするmRNAの3'UTRに結合してmRNA安定化に寄与している。

以上より、核内においてRBM5がHuRに結合することで、核外移行するHuRの量に影響を与え、抗癌剤感受性に関与する標的mRNAの発現に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Despite recent advances in various chemotherapeutic regimens, pancreatic cancer remains highly resistant to conventional chemotherapy. The putative tumor suppressor RBM5 is known to modulate late apoptosis and cell cycle arrest but the molecular mechanisms of RBM5 function are poorly understood.

We show here that RBM5 interacted with HuR, which is one of mRNA regulatory proteins that bind AU-rich elements in the 3'-untranslated regions of target mRNAs, stabilizing them and modulating their translation. Certain cell stresses including chemotherapeutic reagents induce translocation of HuR from the nucleus to the cytoplasm. RBM5 associated with HuR in the nucleus and reduced translocation of HuR to the cytoplasm. Furthermore, RBM5 overexpression decreased the association of HuR with target mRNAs.

Taken together, we suggest that RBM5 might play important roles in the post-transcriptional regulation of mRNAs that are involved in the metabolism of chemotherapeutic reagents.

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

膵癌は消化器癌の中でも予後不良であり、特に抗癌剤に対する薬剤抵抗性が治療成績を悪化させている一因である。手術不能症例では gemcitabine (GEM)を標準治療薬とする化学療法が選択されるが、その奏功率は20%にも満たない。また5-フルオロウラシル(5-FU)なども投与されているが、GEMの効果を凌駕する薬剤は明らかにされていない。さらに現状では、化学療法中におけるGEMあるいは他剤への獲得耐性の出現は早晚不可避である。そのため膵癌細胞の抗癌剤への感受性や耐性に関する分子機構の研究は重要な研究課題である。

遺伝情報の発現は、DNAからタンパク質までの様々な段階で複雑かつ巧妙に制御されている。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、安定性およ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。申請者はRNA結合タンパクRBM5が、癌抑制遺伝子p53の転写活性を亢進させることを報告した。一方でp53が抗癌剤感受性に関与しているという報告もあり、癌細胞においてRBM5が抗癌剤感受性に影響を与える可能性があり、抗癌剤耐性の克服に寄与する可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、抗癌剤投与中の膵癌培養細胞において、RBM5に直接結合する新規の抗癌剤感受性制御遺伝子を探索、同定する。さらに抗癌剤感受性あるいは耐性に与える影響を検討し、その分子生物学的機序を解明する。

また癌細胞組織における発現量を検討し、臨床病理学的な意義を検討する。

将来的には、同定された新規の抗癌剤感受性制御遺伝子の発現調節を分子標的として、各種抗癌剤耐性克服への応用を目指すものである。

### 3. 研究の方法

(1)市販の抗体に本研究に使用可能な良質な抗体が存在しなかったため、ヒト全長RBM5のcDNAよりリコンビナントタンパクを精製し、これを抗原としてマウス抗RBM5モノクローナル抗体を作成した。

(2)作成したモノクローナル抗体を用いて、RBM5を免疫沈降させ、結合する分子を回収し同定した。さらに、同定された新規の抗癌剤感受性制御候補遺伝子に結合するRNAをRNA共沈法(RIP)にて回収し網羅的に解析した。

(3)新規の抗癌剤感受性制御候補遺伝子の発現プラスミドを作成し膵癌培養細胞株において強発現させて、GEMあるいは5-FUなどの抗癌剤感受性に与える影響を検討した。またsiRNAによりノックダウンさせ同様の検討を行った。

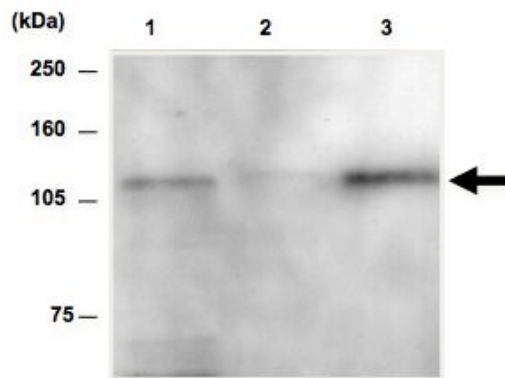
(4)作成した抗RBM5モノクローナル抗体を用いて、培養癌細胞内の動態を観察した。また、膵癌病理組織検体の免疫組織染色を行い、臨床病理学的検討を行った。

### 4. 研究成果

(1)抗RBM5モノクローナル抗体の特異性の検討

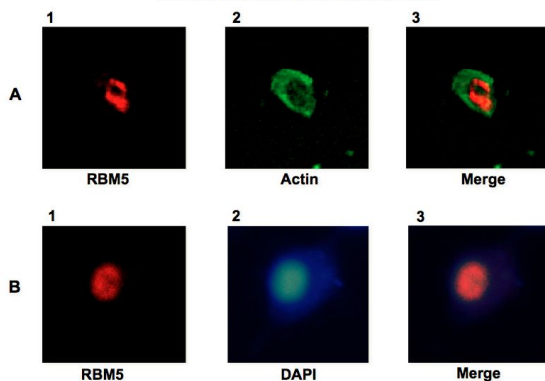
作成した抗体は、核内のRBM5を特異的に認識していることをWestern Blot法(図1)および免疫蛍光染色(図2)にて確認した。

図1. Western BlotによるRBM5の検出



1: 細胞全抽出物  
2: 細胞質画分  
3: 核画分

図2. 免疫蛍光染色によるRBM5の細胞内局在



(2) RBM5結合性タンパク質の検討

抗RBM5抗体を用いて、RBM5に免疫共沈するタンパク質を網羅的に解析した。その中で、抗癌剤感受性との関与が推定されているRNA結合能を有するHuRがRBM5と特異的に結合することを免疫共沈法により見出した(図3)。

HuRは標的とするmRNAの3'UTR中にあるAUリッチエレメント(ARE)に結合してmRNAの分解を抑制することにより、c-fos、c-myc、COX-2、p53などの多様な遺伝子の発現を調節している。さらに、HuRはmRNAの核外輸送にも関与していることが報告され

ている。また、抗癌剤、紫外線などのストレス存在下においてHuRは核内から核外へ移行することが知られている。

またHuRは多くの癌細胞で高発現しており、細胞質内のHuRの発現量は、抗癌剤耐性や予後との関連が報告されている。

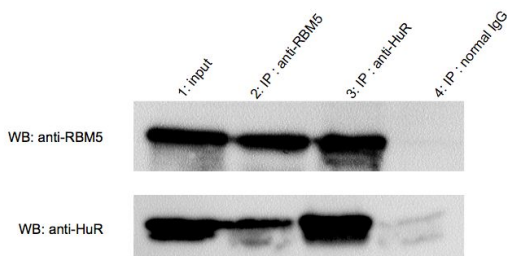
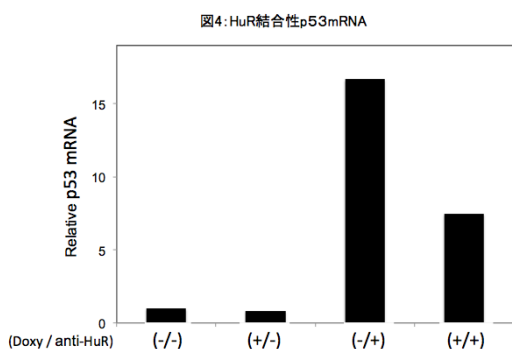


図3. RBM5とHuRの免疫共沈

### (3) RBM5がRNA結合タンパクHuRに与える影響

次に、RBM5の発現がHuRに結合するmRNAに与える影響をRNA共沈法(RIP)により検討した(図4)。Doxycycline(Doxy)によるRBM5誘導細胞株を樹立し、RIPによるHuR結合性のp53mRNAを検討した。図4のようにRBM5の誘導により、HuR結合性のp53RNAは減少した。このことは、HuRにより制御されるmRNAの一つであるp53の転写後調節に核内のRBM5の発現が関与していることを示唆している。



### (4) 今後の検討予定

以上の結果より、核内タンパクRBM5が抗癌剤投与により、タンパク量が減少すると、RBM5と結合していた核内に存在するHuRが減少し、核外に移行する。その結果、HuRが標的とするAREを持つmRNAの安定化に影響を与える可能性が示唆された。

RBM5は肺癌などの各種の癌で、mRNA量およびタンパク量の発現低下が報告されている。一方で、癌細胞にRBM5を強発現させると、抗癌剤感受性が亢進させた。この分子機序として、核内においてRBM5が、もう一つのRBPであるHuRに結合して、抗癌剤などのストレス下におけるHuRの核外移行およびHuR標的遺伝子の発現調節を行っている可能性が示された。今後はこれらの結果が肺癌以外の各種の癌細胞においても普遍的に見られる現象であるかを検討する予定である。

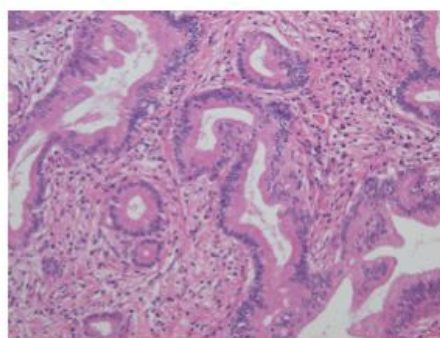
また5-FUやGEMのみならず、他の抗癌剤や紫外線、放射線等の各種ストレスの影響を検討しなくてはならないと考える。

臨床の化学療法実施の際には、対象疾患、患者の状況により、抗癌剤を数種組み合わせ、投与方法を工夫し、各種のプロトコルが選択される。そこで本研究により得られたHuRおよびRBM5の反応が、抗癌剤の投与方法によりどのように変動していくかを検討していく必要がある。具体的には、GEM、5-FU、CDDPなどの抗癌剤を単剤あるいは併用両方による変化、さらには単回投与、持続投与など投与方法による影響を検討していく予定である。

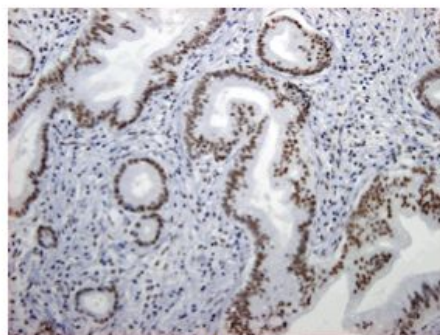
また近年、膵腫瘍の確定診断に経内視鏡的に超音波内視鏡下針生検(EUS-FNA)が可能になり、超音波ガイド下に生検することが可能となってきた。今回作成したRBM5モノクローナル抗体は、結果に示したようなWestern Blot法や細胞の免疫染色のみならず、パラフィン包埋の病理組織標本の免疫染色にも使用可能であった(図5)。現在、化学療法前後のEUS-FNAサンプルを用いてRBM5抗体、HuR抗体を用いた免疫組織染色を行い、癌部および非癌部におけるタンパク発現量の差の検討および化学療法の奏効率との関連性の検討を行っている。さらに外科手術標本を用いて免疫組織染色によりRBM5およびHuRの発現量を検討し、術後の予後解析を行い、これら分子の新規の予後規定因子としての有用性を検討中である。

RBM5を癌細胞に強発現させると抗癌剤感受性が亢進するのみならず、癌細胞の増殖そのものを抑制することが判明しつつある。こ

図5. 免疫組織染色によるRBM5の検出



HE染色



RBM5免疫染色

のことは、癌抑制遺伝子である RBM5 は遺伝子治療の可能性を秘めていることを示す物である。また一方で、HuR の発現を低下させることによって、癌細胞の増殖性は低下する。このことは、HuR をノックダウンさせるような分子は、新たな分子標的治療薬としての可能性を持つものとして期待される。現在、5-FU および Gem 耐性癌細胞株を樹立し、RBM5 および HuR の発現動態を検討中である。さらに RBM5 の発現誘導、HuR のノックダウンによる増殖制御可能性を試みている。

さらに RBM5 あるいは HuR を強発現もしくはノックダウンさせた癌細胞株に、GEM および 5-FU を投与した後に mRNA を回収し、マイクロアレイを実施し、発現遺伝子プロファイルの網羅的解析を行い、データマイニングの手法を用いて抗癌剤耐性に関与する HuR 以外の変動遺伝子を抽出して今後の研究につなげていきたい。またこれらと平行して、RIP の手法を用いて RBM5 および HuR に結合する抗癌剤耐性に関与する RNA の解析も同時進行させている。

#### 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)

##### [雑誌論文](計2件)

Eto K, Kawakami H, Kuwatani M, Kudo T, Abe Y, Kawahata S, Takasawa A, Fukuoka M, Matsuno Y, Asaka M, Sakamoto N. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer. Br J Cancer, 2013, 108(7): 1488-1494. 査読有  
DOI; 10.1038/bjc.2013.108.

Ohshima Y, Yasuda I, Kawakami H, Kuwatani M, Mukai T, Iwashita T, Doi S, Nakashima M, Hirose Y, Asaka M, Moriwaki H. EUS-FNA for suspected malignant biliary strictures after negative endoscopic transpapillary brush cytology and forceps biopsy. J Gastroenterol. 2011, 46(7): 921-928. 査読有  
DOI; 10.1007/s00535-011-0404-z.

##### [学会発表](計2件)

江藤和範, 河上 洋, 坂本直哉 切除不能膵癌に対する超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体を用いたgemcitabine 感受性予測因子の検討 第99回日本消化器病学会総会 2013年03月21日-2013年03月23日 城山観光ホテル(鹿児島市)

江藤和範, 河上 洋, 坂本直哉, 超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体を用い

た膵癌における抗癌剤感受性予測因子の検討 第43回日本膵臓学会 2012年06月28日-2012年06月29日 ホテルメトロポリタン山形(山形市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

河上 洋(KAWAKAMI HIROSHI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号: 80399823

##### (2)研究分担者

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

##### (3)連携研究者

なし